



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y
DESARROLLO, A.C.**

TESIS:

**Requerimiento de pantotenato de calcio y efectos de su
deficiencia en juveniles de pargo flamenco (*Lutjanus
guttatus*).**

PRESENTA:

Biol. Citlalic A. Pimentel Acosta

Tesis aprobada por la

**UNIDAD MAZATLÁN EN ACUICULTURA
Y MANEJO AMBIENTAL**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS**

Mazatlán, Sinaloa

Diciembre del año 2011

DECLARACIÓN DE LA INSTITUCIÓN

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

CARTA DE APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la Biol. Citlalic Altagracia Pimentel Acosta, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

Dra. María Cristina Chávez Sánchez
Director de Tesis

Dr. Miguel Ángel Olvera Novoa
Asesor de Tesis

Dra. Crisantema Hernández González
Asesor de Tesis

Dr. Pablo Almazán Rueda
Asesor de Tesis

Dr. Oscar Basilio Del Río Zaragoza
Asesor de Tesis

M. en C. María Isabel Abdo de la Parra
Asesor de Tesis

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado con la beca para la realización de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD) Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental, por permitirme llevar a cabo los estudios de Maestría.

Al proyecto de Ciencia Básica CONACyT No. 82991 titulado “Determinación de los requerimientos de algunas vitaminas hidrosolubles en peces marinos de importancia comercial”.

A la Dra. María Cristina Chávez Sánchez por su apoyo, guía y conocimiento brindado durante toda la Maestría.

A los miembros del comité: Dra. Crisantema Hernández González, M. C. Isabel Abdo de La Parra, Dr. Miguel Ángel Olvera, Dr. Oscar B. Del Rio Zaragoza y Dr. Pablo Almazán Rueda, por sus valiosas observaciones y aportaciones realizadas al trabajo.

A la M. en C. Selene María Abad Rosales por el apoyo en la realización del proceso histológico.

A la M. en C. Eugenia Martínez Rodríguez por realizar la determinación de la vitamina en las dietas y órganos de los peces por HPLC.

A la Biol. Rosa María Medina Guerrero por su apoyo en la detección de parásitos en los peces.

A la Biol. Blanca Teresa González Rodríguez por su ayuda en la realización de análisis bromatológicos.

A la Biol. Virginia Patricia Domínguez Jiménez por su apoyo en laboratorio.

Al Lic. Jorge Alberto Durán Niebla, por su apoyo técnico en el centro de cómputo.

A Jesús en la construcción del sistema experimental.

A Don Manuel, Don Juan, Pedro y a los chavos de la planta de alimentos por su ayuda en las biometrías.

A mis compañeros y amigos del CIAD: Tere, Jary, Sarahí, Chío Linda, Elda, Susana, Alan, Efren, Martín, Oscar y Carlos por todos los momentos que pasamos.

Y a todos los que me ayudaron en algún momento durante toda la Maestría

DEDICATORIA

A mi padre:

La vida no permitió que estuvieras conmigo, pero sé que estarías orgulloso de mí, para ti con todo mi amor.

A mi madre:

Gracias por el amor, apoyo y confianza, por impulsarme a seguir adelante, sin ti no estaría donde estoy.

A mis hermanos:

Por creer en mí y apoyarme, ustedes pueden lograr lo que quieran.

Gracias, con amor

CONTENIDO

| | |
|--|------|
| DECLARACIÓN DE LA INSTITUCIÓN..... | II |
| CARTA DE APROBACIÓN..... | III |
| AGRADECIMIENTOS..... | V |
| DEDICATORIA..... | VII |
| LISTA DE TABLAS..... | X |
| LISTA DE FIGURAS..... | XI |
| RESÚMEN..... | XIII |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 5 |
| 2.1. Generalidades del género <i>Lutjanus</i> | 5 |
| 2.2. Ácido pantoténico..... | 6 |
| 2.3. Signos de deficiencia de pantotenato..... | 9 |
| 2.4. Requerimiento de pantotenato de calcio en peces de agua dulce..... | 10 |
| 2.5. Requerimiento de pantotenato de calcio en peces marinos..... | 12 |
| 2.6 Hematología como herramienta para determinación de deficiencias..... | 13 |
| 2.7 Cantidades de pantotenato de calcio en premezclas de vitaminas para peces..... | 14 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 16 |
| 4. OBJETIVOS..... | 17 |
| 4.1. Objetivo General..... | 17 |
| 4.2. Objetivos particulares..... | 17 |

| | |
|--|----|
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 18 |
| 5.1. Periodo experimental..... | 18 |
| 5.2. Dieta experimental..... | 18 |
| 5.3. Determinación de pantotenato de calcio..... | 21 |
| 5.4. Sistema experimental..... | 21 |
| 5.5. Organismos experimentales..... | 22 |
| 5.6. Variables de respuesta..... | 23 |
| 5.7. Análisis histológico..... | 25 |
| 5.8 Parámetros sanguíneos..... | 26 |
| 5.9 Análisis estadístico..... | 29 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 30 |
| 6.1 Determinación de la composición proximal y concentración de pantotenato de calcio en las dietas experimentales..... | 30 |
| 6.2. Contenido de lípidos en juveniles de <i>L. guttatus</i> experimentales..... | 31 |
| 6.3. Crecimiento y eficiencia alimenticia..... | 33 |
| 6.4 Supervivencia..... | 35 |
| 6.5 Requerimiento de pantotenato de calcio para juveniles de <i>L. guttatus</i> | 36 |
| 6.6 Determinación de la concentración de Pantotenato de calcio en hígados y branquias de los pargos experimentales..... | 39 |
| 6.7 Signos clínicos externos..... | 40 |
| 6.8 Análisis histológico..... | 42 |
| 6.9 Análisis hematológico..... | 45 |
| 7. CONCLUSIONES..... | 48 |

| | |
|---------------------------|----|
| 8. RECOMENDACIONES..... | 49 |
| 9. LITERATURA CITADA..... | 50 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Signos representativos por deficiencia de d-pantotenato en varias especies..... | 9 |
| Tabla 2. Cantidades de d-pantotenato de calcio utilizado en premezclas vitamínicas en alimentación de diferentes especies de peces..... | 15 |
| Tabla 3. Dieta basal para determinación de requerimiento y signos de deficiencia de pantotenato de calcio en juveniles de <i>Lutjanus guttatus</i> | 19 |
| Tabla 4. Composición proximal y concentración final de d-pantotenato de calcio en las dietas experimentales..... | 31 |
| Tabla 5. . Crecimiento y eficiencia alimenticia de juveniles de <i>L. guttatus</i> alimentados con diferentes cantidades de d- pantotenato de calcio..... | 35 |
| Tabla 6. Requerimiento de d-pantotenato de calcio (mg/Kg de dieta) para un óptimo crecimiento de diferentes especies de peces..... | 38 |
| Tabla 7. Parámetros hematológicos de juveniles de <i>L. guttatus</i> alimentados con diferentes niveles de d-pantotenato de calcio..... | 45 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Conformación química del ácido pantoténico..... | 6 |
| Figura 2. Vías metabólicas en donde es esencial la CoA y acarreadores de acil proteína. Los compuestos en los recuadros requieren coenzimas de pantotenato para su síntesis..... | 7 |
| Figura 3. Biosíntesis de CoA a partir de pantotenato..... | 8 |
| Figura 4. Proceso de elaboración de las dietas experimentales..... | 20 |
| Figura 5. Sistema experimental utilizado para realizar el bioensayo..... | 22 |
| Figura 6. Ejemplar experimental de pargo flamenco (<i>L. guttatus</i>)..... | 23 |
| Figura 7. Toma de sangre de vena caudal de los peces experimentales..... | 27 |
| Figura 8. Relación entre la cantidad de pantotenato en las dietas con el contenido de lípidos en juveniles de <i>L. guttatus</i> | 32 |
| Figura 9. Efecto de d-pantotenato de calcio en el crecimiento de juveniles de <i>Lutjanus guttatus</i> durante 18 semanas de tratamiento..... | 33 |
| Figura 10. Supervivencia de juveniles de <i>L. guttatus</i> alimentados con diferentes niveles de d-pantotenato de calcio..... | 36 |
| Figura 11. Requerimiento nutricional para juveniles de <i>L. guttatus</i> | 37 |
| Figura 12. Concentración de pantotenato en hígados y branquias de juveniles de <i>L. guttatus</i> alimentados con diferentes cantidades de pantotenato de calcio. | 39 |
| Figura 13. Pargo flamenco con color, escamas, piel y aletas normales..... | 41 |
| Figura 14. Signos de deficiencia externos en juveniles de <i>L. guttatus</i> . Hemorragias en cuerpo, erosión de aleta caudal, coloración clara..... | 42 |
| Figura 15. Branquia de peces iniciales en donde no se observan alteraciones patológicas ni parásitos..... | 43 |

Figura 16. Corte sagital de lamela primaria de organismos de la dieta D40 en donde se observa hiperplasia, fusión de lamelas secundarias, infiltración de células inflamatorias, aumento de células de moco y edema del epitelio. H&E. 100 μ 43

Figura 17. Corte sagital de varias lamelas primarias de pargos alimentados con la dieta D40 en donde se observa clara atrofia de lamelas secundarias hasta la completa desaparición de las mismas. 100 μ 44

RESÚMEN

El pantotenato de calcio es una vitamina hidrosoluble y actúa como cofactor de la coenzima A, importante como transportador de grupos acilos en las reacciones enzimáticas implicadas en la oxidación y síntesis de ácidos grasos, carbohidratos y proteínas. Cuando existe una deficiencia nutricional de pantotenato de calcio en peces, estos presentan signos clínicos como hiperplasia lamelar, depósitos de glicógeno o grasa en hígado o riñones, los cuales conducen a un bajo crecimiento y la muerte. Se determinó el efecto que tiene la deficiencia del pantotenato de calcio en crecimiento, signos de deficiencia histopatológicos, conteo celular y química sanguínea en peces de pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*), así como el requerimiento de esta vitamina para la especie. Se evaluaron siete dietas isoproteicas suplementadas con diferentes niveles de pantotenato de calcio (2.57, 31.97, 47.91, 63.79, 76.83, 103.15 y 121.91mg/Kg) y fueron suministradas a juveniles de *L. guttatus* (10.2 ± 1.4 g) por 18 semanas a saciedad aparente en un sistema de circulación de flujo abierto de 21 tanques de fibra de vidrio de 300 L con aireación y flujo constante. Los signos de deficiencia externos en los peces del tratamiento de la dieta deficiente (2.57 mg.kg¹) fueron descamación, hemorragias en cuerpo y aletas, erosión de aletas, susceptibilidad a parasitismo y mortalidad. No hubo un efecto en los tejidos y parámetros hematológicos en los peces alimentados con los diferentes tratamientos, el requerimiento se determinó en 45.5 mg.kg¹ con respecto al mayor peso ganado. Para este estudio se concluyó que con 45.5 mg.kg¹ para pargos de esta edad se obtiene el mayor crecimiento y supervivencia.

Palabras clave: Pantotenato de calcio, deficiencias nutricionales, *Lutjanus guttatus*.

1. INTRODUCCIÓN

El pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*) (Steindachner, 1869) es una especie de pez marino que se distribuye naturalmente desde México hasta Perú. Es demersal, habita en arrecifes costeros y en etapa juvenil vive en estuarios y bocas de ríos (Allen, 1985). *L. guttatus* tiene una gran importancia comercial y alcanza altos precios por la calidad de su carne (Alvarez-Lajonchere, 2006; FAO, 2006), por lo que en los últimos años en la Unidad Mazatlán del CIAD, se han realizado avances para su cultivo referentes a la maduración sexual y reproducción en cautiverio (Arellano-Martínez *et al.*, 2001; Álvarez, 2006; Ibarra y Duncan, 2007; Ibarra y Álvarez, 2009).

En forma paralela a lograr su reproducción, es necesario realizar investigaciones para establecer sus requerimientos nutricionales (proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales) y elaborar dietas de calidad en cada etapa de la vida, con el fin de lograr el óptimo crecimiento, salud y supervivencia. En la actualidad se ha determinado el protocolo de alimentación larval de *L. guttatus* con alimento vivo, incluyendo microalgas (*Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis* T-ISO), rotíferos (*Brachionus rotundiformis*), nauplios, metanauplios de *Artemia* y copépodos (*Tisbe monozota* y *Pseudodiaptomus euryhalinus*) (García-Ortega *et al.*, 2005) hasta su destete. Por otra parte, son pocos los estudios en aspectos nutricionales relacionados con el crecimiento de juveniles de esta especie. Abdo *et al.* (2010) determinaron el requerimiento de proteína y lípidos en juveniles de *L. guttatus* de 2.2 g de peso. Evaluaron nueve dietas alimenticias con diferentes niveles de proteína (40, 45 y 50%) y lípidos (9, 12 y 15%). Obtuvieron mejor crecimiento y tasa de conversión alimenticia con los niveles de 45 y 50% de proteína y no hubo diferencias entre 9 y 15% de lípidos.

Hernández *et al.* (2010) determinaron el coeficiente de digestibilidad aparente de proteína cruda de siete ingredientes proteicos: harina de pescado, harina de canola, harina de carne y hueso, subproductos del atún, alimento para cerdos, subproductos de

harina de ave y harina de soya, con el método indirecto de óxido de cromo como indicador. Los resultados obtenidos indicaron que *L. guttatus* es capaz de digerir eficazmente los ingredientes vegetales y animales y se pueden utilizar en la elaboración de alimento para esta especie obteniendo buena eficiencia alimenticia, sin embargo, la harina de ave presentó mayor digestibilidad, sugiriendo ser una buena fuente alterna de proteína para el pargo flamenco.

Aparte de los macronutrientes, las vitaminas juegan un papel muy importante en el funcionamiento de los organismos, ya que actúan como cofactores o sustratos en reacciones metabólicas. Al cubrir sus requerimientos, se logra un buen crecimiento, se reduce la susceptibilidad a adquirir enfermedades nutricionales o por algún agente patógeno y se evita una serie de trastornos metabólicos y fisiológicos (Shepherd y Bromage, 1992; De Silva y Anderson, 1995).

Las vitaminas se clasifican en dos grandes grupos, las hidrosolubles y las liposolubles. Las vitaminas liposolubles (A, D, E y K) son poco alterables y se almacenan en las reservas lipídicas corporales (Tacon, 1989; Lehninger, 1993). Las vitaminas hidrosolubles presentan menor estabilidad ante la presencia de luz, calor y agua y pueden perderse fácilmente durante la elaboración del alimento, almacenaje y/o alimentación de los organismos acuáticos, por lo que han adquirido mayor importancia en la nutrición de peces. Una de las funciones principales de las 11 vitaminas hidrosolubles es su función coenzimática o como factores de crecimiento (Lehninger, 1993)

De las hidrosolubles, la vitamina C, es la más estudiada en nutrición de peces ya que se han realizado varios trabajos para determinar el requerimiento, signos de deficiencia, respuesta al estrés y a enfermedades entre otros factores, en varias especies como *Oncorhynchus mykiss*, *Sparus aurata*, *Sciaenops ocellatus*, *Cyprinus carpio*, *Sebastes schlegeli*, *Epinephelus malabaricus* y *Takifugu rubripes* (Miyasaki *et al.*, 1993; Blom y Dabrowski, 1996; Alexis *et al.*, 1997; Henrique *et al.*, 1998; Aguirre y Gatlin, 1999; Montero *et al.*, 1999; Dabrowski, 2000; Wang *et al.*, 2003; Lin y Shiau, 2005 y Eo y Lee, 2008).

Para la especie *L. guttatus*, solamente se ha determinado el requerimiento nutricional de vitamina C. Osuna-Durán (2009) observó que en juveniles de 8.0 ± 1.85 g de peso inicial es necesario adicionar a la dieta 47 mg/kg de L-ascorbil-2-polifosfato (LA2PP), para obtener un mejor crecimiento y evitar la presencia de enfermedades como: La erosión de aletas, el oscurecimiento de la piel, la descamación y las alteraciones histológicas en branquias o en otros órganos como: hígado, riñón y cerebro.

Una de las vitaminas menos estudiadas es el ácido pantoténico. El cual pertenece al grupo de las vitaminas B, es hidrosoluble y se requiere como cofactor-para enzimas esenciales en el funcionamiento celular y producción de energía (Depeint *et al.*, 2006). Es importante para la síntesis de la coenzima A (CoA), por lo que la deficiencia de ésta vitamina puede ser letal para el organismo.

Se han reportado un amplio rango de signos de deficiencias de ácido pantoténico en animales y peces, como es la reducción en crecimiento, baja ingesta de alimento y eficiencia alimenticia, deshidratación, lesiones en la piel, desordenes del sistema nervioso, sistema gastrointestinal, sistema inmunológico, sistema reproductivo, entre otros, que pueden llevar hasta la muerte (Mclaran *et al.*, 1947; Phillips and Brockway, 1957; Ogino, 1967; Halver, 1972; Wilson *et al.*, 1983; Soliman y Wilson, 1992; Masumoto *et al.*, 1993; Smith y Song, 1996, Boonyaratpalin, 1997; Davis *et al.*, 1998; Wen *et al.*, 2009 y Wen *et al.*, 2010).

En general, los estudios recientes se han enfocado especialmente a las especies dulceacuícolas de agua dulce más comerciales como carpas y bagres y algunas especies marinas como los salmónidos, determinando el requerimiento que va desde los 10 a 80 mg.kg^{-1} . Aunque la mayoría de los trabajos reportan principalmente patologías en las lamelas de los peces, también se ha encontrado que la deficiencia de pantotenato de calcio puede provocar acumulación de glicógeno y grasa en hígado, páncreas y bazo, reportado así para *Cichlasoma urophthalmus* (Chávez de Martínez *et al.*, 1990).

Referente a los trabajos realizados en otras especies de peces marinos, no se tienen reportes que indiquen las cantidades reales requeridas para que los organismos no presenten patologías, solamente se encontraron los trabajos realizados en *Epinephelus*

malabaricus y *Lates calcarifer* con un requerimiento mínimo de 11 y 15 mg.kg⁻¹ de pantotenato de calcio en la dieta, respectivamente. Ante la deficiencia de la vitamina, se presentaron los mismos signos patológicos característicos que en los peces de agua dulce (Yu-Hung *et al.*, 2011; Boonyaratpalin *et al.*, 1993).

El presente estudio se enfocó en determinar el requerimiento de pantotenato de calcio en *Lutjanus guttatus*, así como las posibles patologías asociadas por su deficiencia.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del género *Lutjanus*

El género *Lutjanus* está integrado por 65 especies. Son depredadores y en su hábitat se alimentan principalmente de crustáceos y peces (Anderson, 1987; Allen, 1995). Las especies de la familia Lutjanidae forman parte de las pesquerías más importantes en el Pacífico central mexicano (Cruz-Romero *et al.*, 1996).

El pargo flamenco, *L. guttatus*, es una especie demersal, habita en arrecifes costeros, hasta unos 30 m de profundidad. Pueden encontrarse en pequeños grupos o grandes cardúmenes. Para esta especie se reportan dos temporadas de desove en presencia de temperaturas altas que van de julio a noviembre y de febrero a abril (Cruz-Romero *et al.*, 1988; Rojas, 1997).

Debido a la importancia comercial y a la alta demanda en el mercado, en los últimos años se han desarrollado tecnologías para el cultivo del pargo flamenco. En cautiverio se ha tenido éxito en la producción de larvas y juveniles, dando oportunidad de realizar varios estudios en los diferentes estadios de vida. Estos estudios se han enfocado a la maduración sexual y a la reproducción, a los requerimientos nutricionales de proteínas y lípidos en larvas y juveniles, digestibilidad de ingredientes proteicos para formulación de dietas alimenticias para reproducción, crecimiento y mantenimiento. Así como las principales enfermedades que afectan el cultivo de este organismo (García-Ortega *et al.*, 2005; Álvarez-Lajonchere *et al.*, 2007; Ibarra-castro y Duncan, 2007; García-Ortega, 2007; Hernández-Mendoza, 2007; Abdo de la Parra *et al* 2010a y b; Hernández *et al.*, 2010). Sin embargo, para elaborar las dietas que cubran todos los requerimientos de la especie y al mismo tiempo se reduzcan los costos de los mismos, es necesario realizar investigaciones de cada uno de los componentes nutricionales por separado.

2.2 Acido pantoténico

El ácido pantoténico fue identificado por primera vez por R. J. Williams en el año de 1933 como un factor de crecimiento que contenía azufre. Está formado por un hidroxí-acido complejo de ácido pantóico y la molécula beta-alanina acompañado por un grupo amino relacionado con el ácido carboxilo (Song, 1990; Almeida-Muradian, 2003) (Figura 1).

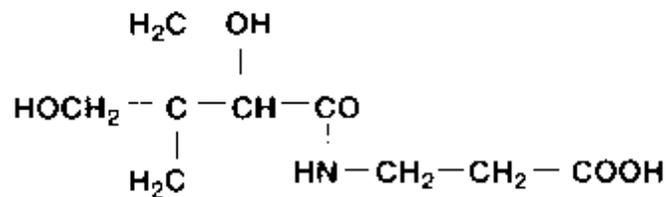


Figura 1. Conformación química del ácido pantoténico.

El ácido pantoténico es sintetizado por plantas y muchos microorganismos, pero se considera esencial en la dieta de vertebrados ya que éstos no son capaces de sintetizarlo. Está ampliamente distribuido en los alimentos, particularmente en los órganos de animales, yema de huevo, cacahuates, habas y en pequeñas cantidades en carne magra, leche, papas y vegetales. Se encuentra en todas las células de plantas y animales. Los niveles de esta vitamina, sin embargo, son bajos en alimentos altamente procesados como los granos refinados, carne o pescados con grasa (Depeint *et al.*, 2006).

El ácido pantoténico fue reconocido como factor de la coenzima A por Kaplan y Lipmann (1948). La función de la coenzima A es la de actuar como transportador de grupos acilos en las reacciones enzimáticas implicadas en la oxidación y síntesis de los ácidos grasos principalmente, así como de carbohidratos y proteínas. Interviene en cerca de 70 reacciones enzimáticas (Figura 2) (Lehninger, 1993).

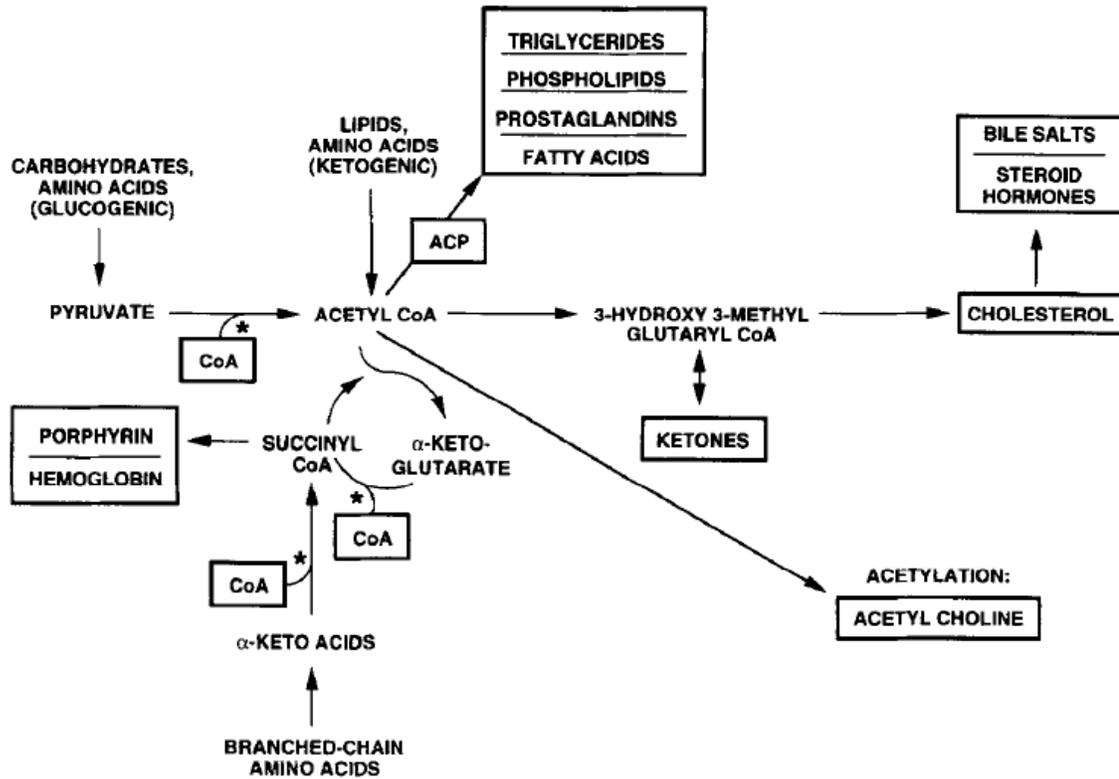


Figura 2. Vías metabólicas en donde es esencial la CoA y acarreadores de acil proteína. Los compuestos en los recuadros requieren coenzimas de pantotenato para su síntesis (Fuente: Smith y Song, 1996).

En alimentación de peces usualmente no se utiliza el ácido pantoténico sino su sal cálcica (pantotenato de calcio) y cuya forma biológicamente activa es el d-pantotenato de calcio. Éste presenta una buena estabilidad frente a la influencia del oxígeno del aire y la luz, aunque es sensible al calor. Durante la extrusión o peletización de alimentos para peces se han reportado pérdidas del 10% (Slinger *et al.*, 1979).

Debido a que la CoA no puede atravesar la membrana plasmática, la coenzima debe ser sintetizada en cada célula (Domschke *et al.*, 1971). D-pantotenato es convertido a CoA a través de cinco secuencias enzimáticas, que comienza con la fosforilación del pantotenato por la pantotenato quinasa y se requieren cisteína y cuatro ATPs (Brown, 1959; Abiko, 1975) (Figura 3).

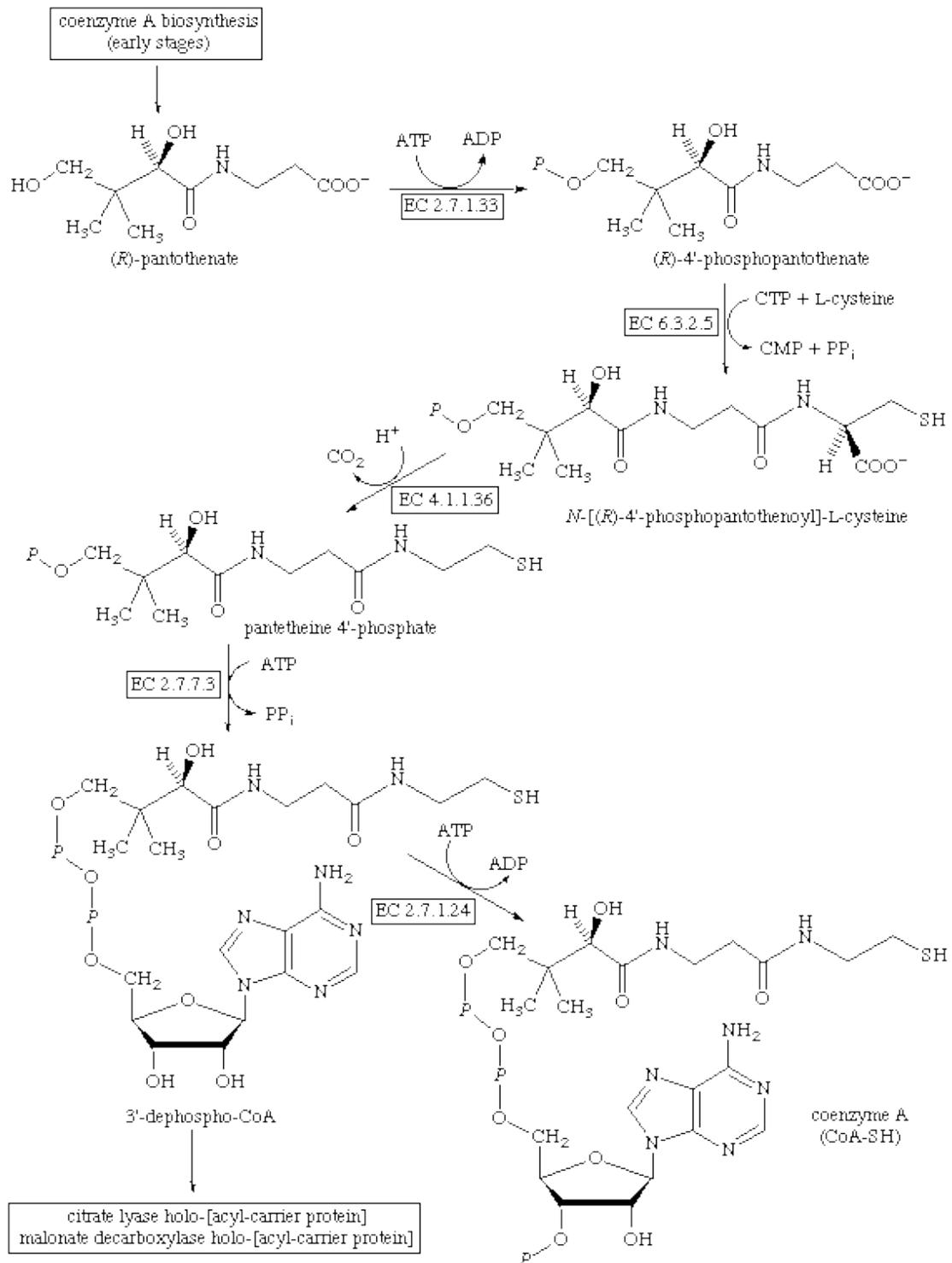


Figura 3. Biosíntesis de CoA a partir de pantotenato.

Fuente: Obtenido de <http://www.enzyme-database.org/reaction/misc/CoA2.html>

El pantotenato, pantoteina y CoA pueden ser utilizados como fuente de pantotenato. Los mecanismos de absorción, ingesta y excreción no difieren entre especies. A bajas concentraciones, el pantotenato es absorbido en el lumen por un mecanismo de transporte activo dependiente de sodio y a altas concentraciones es absorbido por simple difusión.

2.3 Signos de deficiencia de Pantotenato

En la tabla 1 se muestran los diferentes signos de deficiencia que provoca la ausencia del pantotenato de calcio en la dieta para diferentes organismos y éstas varían de acuerdo a la especie.

Tabla 1. Signos representativos por deficiencia de pantotenato de calcio en varias especies.

| Especie | Signos visibles | Anormalidades histopatológicas | Referencias |
|----------------|---|--|---|
| Humanos | Depresión, cambios de personalidad, susceptibilidad a infecciones, fatiga y disturbios del sueño. | Inestabilidad cardiaca, dolor abdominal, desórdenes neurológicos, debilidad muscular. | Hodges <i>et al.</i> , 1958; Fry <i>et al.</i> , 1976; Kaneda <i>et al.</i> , 1980; Nakahiro <i>et al.</i> , 1988; Noda <i>et al.</i> , 1988. |
| Pollos | Dermatitis en pico y párpados, plumas ásperas, crecimiento retardado, ataxia. | Involución del timo, vejiga gaseosa distendida, desmielinización de neuronas motoras, ulceraciones del duodeno. | Williams, 1948; Beer, 1963; Gries y Scott, 1972; Kratzer y Ram, 1974. |
| Cerdos | Pérdida de cabello, enrojecimiento de la piel, exceso de secreción nasal, cambios en lengua, diarrea. | Colitis aguda y pequeñas úlceras, inflamación en intestino largo, cromatolisis de ganglios, desmielinización de nervios periféricos. | Wintrobe <i>et al.</i> , 1943; Follis <i>et al.</i> , 1945; Swank 1948; Luecke <i>et al.</i> , 1949; Sharma <i>et al.</i> , 1952; Nelson, 1968; Gries y Scott, 1972; Noda <i>et al.</i> , 1988. |
| Ratas/ratón | Lesiones en piel, encanecimiento de cabello, calvicie, | Lesiones adrenales, reducción de lípidos, células | Morgan <i>et al.</i> , 1940; Lippincot, 1941; Sandza, 1941; Deane <i>et al.</i> , 1946; |

| | | | |
|-------|---|--|---|
| | enrojecimiento de bigotes, parálisis de patas traseras. | atrofiadas, muerte celular. | Ullrey <i>et al.</i> , 1955; Seronde, 1963; Hendrich, 1979; Chevaux <i>et al.</i> , 1994. |
| Peces | Fusión lamelar, proliferación de lesiones interlamelares, apatía. | Fusión de lamelas cubiertas con exudado, hígado graso, depósitos de glicógeno y cuerpos hialinos en riñón, mitocondrias agrupadas. | Murai <i>et al.</i> , 1979; Poston y Page, 1982; Wilson <i>et al.</i> , 1983 y Masumoto <i>et al.</i> , 1993. |

Fuente: Smith y Song, 1996.

2.4 Requerimientos de pantotenato de calcio en peces de agua dulce

El requerimiento de vitaminas depende, como en la mayoría de los organismos vivos, de la talla del pez, la madurez sexual, la tasa de crecimiento, las condiciones ambientales y la interacción de los nutrientes de la dieta (Wilson *et al.*, 1983). Los requerimientos se basan en el nivel mínimo que se necesita de vitamina para soportar el máximo crecimiento o máxima capacidad de almacenaje en tejidos y prevenir signos de deficiencia (Woodward, 1994; Boonyaratpalin, 1997). Basándose en los métodos para determinar requerimientos nutricionales, se han realizado varios estudios para evaluar los signos de deficiencia que provoca el pantotenato de calcio, así como el requerimiento en la dieta en peces de agua dulce, como los que se mencionan a continuación:

Wilson *et al.* (1983) detectaron lesiones en branquias en juveniles de bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), las cuales empezaron reducirse a las dos semanas de alimentación con dietas suplementadas con 15 mg de pantotenato de calcio por kg de dieta, observando máximo crecimiento y eficiencia alimenticia. También establecieron una alta correlación entre la susceptibilidad a enfermedades y los niveles de d-pantotenato de calcio en las dietas, concluyendo que el requerimiento depende de diversos factores como, la talla del pez, la edad, la densidad de cultivo, la temperatura, la disponibilidad

de oxígeno, etc. Para juveniles de 145-155g de esta especie, recomiendan incluir para la formulación de dietas alimenticias, 30 mg.kg⁻¹ de alimento de la vitamina.

Además de los daños ya mencionados en las lamelas de los peces también se han reportado lesiones como necrosis en páncreas y depósito de glicógeno en células hepáticas, así como ceroidosis en hígado y bazo en juveniles de *Cichlasoma urophthalmus* alimentados con niveles bajos de pantotenato de calcio (0, 10, 20, 40 y 60 mg.kg⁻¹) mientras que los peces con las dietas altas (80, 120 y 320 mg.kg⁻¹) no mostraron signos de deficiencia, por lo que se recomendó para obtener un máximo crecimiento y buen desarrollo, incluir para juveniles de 16-17.5 g de ésta especie, 80 mg.kg⁻¹ de suplemento de la vitamina en su dieta (Chávez de Martínez *et al.*, 1990).

Soliman y Wilson (1992) evaluaron cinco niveles de d-pantotenato (0, 5, 10, 20 y 40 mg.kg⁻¹) en juveniles de tilapia (*Oreochromis aureus*) de 0.71 a 15 g. Determinaron el requerimiento en 10 mg.kg⁻¹ de dieta para esta especie. Observaron signos de deficiencia como hemorragia, letargia, alta mortalidad, anemia y severa hiperplasia de las células epiteliales de las lamelas branquiales.

Masumoto *et al.* (1993) probaron dietas con y sin suplementación de d-pantotenato de calcio en trucha arco iris de 150g de peso. Hubo reducción en ingesta del alimento en los peces alimentados sin la vitamina. Los peces deficientes presentaron anorexia y letargia a las 25 semanas de las 28 que duró el experimento y lamelas fusionadas conforme a los niveles de deficiencia. Determinaron la concentración de ácido pantoténico en branquias, corazón, hígado y eritrocitos por una técnica de radioinmunoensayo (RIA). La concentración en branquias y corazón fue significativamente menor en peces alimentados con dietas deficientes a partir de la cuarta semana. La concentración en el hígado fue significativamente diferente a las 16 semanas, en comparación a las dietas suplementadas

Se estudió el efecto del ácido pantoténico en el crecimiento, la composición proximal y la actividad enzimática en carpas (*Cyprinus carpio* var. Jian). Siete niveles de d-pantotenato (4.0, 15.5, 25.6, 36.1 45.9, 56.1 y 65.9 mg.kg⁻¹) fueron suministrados a los peces. Los alimentados con 4.0 mg.kg⁻¹ presentaron significativamente la menor

eficiencia alimenticia ($P < 0.05$). El contenido de proteína en los peces fue directamente proporcional con el contenido de la vitamina en la dieta. La actividad enzimática de α -amilasa, lipasa, tripsina, Na^+ , K^+ , ATPasa, fosfatasa alcalina y gama glutamil transpeptidasa, fueron todos afectados positivamente con los diferentes niveles de d-pantotenato. Se estimó por medio de un análisis de punto de quiebre, el requerimiento de pantotenato de calcio en la dieta para juveniles de *C. carpio* de 13 g de peso, en $23.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Wen *et al.*, 2009).

2.5 Requerimiento de pantotenato de calcio en peces marinos

Los primeros reportes que se tienen de la evaluación del efecto de pantotenato en peces marinos es en *Salmo gairdneri* por Tunison *et al.* (1944) y Mclaran *et al.* (1947), quienes reportan la hiperplasia lamelar como el principal signo de deficiencia de pantotenato en los peces. De igual forma Karges y Woodward (1983) alimentaron con una dieta deficiente y otra suplementada (40 mg/Kg), por 28 días a juveniles de *S. gairdneri* de 0.7 g, la hiperplasia lamelar fue detectada en las branquias al día 12, y la reducción de ingesta de alimento al día 16, determinando que la hiperplasia lamelar es un indicador sensible de la deficiencia de pantotenato, y que esta lesión es específica por los patrones histológicos de proliferación desde la punta de las lamelas hacia la base, caso contrario cuando se presenta hiperplasia lamelar por enfermedades no nutricionales.

En estudios recientes, solamente se encontraron dos trabajos disponibles sobre el requerimiento y signos de deficiencia del pantotenato de calcio. El primero se realizó en juveniles de 2.7g de *Lates calcarifer*. Los peces fueron alimentados con dietas semipurificadas con 0, 15, 30, 60 y $90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ por 12 semanas. Los resultados mostraron que en los peces sin la vitamina se detuvo el crecimiento después de las dos semanas y la mortalidad total ocurrió en seis semanas. El requerimiento para ácido pantoténico fue de $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ para el crecimiento normal, eficiencia alimenticia y supervivencia, los signos de deficiencia fueron poco apetito, bajo crecimiento, baja eficiencia alimenticia, alta mortalidad, hemorragias y lamelas fusionadas (Boonyaratpalin *et al.*, 1993).

El segundo trabajo se realizó recientemente en la especie *Epinephelus malabaricus*; en juveniles de 15.3g se evaluaron ocho dietas con niveles crecientes de d-pantotenato de calcio (0, 5, 10, 20, 40, 60 100 y 120 mg.kg⁻¹ de dieta). Los peces alimentados sin la inclusión de la vitamina presentaron daños en branquias, anemia, altas mortalidades, anorexia, inactividad y bajo crecimiento, el requerimiento se determinó en 11 mg.kg⁻¹ (Yu-Hung *et al.*, 2011).

2.6 Hematología como herramienta para determinación de deficiencias nutricionales.

La mayoría de los estudios que se realizan sobre requerimientos nutricionales, utilizan parámetros de crecimiento y técnicas histológicas para determinar los signos de deficiencia, aunque es bien conocido que los parámetros hematológicos también son eficaces para diagnosticar patologías en los peces. La fisiología de la sangre frecuentemente es considerada como un índice esencial para saber el estado de salud de numerosas especies de peces (Mohammed y Sambo, 2007) y las alteraciones en los parámetros hematológicos son indicadores de la calidad de la dieta (Klinger *et al.*, 1996; Buentello y Gatlin, 2000; Mohammed y Sambo, 2007). Un parámetro sanguíneo comúnmente utilizado para determinar el estado de salud de los peces, es el hematocrito, este parámetro representa el porcentaje ocupado por los glóbulos rojos del volumen total de la sangre. La concentración de la hemoglobina y el recuento celular de los eritrocitos son parámetros que pueden ser usados para determinar anemia (Barrows *et al.*, 2008). Por este motivo los análisis hematológicos son utilizados en diversos trabajos como herramienta para determinar el efecto de las deficiencias de vitaminas en la dieta.

En este sentido, Wen *et al.* (2010) realizaron un estudio con *Cyprinus carpio* donde determinaron el efecto que tiene el ácido pantoténico (AP) en la resistencia a enfermedades, se probaron diferentes niveles de la vitamina en el alimento (4.0, 15.5, 25.6, 36.1, 45.9 56.1 y 69.5 mg.kg⁻¹), obteniendo un incremento significativo en el recuento celular en los organismos alimentados con las dietas hasta 25.6 mg.kg⁻¹. Como conclusión indican que el recuento de leucocitos fue significativamente afectado por los niveles de AP en la dieta y-mencionan que los leucocitos juegan un papel importante en

la respuesta inmune de los peces, al observarse un aumento en el recuento de glóbulos blancos y rojos.

Yu-Hung *et al.* (2011) determinaron el efecto del pantotenato de calcio sobre parámetros hematológicos como el recuento de células rojas, la concentración de la hemoglobina y el porcentaje de hematocrito en juveniles de *Epinephelus malabaricus*, encontrando que peces alimentados con cantidades por debajo de 5 mg.kg^{-1} de pantotenato de calcio en la dieta presentan valores bajos en el recuento de células rojas, el hematocrito y la concentración de hemoglobina, a diferencia de los peces alimentados con cantidades altas de la vitamina (10, 20, 40, 60, 100 y 120 mg.kg^{-1}), lo cual indica que con cantidades mayores a 10 mg.kg^{-1} los peces muestran mejor estado de salud, ratificándolo con mejores valores de crecimiento, supervivencia y ausencia de signos clínicos de deficiencia por esta vitamina.

2.7 Cantidades de pantotenato de calcio en premezclas de vitaminas para peces.

Cuando se desconocen los requerimientos nutricionales de las vitaminas y/o de otros nutrientes, las dietas se elaboran basándose en las recomendaciones sugeridas por Tacon (1987) o en los requerimientos de otras especies y se adicionan cantidades mayores con el fin de prevenir deficiencias. Lo anterior puede ocasionar además de mayores costos, la posible toxicidad en el caso de vitaminas liposolubles. En el caso de las vitaminas solubles en el agua, como lo es el pantotenato de calcio, el exceso de éstas, se elimina por la orina y solamente ocasiona altos costos. En la Tabla 2 se muestran las inclusiones de pantotenato de calcio en diferentes especies.

Tabla 2. Cantidades de d-pantotenato de calcio utilizado en premezclas vitamínicas en la dieta de diferentes especies de peces.

| Especie | Cantidad (mg.kg ⁻¹) | Fuente |
|--|---------------------------------|---|
| Trucha arcoíris (<i>Salmo gairdneri</i>) | 105.8 | Reinitz, 1980 |
| Salmon Chinook (<i>O. tshawytscha</i>) | 112.4 | Orme, 1978 y Kelota, 1978 |
| Peces marinos carnívoros | 60 | Tacon, 1987 |
| Pargo flamenco (<i>L. guttatus</i>) | 60 | Hernández 2011, CIAD |
| Cobia (<i>Rachycentron canadum</i>) | 60 | Xiao <i>et al.</i> , 2009; Mai <i>et al.</i> , 2009 |
| Dorada (<i>Spaurus aurata</i>) | 65 | Fernández <i>et al.</i> , 1998 |
| Jurel (<i>Seriola durmerili</i>) | 14 | Shimeno <i>et al.</i> , 1992 |

Como se puede observar en la Tabla 2. Las cantidades utilizadas en las premezclas para especies marinas en su mayoría es de 60 mg.kg⁻¹, y con base en las cantidades de d-pantotenato en las premezclas vitamínicas y los valores de requerimiento de las especies estudiadas, en el presente trabajo se sugiere que el requerimiento para juveniles de *L. guttatus* será menor a 60 mg.kg⁻¹.

3. HIPÓTESIS

Si el requerimiento de *Lutjanus guttatus* por pantotenato de calcio es de alrededor de 60 mg.kg⁻¹ de dieta, entonces valores inferiores a ese causarán deficiencias y se observarán signos clínicos en juveniles de esta especie.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Establecer el requerimiento nutricional de pantotenato de calcio y los efectos que provocan su deficiencia en juveniles de cautiverio de pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*).

4.2 Objetivos Particulares

- Definir el requerimiento de pantotenato de calcio para obtener un óptimo crecimiento de juveniles de *L. guttatus*.
- Identificar los efectos histopatológicos en juveniles de *L. guttatus* ocasionados por la deficiencia nutricional de pantotenato de calcio.
- Evaluar la prevalencia (P) de síntomas externos característicos de la deficiencia de pantotenato de calcio. Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de pantotenato de calcio en diversos parámetros sanguíneos del pargo flamenco.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Periodo experimental

El presente estudio se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Unidad Mazatlán. Durante el periodo de abril a septiembre del año 2011.

5.2 Dieta experimental

Las dietas experimentales se elaboraron con base en una dieta basal para proporcionar 50% de proteína y 15% de lípidos (Tabla 3). La inclusión de d-pantotenato de calcio fue a diferentes porcentajes (0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 mg.kg^{-1}). Se utilizó d-pantotenato de calcio 98% (Con un 92% de ácido pantoténico) proporcionada por Trouw Nutrition México, S.A. de C.V. Se suministró un 10% adicional de esta vitamina por la probable pérdida durante el proceso de elaboración de las dietas experimentales (Slinger *et al.*, 1979 en Tacón 1985). La cantidad de d-pantotenato de calcio fue restado del almidón para contar con el 100% (de acuerdo al tratamiento) en todas las dietas.

Las diferentes dietas se identificaron como D0, D20, D40, D60, D80, D100 y D120 de acuerdo a los diferentes niveles de inclusión de la vitamina, 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 mg.kg^{-1} , respectivamente.

Tabla 3. Dieta basal para la determinación del requerimiento y signos de deficiencia de Pantotenato de calcio en juveniles de *Lutjanus guttatus*.

| Ingredientes | % |
|----------------------|-------|
| H. Pescado | 57.25 |
| H. Soya | 6.35 |
| H. Krill | 2.20 |
| H. Calamar | 4.06 |
| Aceite de pescado | 2.45 |
| Aceite de soya | 7.09 |
| Almidón | 14.56 |
| Premezcla mineral** | 0.23 |
| Premezcla vitaminas* | 0.60 |
| Vitamina C | 0.20 |
| Alginato | 3.0 |
| Carotenoides | 0.50 |
| Lecitina de soya | 1.50 |

*Vitaminas: Riboflavina 8.75 mg/Kg; ácido Pantoténico 22.22 mg/Kg; Niacina 10 mg/Kg; Vitamina B12 1 mg/Kg; Colina 1538.46 mg/Kg; Biotina 10 mg/Kg; tiamina 1.08 mg/Kg; piridoxina 7.31 mg/Kg; Inositol 153.84; Ac. Fólico 4.08 mg/Kg; Vitamina C 0 mg/Kg; Vitamina A 0.75 mg/Kg; Vitamina E 30 mg/Kg; Vitamina D 0.06 mg/Kg; Vitamina K 16.5 mg/Kg. **Minerales; Cobre 12 mg/Kg; Yodo 11 mg/Kg; Hierro 375 mg/Kg; Magnesio 20.96 mg/Kg; Zinc 41.66 mg/Kg; Selenio 30 mg/Kg. Fuente de vitaminas y minerales proporcionados por: Trouw Nutrition México, S.A. de C.V.

Los ingredientes utilizados como fuente de proteína (harina de pescado, soya, calamar y krill) se molieron para obtener una textura fina en un molino de martillo marca Micrón. Las harinas fueron mezcladas con los demás ingredientes en una batidora Kitchen Aid con capacidad de 5L hasta obtener una mezcla homogénea, adicionándole los micronutrientes (vitaminas y minerales), previamente mezclados por separado con el almidón. Cabe señalar que la pre-mezcla de vitaminas no contenía pantotenato de calcio. Finalmente los aceites y agua suficiente se añadieron para lograr la compactación de la pasta, la cual se pasó por un molino de carne Torrey para obtener los pellets que se deshidrataron en un desecador de aire forzado a 40°C durante 12 h. Las dietas se trituraron y tamizaron a un tamaño de 3.5 mm para alimentar a los juveniles de *L.*

guttatus (Figura 4). Las dietas se etiquetaron y almacenaron en bolsas en refrigeración a -4°C , para evitar la presencia de patógenos y degradación de los nutrientes hasta su posterior uso.



Figura 4. Proceso de elaboración de las dietas experimentales: a) mezcla de ingredientes, b) pasta compacta de ingredientes, c) elaboración de pelets, d) pelets sin secar, e) secado del alimento y f) alimento terminado.

A las dietas se les realizó un análisis proximal por procedimientos estándar según la AOAC de 1984, para determinar la composición exacta de proteínas, lípidos, cenizas y humedad.

La humedad y la ceniza se determinó por diferencia de peso, después de secar las muestras en una estufa a 105°C durante 24 hrs para humedad y para cenizas en una mufla a 450°C por 12 horas. La proteína se determinó utilizando el equipo LECO FP-520 por el método de combustión y los lípidos con el equipo MicroSoxhlet por extracción con éter de petróleo.

5.3. Determinación de pantotenato de calcio

El contenido del pantotenato de calcio se determinó en cada dieta experimental por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) mediante el método modificado de Romer *et al.*, 1996 y Wang *et al.*, 2004.

Se utilizó un cromatógrafo líquido modelo HP Hewlett Packard 1050 con un detector ultravioleta visible (UV-Vis); se utilizó una columna Zorbax Sb C8 (4.6 X 150 mm X 5 micron). La elución fue isocrática con una fase móvil compuesta de fosfato de sodio 0.25 M, Metanol (88:12) con un pH de 2.5 y un flujo de 0.6 ml/min. La temperatura de la columna de 38°C y la detección se realizó a una longitud de onda de 197 nm.

Para la extracción del pantotenato de calcio de las dietas experimentales, se mezclaron 2 g de alimento con 10 ml de agua HPLC a 40 °C, se agitó en un baño de ultrasonido por 30 minutos y se enfrió a temperatura ambiente. A 5 ml de la alícuota se le agregaron 0.5 ml de ácido acético al 10 % y 0.5 ml de acetato de sodio 1M, la mezcla se dejó reposar 5 min y se centrifugó a 10000 rpm g x 10 min. A 1 ml de sobrenadante se le agregó 1 ml de mezcla de cloroformo:metanol (1:1) para eliminar la grasa, se centrifugó 10 min a 10,000 rpm, se tomaron 0.2 ml del sobrenadante y se aforó a 1 ml con fase móvil, se filtró en filtro de membrana de 0.2 micras y se inyectaron 25 µl en el HPLC.

La estandarización se realizó con concentraciones de 0, 0.1, 0.25, 1, 5, 10, 15 y 20 µg/ml.

5.4 Sistema experimental

Se utilizó un sistema de circulación abierto con flujo de agua continuo de agua marina, compuesto por 21 tanques de fibra de vidrio de 300 L c/u, cada tanque se mantuvo con aireación y flujo de agua continuo. El agua marina se bombeó de la playa Las Brujas, la cual pasó por un filtro de arena, con cartuchos de 16 micrómetros y por un filtro UV para tratar de evitar la presencia de parásitos en el sistema y organismos (Figura 5). El fotoperiodo fue natural. Diariamente se sifonearon los tanques para evitar acumulación

de heces y alimento para no afectar la calidad del agua. También se midió el oxígeno y la temperatura del agua con un Oxímetro YSI 55-12FT y la salinidad con un refractómetro ATAGO S/Mill.



Figura 5. Sistema experimental utilizado para realizar el bioensayo.

5.5. Organismos experimentales

Los peces utilizados para el bioensayo se obtuvieron de la planta piloto para la producción de juveniles de peces marinos del Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo A. C., Unidad Mazatlán. En cada tanque se sembraron 15 juveniles de *L. guttatus*, con un peso promedio inicial de $10.2 \pm 1.4\text{g}$ a una densidad de 50 peces /m³ (Figura 6).



Figura 6. Ejemplar experimental de pargo flamenco (*L. guttatus*).

Los peces se aclimataron al sistema experimental 15 días, en los cuales se alimentaron con una dieta comercial para peces marinos. Al cabo de este tiempo se inició la alimentación solamente con las dietas experimentales, las cuales se proporcionaron de forma manual, a saciedad aparente tres veces al día (8 a.m., 12 p.m. y 4 p.m.). Se registró la cantidad de alimento consumido por tanque al día y los organismos se observaron para determinar posibles signos externos de deficiencia nutricional.

Se realizaron biometrías cada 15 días para evaluar el peso y longitud total de los peces, así como para detectar los signos de lesiones externas. Para ello, los peces se anestesiaron con 2-phenoxy-ethanol a una concentración de 0.3 ml/L de agua para evitar el mayor estrés posible, y antes de pesarlos se secaron con toallitas absorbentes. Los organismos se pesaron en una balanza (Mettler Toledo) y se midieron en un ictiómetro convencional (Aquatic Eco-Systems, Inc.).

5.6 Variables de respuesta

El efecto del pantotenato de calcio en las dietas se evaluó midiendo la respuesta en términos de crecimiento, supervivencia, eficiencia alimenticia, señales clínicas de deficiencia, parámetros hematológicos, reservas de vitamina en hígado y branquias y alteraciones histológicas en órganos y tejidos. El crecimiento se evaluó con los datos de peso y longitud de los peces, de acuerdo al periodo experimental con los siguientes parámetros:

Peso ganado

Estima la ganancia de peso en un tiempo determinado (Martínez-Palacios, 1987)

Cálculos:

$$PG = \text{Peso final} - \text{Peso inicial}$$

Tasa de Crecimiento (Zhou *et al.*, 2003). $TC = (Pf - Pi) / Pi (100)$

Donde:

TC = Tasa de Crecimiento (g/día)

P_f = Peso promedio final (g)

P_i = Peso promedio inicial (g)

Tasa específica de crecimiento

Esta medida se estima por el porcentaje promedio de incremento del peso corporal por día (Brown, 1987; Cho *et al.*, 2003).

$$TEC (\%/día) = [\text{Ln peso final} - \text{Ln peso inicial}] * 100 / T$$

Donde:

TCE = Tasa de Crecimiento Específico (% peso/día)

P_f = Peso promedio final (g)

P_i = Peso promedio inicial (g)

T = tiempo (días)

Ln = Logaritmo natural

Eficiencia alimenticia

La eficiencia alimenticia se determina en relación con el peso ganado y la cantidad de alimento consumido por los organismos. La medida más representativa es la Tasa de Conversión alimenticia.

Tasa de conversión alimenticia (TCA)

La tasa de conversión alimenticia, es la estimación del alimento utilizado para producir una medida de peso en el pez (Harfush, 1992).

Cálculos:

$$TCA = ACI / GPI$$

Donde:

ACI = Alimento consumido individual.

GP = Ganancia de peso.

5.7 Análisis histológico

Para evaluar el estado inicial de salud de los peces, se sacrificaron al inicio 10 organismos y 12 peces al final por tratamiento, mediante una sobredosis del anestésico 2-phenoxy-ethanol. Posteriormente se extrajeron los diferentes órganos y tejidos y se colocaron en formalina al 10% durante 24 horas, para ser posteriormente lavados y colocados en una solución de alcohol al 70% hasta su procesamiento mediante prácticas convencionales de histología. Los peces se disecaron para obtener órganos y tejidos como corazón, hígado, cerebro, bazo, riñón, estómago e intestino y branquias. Se colocaron en un molde Tissue-Tek unicassette # 4170-01. Se deshidrataron con alcoholes seriados (70, 80, 96 y 100%) y se aclararon en xilol para facilitar la impregnación de parafina en los tejidos. Previo a la deshidratación las branquias se descalcificaron para permitir la facilidad del corte y evitar artefactos. Posteriormente se realizó la inclusión en parafina (Histoembebedor Leica-Jung, USA). Los cortes se

realizaron a 5 micras en un micrótopo rotatorio (Jung Histocut Leica #820) y se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina y se montaron con resina CYTOSEAL 60, (Olympus modelo CH-30 RF100, USA) (Lee y Luna, 1968; Drury y Wallington, 1980; Tonguthai *et al.* 1999). Las secciones teñidas fueron analizadas utilizando un microscopio compuesto Olympus y las imágenes digitales se tomaron con una cámara Olympus Qimage.

5.8 Parámetros sanguíneos

Extracción de la muestra de sangre

Los peces se anestesiaron con 2-fenoxietanol (Sigma, USA) a una concentración de 1 ml/L para evitar el estrés que pueda influir en los resultados de los parámetros sanguíneos. La extracción de la sangre se obtuvo directamente de la vena caudal con jeringas para Tuberculina marca TERUMO de 1 ml (Figura 7). La sangre utilizada para el recuento de las células sanguíneas y la concentración de hemoglobina se depositó en tubos con K₂EDTA de la marca BD Microtainer. Para el hematocrito, la sangre se recolectó directamente en los tubos capilares para hematocrito y para la determinación de la química sanguínea el resto de la sangre colectada se colocó en tubos Eppendorf para posteriormente obtener el suero. La sangre se obtuvo de 10 peces por cada tratamiento al final del experimento.



Figura 7. Toma de sangre de la vena caudal en los peces experimentales.

Recuento de eritrocitos

El recuento de eritrocitos consiste en determinar el número de glóbulos rojos por milímetro cúbico de la sangre. El recuento se realizó por el método de tinción de Natt-Herrick. El método consiste en colocar 4 ml de colorante Natt-Herrick en un tubo de 5 ml al cual posteriormente se adicionan 20 μ l de la sangre con anticoagulante para preparar una dilución 1:200, se mezcló perfectamente y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente con una jeringa se tomó esta solución y se colocó una gota en ambas zonas de la cámara Neubauer y después de 5 minutos de sedimentada la muestra se procedió al recuento celular con ayuda de un microscopio a 40X. El recuento se realizó en los cuadros más pequeños de la cámara, contando en los 4 cuadros de los extremos y el del centro de la cámara.

El número de eritrocitos se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de eritrocitos} = (\text{N}^{\circ} \text{ de eritrocitos total} \times 1 / 0.020) \times \text{Factor de dilución}$$

Factor de dilución: 200

Recuento de leucocitos

Se empleó el método de tinción Natt-Herrick, de igual forma que en el recuento de eritrocitos. El recuento de leucocitos se realizó en los 4 extremos más grandes de la cámara (Natt-Herrick, 1952).

El número de leucocitos se realizó con la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de leucocitos } \mu\text{l}^{-1} = \text{N}^\circ \text{ total de células blancas} / 8 (200)$$

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. Posteriormente se determinó el paquete celular con respecto al volumen total con un lector para microhematocrito SOL-BAT (Del Rio-Zaragoza *et al.*, 2008)

Hemoglobina

La concentración de la hemoglobina se determinó con un kit colorimétrico marca RANDOX, basado en el método de la cianometahemoglobina y con ayuda de un espectrofotómetro las lecturas de las muestras se realizaron a una longitud de onda de 540 nm.

Química sanguínea

Los parámetros de la proteína total y los triglicéridos se determinaron del suero sanguíneo. De la sangre coagulada, el suero se obtuvo por centrifugación durante 5 minutos; una vez separado el suero este se colectó y se mantuvo en congelación a -80°C hasta su posterior análisis. La proteína total se determinó con ayuda de un kit colorimétrico (Bio Systems) basado en el método de Biuret, en la cual la cantidad de proteínas en la sangre es directamente proporcional a la intensidad de color. De igual

forma los triglicéridos se midieron por un método colorimétrico con un kit para cuantificación de Triglicéridos-LS (Grupo MexLab) y las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro a 545 y 520 nm respectivamente.

5.9 Análisis Estadísticos

Se realizaron pruebas de normalidad y homocedasticidad de los datos obtenidos de crecimiento, supervivencia, consumo alimenticio y eficiencia alimenticia y parámetros hematológicos de los diferentes tratamientos y se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía, con un nivel de significancia de 95%. La diferencia entre las medias se contrastó mediante un análisis de comparaciones múltiples con la Prueba de Duncan cuando los datos fueron paramétricos y cuando no fueron paramétricos se realizó un ANOVA en Rangos con una prueba de Kruskal-Wallis para contrastar las medias. El requerimiento de pantotenato de calcio se realizó con el modelo de regresión lineal con punto de quiebre basándose en el peso ganado (Robbins *et al.*, 2006).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Determinación de la composición proximal y concentración de pantotenato de calcio en las dietas experimentales.

No se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) en la composición proximal de las dietas experimentales con los diferentes niveles de d-pantotenato de calcio (Tabla 4). Los niveles de proteína y lípidos obtenidos resultaron cercanos a los calculados con los que se formularon las dietas (50% y 15% respectivamente). Por lo cual se puede determinar que fueron isoprotéicas e isoenergéticas.

El contenido final de d-pantotenato de calcio en las dietas se muestra en la Tabla 4. Los niveles en los tratamientos son mayores a los calculados debido a que los ingredientes proteicos de la dieta contienen cantidades de la vitamina en su conformación, lo cual se puede observar en el tratamiento sin inclusión de d-pantotenato de calcio que aunque no se le adicionó, presentó 2.57 mg.kg^{-1} . En los tratamientos con inclusión de la vitamina se le adicionó un 10% extra para evitar la probable pérdida durante el proceso de elaboración de alimento como lo menciona Slinger *et al.* (1979). Por lo cual también se puede deducir que no hubo pérdidas importantes de la vitamina durante la manufactura de las dietas.

Tabla 4. Composición proximal y concentración final de d-pantotenato de calcio en las dietas experimentales.

| Composición | Dietas | | | | | | |
|---|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | D0 | D20 | D40 | D60 | D80 | D100 | D120 |
| Humedad | 6.3±0.1 ^b | 6.5±0.17 ^b | 5.2±0.1 ^c | 7.3±0.3 ^a | 4.99±0.04 ^c | 4.94±0.1 ^c | 5.7±0.2 ^d |
| Lípidos | 15.9±0.2 ^a | 16.10±0.1 ^a | 16.10±0.1 ^a | 16.01±0.1 ^a | 16.21±0.2 ^a | 15.96±0.01 ^a | 16.71±0.2 ^a |
| Proteína | 53.6±0.1 ^a | 50.4±0.1 ^a | 48.34±0.1 ^a | 53.5±0.1 ^a | 53.26±0.1 ^a | 53.65±0.1 ^a | 51.13±0.05 ^a |
| Cenizas | 11.7±0.1 ^a | 12.53±0.1 ^a | 13.4±0.01 ^a | 10.31±0.1 ^a | 10.4±0.02 ^a | 10.15±0.004 ^a | 12.93±0.2 ^a |
| Contenido de d-pantotenato de calcio (mg/Kg) | | | | | | | |
| Calculado | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 | 120 |
| Analizado | 2.57±0.80 | 31.97± 0.43 | 47.91±0.16 | 63.79±1.09 | 76.83±7.53 | 103.15 ± 8.07 | 121.91±4.02 |

Valores con mismo superíndice en cada columna no son significativamente diferentes (P>0.05)
 Los valores de la composición proximal están expresados en base seca.

6.2 Contenido de lípidos en juveniles de *L. guttatus* experimentales

Se puede observar que hay una correlación positiva entre el nivel de pantotenato y la cantidad de lípidos en los pargos (Figura 8), lo que sugiere que hay una tendencia al aumento de lípidos a mayor cantidad de vitamina, y llega a un nivel donde el aumento ya no es significativo, por lo tanto se puede deducir que el pantotenato de calcio efectivamente influye en el metabolismo de lípidos para pargo flamenco

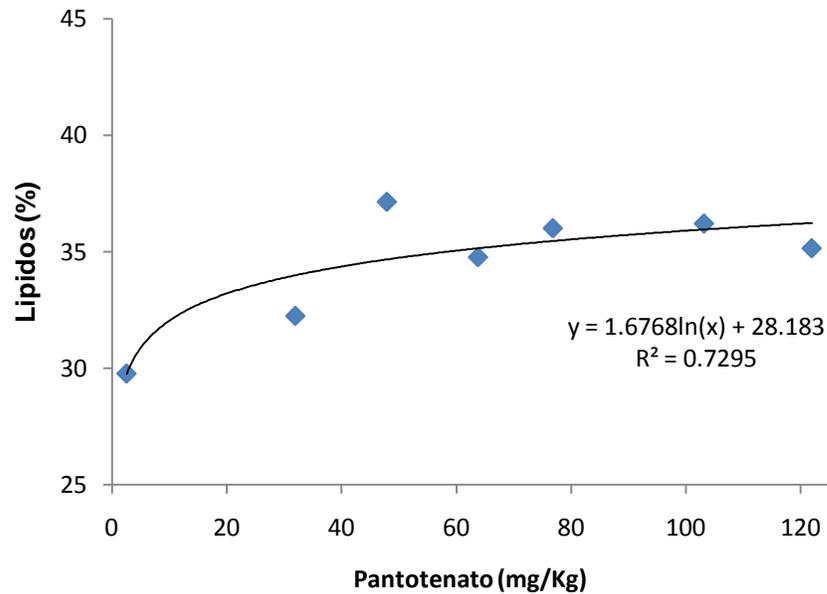


Figura 8. Relación entre la cantidad de pantotenato en las dietas con el contenido de lípidos en juveniles de *L. guttatus*.

El contenido de lípidos en el cuerpo de los peces fue significativamente mayor a partir de D40 en comparación a las dietas D0 y D20 . De la misma manera, Poston y Paige (1982) reportan para *Salvenilus namaycush*, que en dietas deficientes de ácido pantoténico el contenido de lípidos en el cuerpo de los peces fue más bajo comparado con el control. Por su parte Soliman y Wilson (1992) muestran que para la tilapia azul, la composición proximal no fue afectada por el contenido de d-pantotenato de calcio en la dieta mientras que Wen *et al.* (2009) comprobaron que el contenido de lípidos en *C. carpio* es inversamente proporcional a la adición de vitamina en la dieta.

6.3 Crecimiento y eficiencia alimenticia

En la Figura 9 se observa el efecto del d-pantotenato de calcio en el crecimiento de *L. guttatus*. El tratamiento sin inclusión pero conteniendo 2.47 mg.kg⁻¹ de vitamina derivado de la materia prima, presentó un crecimiento significativamente menor ($P>0.05$), diferente al de los demás tratamientos. Los peces alimentados con la dieta conteniendo 47.91 mg.kg⁻¹ (D40) obtuvieron el mayor crecimiento, sin embargo no hubo diferencias significativas con el resto de las dietas. Es posible que de haber continuado con el experimento, estas diferencias se harían más grandes, ya que en la gráfica se puede apreciar que el D0, se separó completamente de los otros tratamientos, posiblemente llegando a un platou.

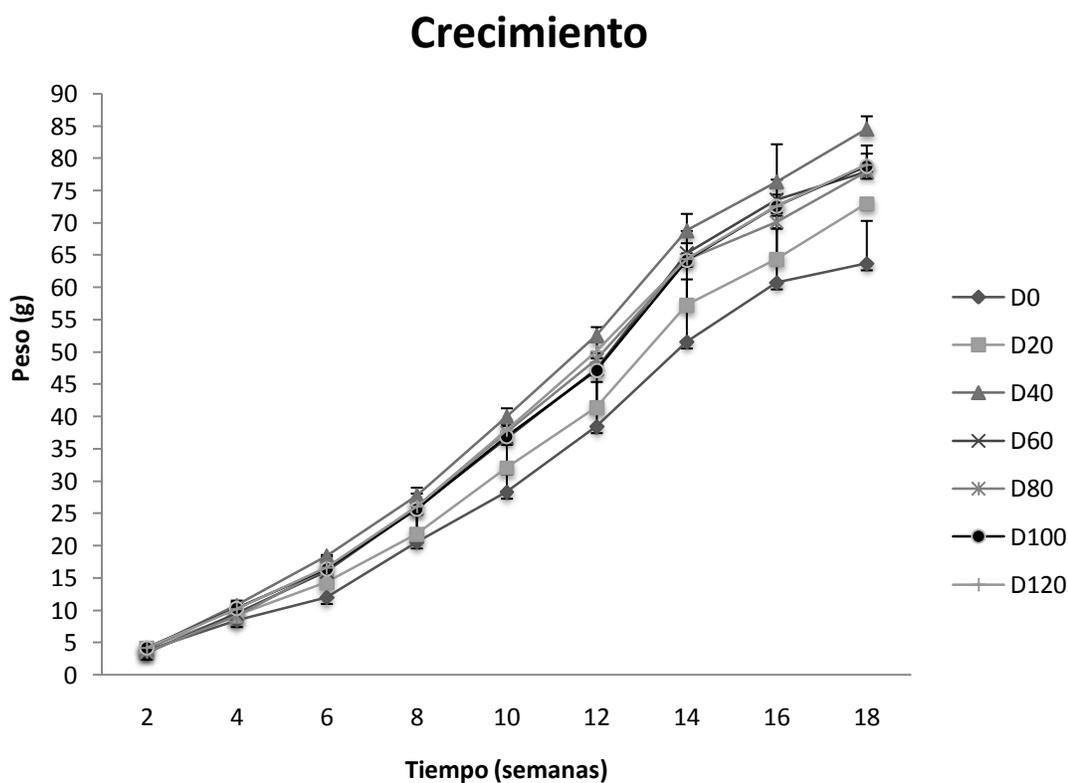


Figura 9. Efecto de d-pantotenato de calcio en el crecimiento de juveniles de *Lutjanus guttatus* durante 18 semanas de tratamiento.

El pantotenato de calcio es considerado como factor de crecimiento en los animales, esto fue observado por primera vez en pollos que mostraron signos de deficiencia y reducción de crecimiento en ausencia de esta vitamina (Dyke, 1965; Smith y Won, 1996). El mismo efecto y altas mortalidades los han reportado varios autores en peces que carecen de esta vitamina en el alimento, como se observó en el presente estudio.

El efecto de la vitamina sobre el crecimiento varía de acuerdo a las especies y al estado en el que se encuentren los organismos, el tiempo de exposición a la vitamina, la edad, entre otros. En *C. urophthalmus* no hubo diferencias en crecimiento en los peces alimentados con inclusiones desde 40 hasta 320 mg de pantotenato de calcio por kg de dieta, en un periodo de 75 días y 160-175 mg de peso (Chávez de Martínez *et al.*, 1990). Por otro lado Masumoto *et al.* (1993) mostraron que en trucha arco iris de 150 g alimentadas con la dieta sin inclusión de pantotenato de calcio tuvieron reducción en crecimiento después de 16 semanas.

Los únicos dos estudios disponibles en peces marinos, determinan cantidades de d-pantotenato de calcio para el óptimo crecimiento, en *L. calcarifer* de 15 mg.kg⁻¹ (Boonyaratpalin *et al.*, 1997) y en *E. malabaricus* de 11 mg.kg⁻¹ (Yu-Hung *et al.*, 2011). Para otras especies de agua dulce, carpas y salmónidos, varía de 10 a 40 mg.kg⁻¹ dieta (Soliman y Wilson 1992; Masumoto *et al.*, 1993 y Wen *et al.*, 2009). En este estudio, después de la sexta semana los peces alimentados con la dieta sin inclusión de la vitamina (D0) comenzaron a mostrar reducción en crecimiento y los peces alimentados a partir del tratamiento D20 tuvieron un aumento en peso significativamente diferente contra D0.

En cuanto a los parámetros nutricionales, la tasa de conversión alimenticia (TCA) (Tabla 5) es una medida que representa la utilización del alimento en los peces, mientras más baja sea ésta, el alimento ofrece mejores características, en este estudio la TCA más alta se presentó en los peces que recibieron dietas deficientes de d-pantotenato de calcio (2.47 mg.kg⁻¹), siendo significativamente diferente ($P > 0.05$) al resto de los tratamientos, los cuales obtuvieron valores favorables.

Tabla 5. Crecimiento y eficiencia alimenticia de juveniles de *L. gutattus* alimentados con diferentes cantidades de d-pantotenato de calcio

| | Peso inicial (g) | Peso final (g) | PG (%) | TC (%) | TCE (% día) | TCA |
|-------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------|------------------------|
| D0 | 10.07±1.37 ^a | 73.75±18.42 ^a | 63.68±6.65 ^a | 633.11±78.39 ^a | 1.58±0.08 ^a | 2.08±0.46 ^a |
| D20 | 9.95±1.19 ^a | 82.93±18.52 ^{ab} | 72.98±0.36 ^{ab} | 733.77±17.42 ^{ab} | 1.68±0.02 ^{ab} | 1.53±0.27 ^b |
| D40 | 10.49±1.5 ^a | 94.86±19.20 ^b | 84.54±1.99 ^b | 820.86±57.89 ^b | 1.76±0.05 ^b | 1.46±0.0 ^b |
| D60 | 10.26±1.36 ^a | 88.12±18.86 ^b | 77.86±2.89 ^b | 759.97±45.07 ^{ab} | 1.71±0.04 ^b | 1.49±0.07 ^b |
| D80 | 10.01±1.36 ^a | 87.95±20.27 ^b | 72.14±10.05 ^b | 780.45±117.35 ^b | 1.72±0.1 ^b | 1.41±0.30 ^b |
| D100 | 10.12±1.33 ^a | 88.88±17.50 ^b | 72.88±10.55 ^b | 779.04±110.84 ^b | 1.72±0.1 ^b | 1.35±0.25 ^b |
| D120 | 10.25±1.44 ^a | 89.27±19.41 ^b | 79.02±3.0 ^b | 771.03±26.84 ^{ab} | 1.72±0.02 ^b | 1.51±0.09 ^b |

PG= Peso ganado. TC= Tasa de crecimiento. TEC=Tasa de crecimiento específico. TCA= Tasa de conversión alimenticia.

Contrario a este estudio Wen *et al.*, (2009) en *Cyprinus carpio* obtuvieron mejor eficiencia alimenticia con bajos niveles de pantotenato de calcio (4.0 mg.kg⁻¹). En el trabajo realizado con *Cichasoma urophthalmus*, los datos finales de TCA en las dietas suplementadas con 40 hasta 320 mg.kg⁻¹ de dieta, presentaron valores similares a los reportados en este estudio, los cuales fueron desde 1.44 a 1.75, con tamaño de peces similares a los del presente trabajo, 16-17.5 g.

6.4 Supervivencia

Los peces alimentados con la dieta con el menor contenido de d-pantotenato de calcio en la dieta (D0) comenzaron a mostrar signos de deficiencia y mortalidades después de la segunda semana, siendo más evidentes en D0. En la Figura 10 se observa como después de la cuarta semana hubo altas mortalidades hasta la semana 14 donde no hubo más peces muertos.

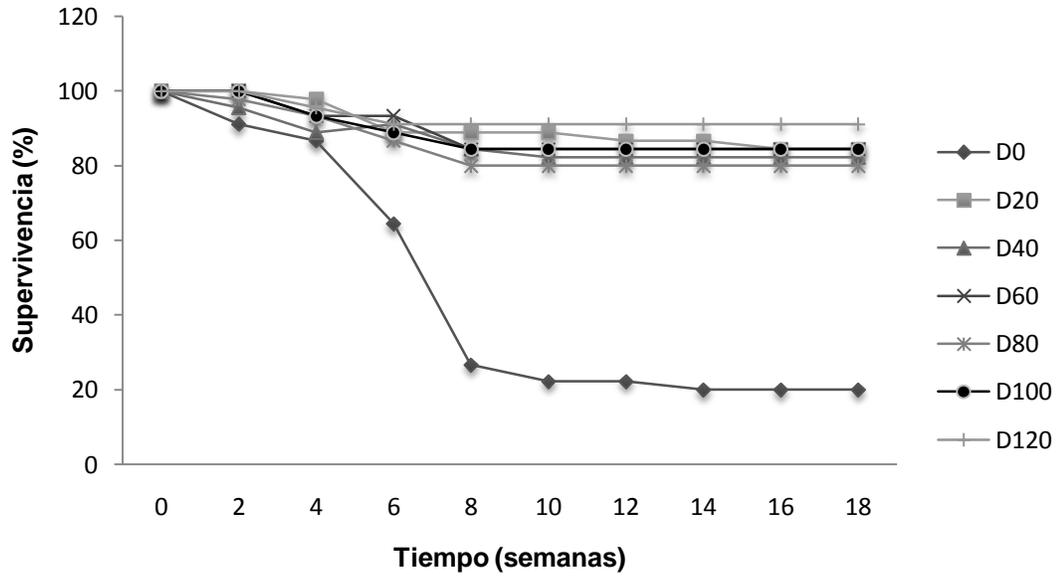


Figura 10. Supervivencia de juveniles de *L. guttatus* alimentados con diferentes niveles de d-pantotenato de calcio.

6.5 Requerimiento de pantotenato de calcio para juveniles de *Lutjanus guttatus*

Para establecer el nivel de requerimiento de d-pantotenato de calcio para juveniles de *L. guttatus*, se siguió el método utilizado por varios autores para estimar los requerimientos de nutrientes (Ai *et al.*, 2006; Robbins *et al.*, 2006; Wen *et al.*, 2009; Yu-Hung *et al.*, 2011). Basándose en el análisis de regresión lineal con punto de quiebre ajustando la concentración de d-pantotenato en las dietas y el peso ganado por los pargos (Figura 11). Debido a que para el establecimiento del requerimiento dietético de pantotenato, las investigaciones frecuentemente utilizan el máximo crecimiento y la desaparición de signos de deficiencia (Smith y Won, 1996)

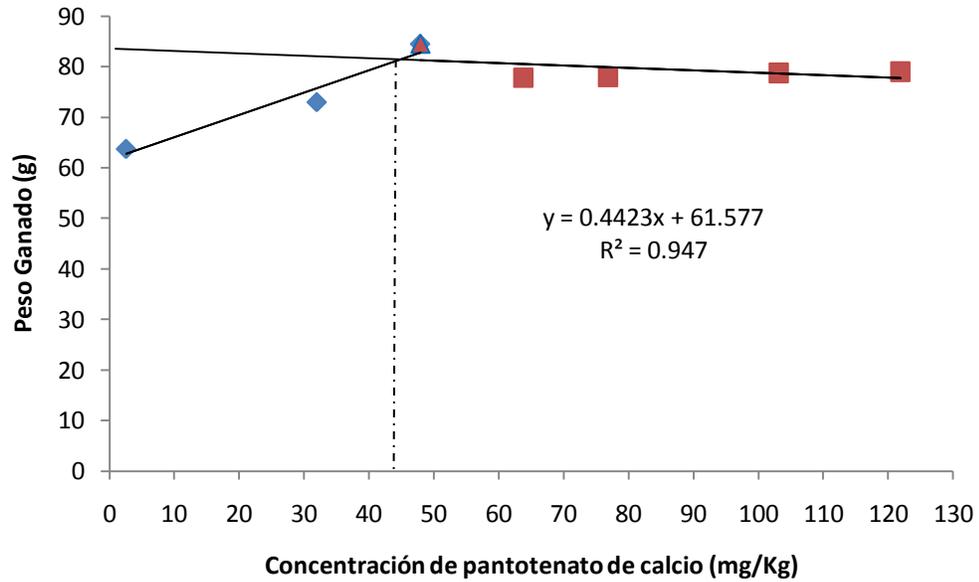


Figura 11. Requerimiento nutricional de pantotenato de calcio para juveniles de *L. guttatus*.

Los resultados muestran que existe una correlación positiva entre la concentración de vitamina y el peso ganado por los juveniles de *L. guttatus*. El incremento de pantotenato de calcio es directamente proporcional al peso de los peces, hasta llegar a un nivel donde el incremento en peso se estabiliza.

Con la utilización del método gráfico, usando la línea de “broken line”, donde los valores de peso ganado son expresados por una regresión lineal de acuerdo a los valores de pantotenato de calcio, de esta manera se estableció el requerimiento de pantotenato de calcio para juveniles de pargo flamenco en 45.5 mg.kg^{-1} de dieta.

En la Tabla 6 se muestran los requerimientos para distintas especies de peces, el requerimiento varía de acuerdo a la especie y edad. Cabe resaltar que la mayoría de los trabajos se han realizado en peces de agua dulce y solamente se encontraron valores para salmónidos y otras dos especies marinas (*L. calcarifer* y *E. malabaricus*).

En ratas, el requerimiento de ácido pantoténico va disminuyendo de acuerdo a la edad y animales más grandes requieren de más tiempo para mostrar deficiencias (Unna y Richards, 1942).

Tabla 6. Requerimiento de d-pantotenato de calcio (mg.kg^{-1} de dieta) para un óptimo crecimiento de diferentes especies de peces.

| Especie | Peso inicial (g) | Tiempo experimental | Requerimiento (mg/Kg) | Autor |
|----------------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Salmo gairdneri</i> | 4.12-6.1 | - | 16-19 | Tunison <i>et al.</i> , 1944 |
| <i>Salmo gairdneri</i> | 3.5 | 112 días | 40 | Mclaran <i>et al.</i> ,1947 |
| <i>Salvelinus fontinalis</i> | - | - | 38.8-50 | Phillips and Brockway, 1957. |
| <i>Cyprinus carpio</i> | 23 | 42 días | 40-56 | Ogino, 1967. |
| <i>Oncorhyncus tschawytscha</i> | 10-15 | 168 días | 52, 80 | Halver, 1971. |
| <i>Oncorhyncus tschawytscha</i> | - | - | 40-50 | Halver ,1972 |
| <i>Ictalurus punctatus</i> | 145-155 | 4 semanas | 30 | Wilson <i>et al.</i> , 1983 |
| <i>Cichlasoma urophthalmus</i> | 16-17.5 | 11 semanas | 80 | Chávez M. C. <i>et al.</i> ,1990 |
| <i>Oreochromis aureus</i> | 0.71 | 8 semanas | 10 | Soliman y Wilson, 1991 |
| <i>Lates calcarifer</i> | 2.7 | 12 semanas | 15 | Boonyaratpalin <i>et al.</i> , 1993 |
| <i>Oncorhyncus mykiss</i> | 150 | 28 semanas | 40 | Masumoto <i>et al.</i> , 1994 |
| <i>Cyprinus carpio var. Jian</i> | 13.0 | 9 semanas | 23 | Wen <i>et al.</i> ,2009 |
| <i>Epinephelus malabaricus</i> | 15.3 | 8 semanas | 11 | Yu-Hung <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Lutjanus guttatus</i> | 10.2 | 18 semanas | 45.5 | Estudio actual |

El nivel de requerimiento encontrado en este estudio (45.5 mg.kg^{-1}) para juveniles de pargo flamenco, se encuentra dentro del rango que se utiliza en las premezclas de vitaminas para algunas especies marinas (Tacon, 1987; Fernández *et al.*, 1998; Mai *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2009).

6.6 Determinación de la concentración de pantotenato de calcio en hígado y branquias de los pargos experimentales.

La Figura 12 muestra el efecto del contenido de pantotenato de calcio en las dietas respecto a la cantidad de la vitamina acumulada en el hígado y branquias de juveniles de *L. guttatus*. La cantidad de pantotenato acumulada en el hígado y branquias no varió significativamente ($P>0.05$) entre los tratamientos. Respecto a la acumulación de la vitamina en el hígado los resultados en este estudio concuerdan con los reportados para *O. mykiss*, donde las concentraciones en los peces alimentados con dietas deficientes no fueron significativamente más bajas con respecto a los alimentados con la dieta suplementada (Masumoto *et al.*, 1993), lo cual indica que el hígado es un tejido central del metabolismo y tiene afinidad con el ácido pantoténico, al acumular y servir de reserva de los nutrientes (Pietrzek y Hornig 1980).

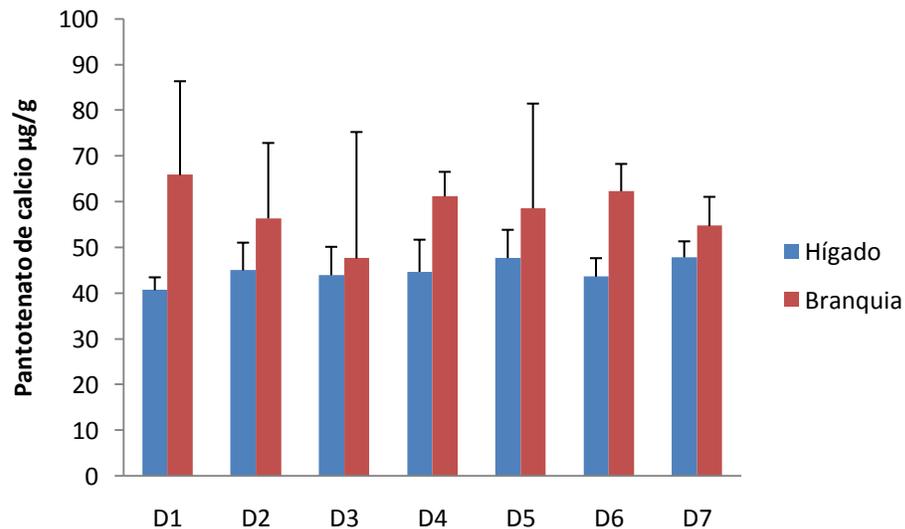


Figura 12. Concentración de pantotenato en hígados y branquias de juveniles de *L. guttatus* alimentados con diferentes cantidades de d-pantotenato de calcio.

Masumoto *et al.* (1993) encontraron diferencias en la concentración de pantotenato de calcio en las branquias entre los juveniles de *O. mykiss* alimentados con una dieta deficiente y suplementada con la vitamina, reportaron niveles bajos de la vitamina en el tratamiento deficiente, contrario a los resultados de este estudio para juveniles de *L.*

guttatus. Probablemente en este estudio el tiempo para agotar las reservas de la vitamina en peces de esta talla es mayor al periodo experimental que se realizó, por lo que no hubo diferencias en la concentración de la vitamina en las branquias. Aunque no hubo diferencias significativas en la concentración de la vitamina en las branquias, el tratamiento D0 tuvo mayor contenido de pantotenato de calcio y el menor contenido en el hígado, por lo que probablemente la vitamina se deposita en mayor cantidad en el órgano donde se requiere, en este caso las branquias para evitar la hiperplasia característica ocasionada por la deficiencia del pantotenato de calcio. Hardy *et al.* (1987) y Reibel *et al.* (1982) mencionan que el almacenamiento de ácido pantoténico en los tejidos puede mantenerse durante largos períodos de tiempo. Estos resultados explican el comportamiento de los signos histológicos y hematológicos explicados más adelante.

6.7. Signos clínicos externos

Los peces de las dietas D20 a D120 no presentaron signos externos de deficiencia (Figura 12) ni altas mortalidades. Después de cuatro semanas de evaluación los pargos alimentados con el tratamiento D0, sin inclusión de pantotenato de calcio, mostraron signos clínicos de deficiencia como erosión de aleta caudal, hemorragia en cuerpo y en aleta pectoral, descamación, letargia, aclaramiento de la piel (Figura 13) y mortalidades.

La erosión de la aleta caudal comenzaba con desprendimiento del epitelio y sangrado hasta la pérdida total de la aleta, imposibilitando al pez para nadar normalmente por lo tanto también se comprometió la ingesta de alimento y reducción de crecimiento, observando peces delgados. La descamación fue severa en algunos pargos llegando a observarse la dermis con hemorragia. La letargia se presentó en los peces que presentaban estos signos, los cuales no nadaban en todo el tanque solamente permanecían en el fondo. Los peces de este tratamiento presentaron altas mortalidades después de las cuatro semanas.

Los signos de deficiencia presentados por los juveniles de pargo flamenco en este estudio, fueron similares a los presentados en otras especies de peces como salmónidos, tilapias, bagres y otras especies marinas (Mclaran *et al.*, 1947; Phillips and Brockway, 1957; Ogino, 1967; Halver, 1972; Wilson *et al.*, 1983; Soliman y Wilson, 1992;

Masumoto *et al.*, 1993; Smith y Song, 1996, Boonyaratpalin, 1997; Davis *et al.*, 1998; Wen *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2010 y Yu-Hung *et al.*, 2011).



Figura13. Pargo flamenco con color, escamas, piel y aletas normales.



Figura 14. Signos de deficiencia externos en juveniles de *L. guttatus*. Hemorragias en cuerpo, erosión de aleta caudal, coloración clara.

6.8 Análisis histológico

Alteraciones histológicas observadas en branquias.

La Figura 14 muestra varias lamelas primarias en los peces iniciales. Se esperaba que las dietas deficientes presentaran hiperplasia y fusión lamelar como se ha reportado con otras especies de peces con deficiencia de d-pantotenato de calcio (Mclaran *et al.*, 1947; Phillips y Brockway, 1957; Ogino, 1967; Halver, 1972; Wilson *et al.*, 1983; Chávez de Martínez *et al.*, 1990; Soliman y Wilson, 1992; Boonyaratpalin *et al.*, 1993; Masumoto, *et al.*, 1993; Wen *et al.*, 2009; Yu-Hung *et al.*, 2011). En el presente estudio, no se observaron cambios histopatológicos claros en el tejido de las branquias que indicaran que eran resultado de la deficiencia de la vitamina. Los peces de todas las dietas presentaron monogéneos dactilogíridos los cuales son ectoparásitos que se presentan comúnmente en las branquias del pargo flamencos. Estos parásitos como ya ha sido reportado por Del Rio-Zaragoza *et al.* (2010) ocasionan daños focales en los puntos en donde éstos se fijan. Sin embargo, Las branquias de los peces también presentaron diversas patologías tales como infiltración de células inflamatorias, atrofia de lamelas secundarias en punta y base de lamelas secundarias hasta la pérdida total de las mismas, en la mayoría de las lamelas atrofiadas también mostraban edema, así como congestión de células sanguíneas (telangiectasis o aneurisma). También hubo lamelas primarias deformadas o engrosadas con y sin lamelas secundarias. No se observaron diferencias en dichas patologías en todos los tratamientos (Figuras 15, 16).

Alteraciones histológicas observadas en hígado y riñón.

De la misma manera que en el caso de las branquias, todos los peces alimentados con los diferentes tratamientos presentaron degeneración grasa severa en el hígado (Figura 15). Por lo anterior y como en el caso de las branquias, se considera que el d-pantotenato de calcio no influyó en las patologías observadas en este órgano. En el caso del riñón se observaron cambios patológicos tanto en glomérulos como en túbulos de todos los peces. Estas alteraciones se atribuyen a la presencia de los parásitos y/o a posiblemente a otros factores nutricionales o ambientales que será necesario investigar.



Figura 15. Branquia de peces iniciales en donde no se observan alteraciones patológicas ni parásitos. H&E: Barra = xx micras

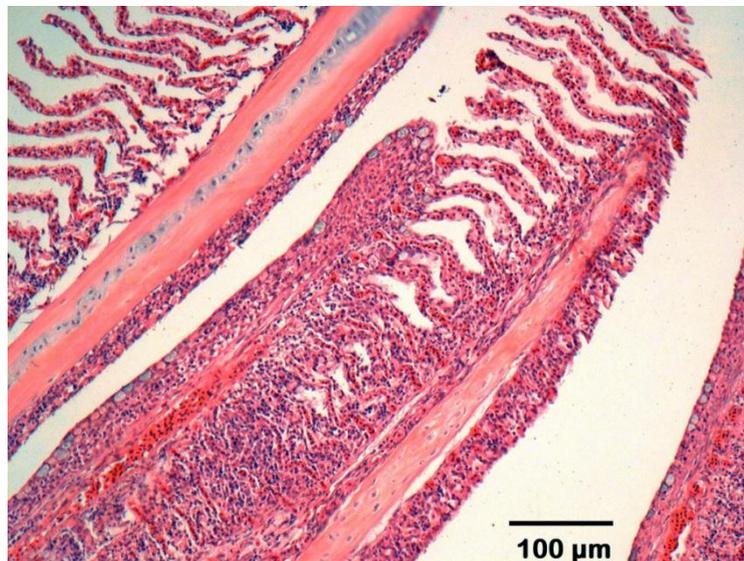


Figura 16. Corte sagital de lamela primaria de organismos de la dieta D3 en donde se observa hiperplasia, fusión de lamelas secundarias, infiltración de células inflamatorias, aumento de células de moco y edema del epitelio. H& E.

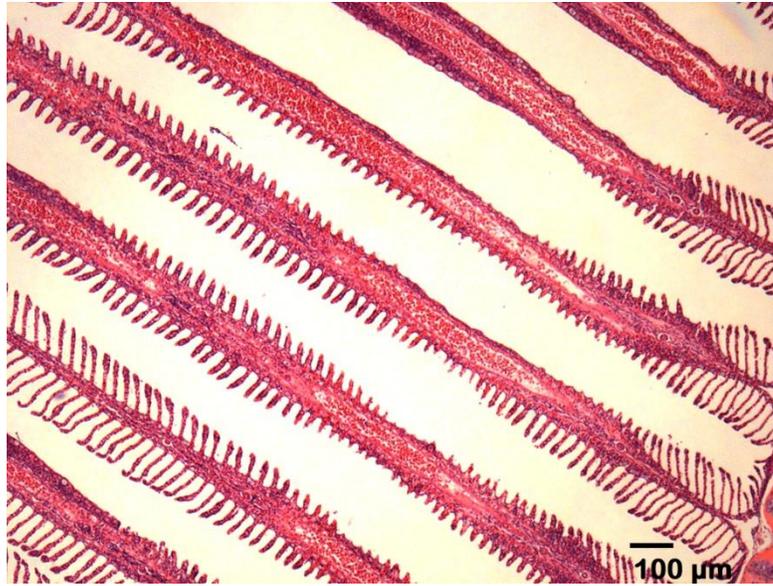


Figura 17. Corte sagital de varias lamelas primarias de pargos alimentados con la dieta D3 en donde se observa clara atrofia de lamelas secundarias hasta la completa desaparición de las mismas.

Posiblemente la presencia de 2.57 mg.kg^{-1} de pantotenato de calcio fue suficiente para evitar la presencia de la hiperplasia característica de esta deficiencia y/o a que el tiempo de exposición a la deficiencia fue insuficiente, Masumoto *et al.* (1993) mencionan que el tiempo en agotarse las reservas de vitaminas en los peces es mayor en peces grandes en comparación con peces pequeños los cuales tienen tasas de crecimiento más altas. En dos trabajos realizados con *O. mykiss* de diferentes tallas los signos de deficiencia se presentaron en diferentes tiempos, para peces de 0.71g se presentaron las lesiones en órganos a partir de las 16 semanas y para organismos de 150g en 28 semanas (Karges y Woodward, 1984 y Masumoto *et al.*, 1993).

Así mismo, para la especie marina *L. calcarifer* de 2.7g los signos de deficiencia ocurrieron después de las 6 semanas. Por lo tanto el tiempo en agotarse las reservas del pantotenato de calcio en los peces varía con la especie y talla de los peces, este es el primer trabajo donde se determina la deficiencia de pantotenato en los juveniles de *L. guttatus*.

6.9 Análisis Hematológico.

Actualmente los parámetros sanguíneos, son comúnmente utilizados como indicadores directos o inferenciales del estado de salud de los peces, ya sea en el diagnóstico de enfermedades y que pueden proveer información relacionada a la tolerancia del pez a un agente estresor (Schreck y Moyle, 1990; Del Rio-Zaragoza *et al.*, 2008). En este estudio, se presentó un aumento en el recuento de eritrocitos y de leucocitos en las dietas con bajo contenido de d-pantotenato de calcio (Tabla 7) contrario a los resultados esperados, debido a que se han reportado niveles bajos del hematocrito y de la hemoglobina en peces alimentados con dietas deficientes en pantotenato de calcio, por debajo de 10 mg/Kg (Soliman y Wilson 1992).

Tabla 7. Parámetros hematológicos de juveniles de *L. gutattus* alimentados con diferentes niveles de d-pantotenato de calcio.

| | Hematocrito (%) | Hemoglobina | Eritrocitos (x10 ⁶ mm ³) | Leucocitos | Proteína (g/L) | Triglicéridos (mg/dL) |
|-------------|---------------------------|-------------------------|---|--------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| D0 | 59±7.47 ^a | 7.01±2.02 ^{ab} | 3.585±0.75 ^{ab} | 14688±2541 ^b | 46.71±4.04 ^a | 398.97±64.42 ^b |
| D20 | 58±3.66 ^a | 7.71±1.14 ^a | 3.722±0.06 ^a | 17263±3040 ^a | 49.86±6.16 ^a | 509.09±200.76 ^{ab} |
| D40 | 57±3.15 ^a | 7.02±1.30 ^{ab} | 3.077±0.62 ^{abc} | 15530±2322 ^{ab} | 50.63±5.33 ^a | 501.86±163.91 ^{ab} |
| D60 | 58±1.62 ^a | 5.86±0.70 ^b | 3.345±0.78 ^{abc} | 14480±1564 ^b | 50.09±5.76 ^a | 627.36±179.96 ^a |
| D80 | 60±8.47 ^a | 6.21±0.90 ^{ab} | 2.909±0.69 ^{bc} | 12256±1699 ^c | 53.62±7.14 ^a | 612.04±278.70 ^{ab} |
| D100 | 61±6.01 ^a | 6.27±3.36 ^b | 2.760±0.55 ^c | 12145±1920 ^c | 49.49±9.49 ^a | 438.38±182.40 ^{ab} |
| D120 | 59±8.44 ^a | 6.22±1.14 ^{ab} | 2.930±0.33 ^{bc} | 11406±885 ^c | 51.53±5.15 ^a | 563.31±250.91 ^{ab} |

El pantotenato de calcio actúa en la síntesis de la hemoglobina, la cual comienza en los animales combinando succinil-CoA sintetasa y glicina como el primer paso en la síntesis (Shemin y Russell, 1953). Al mismo tiempo, el pantotenato de calcio funciona como parte de la molécula de la Coenzyma A en la liberación de energía de los tres nutrientes que la proporcionan, carbohidratos, grasas y proteínas por medio del ácido tricarbóxico

(ATC) (Dyke, 1965, Halver, 1972, 1982; NRC 1983). La deficiencia de ácido pantoténico agota la concentración de CoA lo cual baja la conversión a succinil-CoA sintetasa reduciendo la concentración de hemoglobina en sangre. En el presente estudio no se observó una reducción clara en la reducción de hemoglobina en la sangre.

El número de glóbulos rojos se modifica con la etapa del desarrollo, los hábitos y las condiciones ambientales y nutricionales. Los peces entre otras reacciones responden al estrés disminuyendo o aumentando el número de glóbulos rojos (Lagler et al., 1980; Santos y Pacheco 1996; Cataldi *et al.* 1998). Un factor estresante pudieron ser los parásitos monogéneos observados que aunque pocos, no dejan de ocasionar malestar y daño a los peces. Sin embargo, también la falta de pantotenato puede ocasionar que el sistema fisiológico del organismo se vea afectado (Wen *et al.*, 2010)

De igual forma, la anemia es un signo de deficiencia en peces (NRC, 2011), que se considera asociado con la anorexia en peces con dietas deficientes (Murai y Andrews, 1979; Soliman y Wilson, 1992). Sin embargo nuestros peces no mostraron anorexia ni signos de anemia, indicando como ya se mencionó anteriormente que posiblemente la cantidad de pantotenato de calcio presente en las dietas, incluyendo la D0 con 2.57 mg/Kg fue suficiente para evitar dichas alteraciones.

Los leucocitos están involucrados en la regulación de la respuesta inmunológica del organismo y se incrementa el número celular como una respuesta de protección durante un periodo de estrés (Santhakumar, Balaji y Ramudu, 1999 en Ayyappan y Jena, 2006). Los resultados muestran mayor cantidad de leucocitos en los tratamientos con menor contenido de pantotenato, por lo que podemos deducir que hubo mayor susceptibilidad al estrés generado por los parásitos y/o al pantotenato en los peces con las cantidades más bajas de la vitamina.

El contenido de proteína en sangre no varió significativamente, por lo cual podemos deducir que no fueron afectadas las funciones metabólicas de *L. guttatus* por deficiencia de d-pantotenato de calcio. Martínez (1976) menciona que el contenido total de proteína en sangre es tomado como un índice para saber el estado nutricional de los organismos. En nuestro caso este parámetro no varió entre tratamientos, indicando que los peces

nutricionalmente no fueron afectados. Cuando la concentración de proteína en sangre es baja es debido a enfermedades como daño en el hígado, mala absorción y deficiencia nutricional (Wedemeyer y McLeay, 1981).

En resumen, el pantotenato de calcio es importante para obtener mejor crecimiento en pargo y la deficiencia o cantidades bajas de este en la dieta de los peces provoca lesiones externas propias de la insuficiencia de la vitamina, sin embargo bajo las condiciones de este experimento, el tiempo para agotar las reservas de pantotenato en los pargos de 13g es mayor a las 18 semanas, lo cual se ve reflejado en los resultados hematológicos, los cuales no se vieron afectados por la ausencia de la vitamina, los efectos en sangre se detectan en menor tiempo que en los tejidos por lo cual tampoco obtuvimos lesiones características de la deficiencia del pantotenato de calcio en los tejidos de los pargos. Sin embargo, se determinó el requerimiento de la vitamina en 45.5 mg.kg^{-1} , con el cual se obtiene un crecimiento mayor, buena supervivencia y ausencia de lesiones externas en los juveniles de *L. guttatus*.

7. CONCLUSIONES

- La falta de pantotenato de calcio en la dieta de juveniles de *Lutjanus guttatus* provoca reducción en crecimiento y la presencia de signos clínicos que pueden llevar hasta la muerte a los organismos.
- Una cantidad de 2.57 mg.kg^{-1} o inferior en el alimento para juveniles de *L. guttatus* provoca erosión de aleta caudal, descamación, hemorragia, nado errático, peces delgados y mortalidad.
- Existe una relación positiva entre el contenido de lípidos en el cuerpo de *L. guttatus* y el contenido de pantotenato de calcio suministrado en la dieta.
- Los pargos alimentados con las dietas suplementadas con d-pantotenato de calcio presentaron mejor crecimiento y eficiencia alimenticia.
- La concentración de pantotenato de calcio en hígado y branquias de juveniles de *L. guttatus* no varió significativamente con los diferentes tratamientos.
- En este estudio no se encontraron patologías en las branquias asociadas a la deficiencia del pantotenato de calcio, por lo que se supone que en el tiempo experimental no se agotaron las reservas de la vitamina al 100% para lograr ver efectos en los órganos de los peces
- No se encontraron efectos de la deficiencia del pantotenato de calcio en los parámetros hematológicos, infiriendo que probablemente el tiempo de exposición a la deficiencia de la vitamina fue insuficiente, lo que coincide en que no se hayan presentado los signos de deficiencia típicos en las branquias de los peces.

8. RECOMENDACIONES

- Es necesario investigar las causas de las patologías observadas en branquias, hígado y riñón.

9. LITERATURA CITADA

- Abdo de la Parra M. I., Rodriguez-Ibarra E., Hernández C., Hernández K., González-Rodríguez B., Martínez-Rodríguez I. y García-Ortega A., 2010. Efecto de diferentes niveles de proteína y lípidos totales en la dieta sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. Revista de Biología Marina y Oceanografía 45, N°3: 433-439.
- Abiko Y., 1975. Metabolism of coenzyme A. In Metabolism of Sulphur Compounds Metabolic Pathways (D. Greenberg, ed.), pp. 1-25, Academic Press, New York, NY, USA.
- Aguirre P. and Gatlin III, D., 1999. Dietary vitamin C of red drum *Sciaenops Ocellatus*, Aquaculture Nutrition 5, 247:249.
- Alexis M., Karanikolas K. and Richards R., 1997. Pathological findings owing to the lack of ascorbic acid in cultured gilthead bream (*Sparus aurata L.*). Aquaculture 152, 209-218.
- Allen G.R., 1995. Lutjanidos (Peces óseos). En Fischer, W., I. Krupp, W. Schueider, C. Somer, K.E. Carpenter and V.H. Niem (Eds), Guía FAO para la identificación de peces Pacífico Centro-Oriental. Vol. III, Vertebrados parte 2:1231-
- Allen G. R., 1985. Snappers of the world an annotated and illustrated catalogue of lutjanid species known to date. FAO Fisheries Synopsis 125 (6), 1-208.
- Álvarez L. L., 2006. La selección de especies de peces marinos nativos en el Caribe y avances en México. III Conferencia mexicana sobre cultivo de peces nativos, Morelia, Michoacán. pp. 114-133.
- Alvarez-Lajonchere L, Ibarra-Castro L, García-Aguilar N, Ibarra-Zatarain Z., 2007. Manipulation and nutrition of marine fish broodstock. Panorama Acuícola 13(1):10-24
- Amezcuca F., Soto A. and Green R., 2006. Age, growth, and mortality of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* from the southeastern Gulf of California. Fisheries Research 77, 293-300.
- Anderson W.D., 1987. Systematics of the fishes of the family Lutjanidae (Perciformes:Percoidei) the snappers. En J.J. Polovina and S. Ralston (Eds.), Tropical snappers and groupers. Biology and Fisheries management: 1:1-32.

AOAC. 1985. Official methods of analysis of association of official analytical chemists, 684 pp. Association of Official Analytical Chemists, Arlington. Arellano, M. M., Rojas, H. A., García, D. F., Ceballos, V. B. y Villalejo, M., 2001. Ciclo reproductivo del pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) en las costas de Guerrero, México. Revista de Biología Marina y Oceanografía 36 (1), 1-8.

Barrows F., Gaylord G., Sealey W., Porter L and Smith C., 2008. The effect of vitamin premix in extruded plant-based and fish meal based diets on growth efficiency and health of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 283, 148-155.

Bloom J., Dabrowski K., 1996. Ascorbic acid metabolism in fish: is there maternal effect on the progeny?. Aquaculture 147, 215-224.

Brown G.T., 1959. The metabolism of pantothenic acid. J. Biol. Chem. 234, 370-378.

Boonyaratpalin M., 1997. Nutrient requirements of marine food fish cultured in Southeast Asia. Aquaculture 151: 283-313.

Boonyaratpalin M. and Wanakowat J., 1993. Effect of thiamine, riboflavin, pantothenic acid and inositol on growth, feed efficiency and mortality of juvenile seabass. In: S.J. Kaushik and P. Luquet (Editors), Fish Nutrition in Practice, Bjarritz (France) 1991. INRA, Paris, pp. 819-828.

Buentello J. A. y Gatlin D. M., 2000. The dietary arginine requirement of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) is influenced by endogenous synthesis of arginine from glutamic acid. Aquaculture, 188, 311-321.

Cruz-Romero M., Espinoza-Bar, J Mimbela-López, En: García-Boa, L Obregón-Alcaráz y E Girón-Botello. 1988. Aspectos biológico-pesqueros de tres especies de Lutjánidos en Colima, México. Reporte técnico del CRIP de Manzanillo, Colima. I.N.P. 31 pp.

Cruz-Romero M., Chávez E.A., Espino E and García A., 1996. Assessment of a snapper complex (*Lutjanus* spp.) of the eastern tropical Pacific. En Arreguín-Sánchez F., Munro J.L, Balgos M.C. and Pauly D. (Eds.), Biology, Fisheries and Culture of Tropical Groupers and Snappers: 324-330. Conf. Proc.

Dabrowski K., 2000. Absorption of ascorbic acid and ascorbic sulfate and ascorbate metabolism in common carp (*Cyprinus carpio*). Com. Physiol B 160, 549-561.

Davis K. B, Simco B. A. Li M. and Robinson E., 1998. Effect of Reduction of Supplementary Dietary Vitamins on the Stress Response of Channel Catfish *Ictalurus punctatus*. J. World Aquaculture Society. Vol 29:3

Del Rio-Zaragoza O. B., Fajer-Avila E J y Almazan-Rueda P., 2010. Haematological and gill responses to an experimental infection of dactylogyrid monogeneans on the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). Aquac 41: 1592-1601.

Del Río Zaragoza, O., Hernández R. M. and Buckle, R. F. 2008. Thermal stress effect on tilapia *Oreochromis mossambicus* (Pisces: Cichidae) blood parameters. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 41(2): 135-145.

Depeint F., Bruce R. W., Shangari N., Mehta R. and Brien P. J., 2006. Mitochondrial function and toxicity: Role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism. *Chemico-Biological Interactions* 163: 94–112.

Domschke, W., Liersch, M., and Decker, K. 1971. Lack of permeation of Coenzyme A from blood into liver cells. *Hoppe Seyler's 2. Physiol. Chem.* 352, 85-88.

Eo, J. and Lee, K., 2008. Effect of dietary ascorbic acid on growth and non-specific immune responses of tiger puffer, *Takifugu rubripes*. *Fish & Shellfish immunology* 25, 611-616.

Fernández F., Miqueul A. G., Guinea J y Martínez R., 1998. Digestion and digestibility in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) the effect of diet composition and ration size. *Aquaculture Vol* 166: 67-84.

García-Ortega A., 2007. Estado actual de la investigación y producción de botete diana *Sphaeroides annulatus*. En: González-Félix ML, Bringas-Alvarado L, Pérez-Velázquez M, Meza-García S (Eds) *Proceedings of the 3rd International Aquacu Forum*, Hermosillo, Sonora, México.

García O., Abdo, I., Duncan, N., Rodríguez, E., Velasco, G., González, B. and Puello, A., 2005. Larval rearing of spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* under experimental conditions. In: C.I. Hendry, G. Van Stappen, M. Willie and P. Sorgeloos (Eds.) *Larvi '05- Fish and Shellfish Larviculture Symposium*. European Aquaculture Society, Special Publication No. 36, Oostende, Belgium. pp. 172-175.

Harfush, M. M. R., 1992. Determinación de los requerimientos de proteína dietética en crías de *Cichlasoma urophthalmus* (Günter 1862) alimentadas *ad libitum*. Tesis de Maestría CINVESTAV – IPN, Unidad Mérida 67pp.

Hernández, M. K., 2007. Evaluación de los requerimientos de proteína, lípidos totales y dietas prácticas en juveniles de pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). Tesis de Maestría, 87 pp.

Henrique, M., Gomes, E., Gouillou, M., Oliva, A. and Davies, S., 1998. Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 161(1), 415-426.

- Ibarra, C. and Alvarez, L., 2009. Improved Induced-Spawning Protocol for the Spotted Rose Snapper (*Lutjanus guttatus*). The Israeli Journal of Aquaculture–Bamidgeh 61(2), 121-133.
- Ibarra, C. and Duncan, N., 2007. GnRHa-induced spawning of wild-caught spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. Aquaculture 272, 737–746.
- Klinger C. R., Blazer S. V. y Echeverria C. 1996. Effects of dietary lipid on the hematology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Aquaculture, 147, 225-233.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. y Cox, M. M. Principios de bioquímica (2º ed.). Barcelona: OMEGA. 1993.
- Lin, M. and Shiau, Y., 2005. Dietary L-ascorbic acid affects growth, nonspecific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. Aquaculture 244, 215– 221.
- McLaren B.A., Keller E., O'Donnell D.J., Elvehjem C.A., 1947. The nutrition of rainbow trout, 1. Studies of vitamin requirements. Arch. Biochem. Biophys, 15, 169-178.
- Martínez F., 1976. Aspectos biopatológicos de truchas arcoiris (*Salmo gairdneri* Richardson) alimentadas con dietas hipergrasas. PhD Thesis. University of Madrid.
- Martínez-Palacios C. A., 1987. Aspects of the biology of (*Cichlasoma urophthalmus* Günther) with particular reference to its culture. PhD. Thesis, Institute of Acuaculture. University of Stirling. 1987. 321 pp.
- Masumoto T. Hardy R. W. y Stickney R. R. 1993. Pantothenic Acid Deficiency Detection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal Nutrition. 124: 430-435.
- Miyasaki, T., Sato, M. and Yoshinaka, R., 1993. Intestinal absorption and the activity of enzymatic hydrolysis of ascorbyl-2-phosphate in rainbow trout. Nippon Suisan Gakkaishi 59 (12), 2059-2064.
- Mohamed A. K. y Sambo A. B., 2007. Haematological assessment of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to sublethal concentrations of Portland cement powder in solution. Int. J. Zool. Res., 4, 48-52.
- Montero, D., Marrero, M., Izquierdo, M., Robaina, L., Vergara, J. and Tort, L., 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream *Sparus aurata* juveniles subjected to crowding stress. Aquaculture 171, 269–278.
- Murai, T., Andrews, J.W., 1979. Pantothenic acid requirement of channel catfish fingerlings. J. Nutr. 109, 1140-1142.

Natt M.P. y Herrick C.A., 1952. A new blood diluent for counting erythrocytes and leukocytes of the chicken. *Poultry Science* 31,735-738.

NRC (National Research Council)., 1983. Nutrient Requeriments of Warmwater Fishes and Shellfishes. Nutrient Requeriments of Domestic Animals Series. National Academy of Sciencies, Washington, DC, 102 pp.

Ogino, C. 1967. B vitamin requirements of carp. II. Requirements for riboflavin and pantothenic acid. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 33, 351-354.

Osuna-Durán B., 2009. Requerimiento nutricional de vitamina C y efectos de su deficiencia en el desarrollo de juveniles de pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*), (Steindachner, 1869). Centro De Investigación En Alimentación y Desarrollo, A.C. Mazatlán, Sinaloa.

Phillips, A. M. and Brocway, D. R. (1957). The nutrition of trout. IV. Vitamin requiremets. *Prog. Fish. Cult.*, 19, pp. 119-123.

Poston, H.A., Page, J.W., 1982. Gross and histological signs of dietary deficiency of biotin and pantothenic acid in lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Cornell Vet.* 72, 242-261.

Robbins, K.R., Saxton, A.M., Southern, L.L., 2006. Estimation of nutrient requirements using broken-line regression analysis. *J. Anim. Sci.*

Roem, A.J., Stickney, R.P., Kohler, C.C., 1991. Dietary pantothenic acid requirement of the blue tilapia. *Prog. Fish-Cult.* 53, 216-219.

Rojas, M., 1997. Dieta del "pargo colorado" *Lutjanus colorado* (Pisces: Lutjanidae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Revista Biología Tropical* 45 (3), 1173-1183.

Rojas, M., Maravilla, E. and Chicas B., 2004. Hábitos alimentarios del pargo mancha *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) en Los Cóbano y Puerto La Libertad, El Salvador. *Revista Biología Tropical* 52 (1), 163-170.

Shanthakumar M., Balaji M y Ramudu K., 1999. Effect of sublethal concentration of monocrotophos on erythropoietic activity and certain haematological parameters of fish *Anabus testudineus* (Bloch). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 63, 379-384.

Shepherd, C.J., Bromage, N.R., 1992. Intensive fish farming; Nutrition and growth. Blackwell scientific publications. 154-197 pp.

Shimeno, S., Hosokawa, H., Morie, H., Takeda, M., Ukawa, M., 1992. Inclusion of defatted soybean meal to diet for young yellowtail. *Suisanzoshoku* 40 (11, 51-56, (in Japanese).

- Smith C. M. y Song W.O., 1996. Comparative nutrition of pantothenic acid. J. Nutr. Biochem. 7:312-321.
- Soliman, A.K., Wilson, R.P., 1992. Water-soluble vitamin requirements of tilapia. I. Pantothenic acid requirement of blue tilapia, *Oreochromis aureus*. Aquaculture 104, 121-126.
- Tacon, A., 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de Capacitación. Proyecto Aquila II. Documento de Campo 4, FAO.
- Tacon A.G.J. 1985. Nutritional Fish Pathology Morphological signs of nutrient deficiency and toxicity in farmed fish. FAO.
- Tunison A.V., Phillips A.M., Shaffer H.B. Maxwell J.M., Brocway D.R. y McCay C.M. 1944. The nutrition of trout. Cortland Hatchery Report No. 13 for 1944. N.Y. Cons. Dep. Fish. Res. Bull. 6, 21 pp.
- Unna K. y Richards G.V., 1942. Relationship between pantothenic acid requirement and age in the rat. Jour. Nutrition, Vol. 23, 545-553.
- Wang, X., Kim, K., C. Bai, S., Huh, M. and Cho B. Y., 2004. Effects of the different levels of dietary vitamin C on growth and tissue ascorbic acid changes in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). Aquaculture 215, 203-211.
- Wen, Z.P., Zhou, X.Q., Feng, L., Jiang, J., Liu, Y., 2009. Effect of dietary pantothenic acid supplement on growth, body composition and intestinal enzyme activities of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). Aquac. Nutr. 15, 470-476.
- Wilson, R.P., Bowser, P.R., Poe, W.E., 1983. Dietary pantothenic acid requirement of fingerling channel catfish. J. Nutr. 113, 2124-2134.
- Woodward B., 1994. Dietary vitamin requirements of cultured young fish with emphasis on quantitative estimates for salmonids. Aquaculture 124, 133-168.
- Yu-Hung L., Hui-You L., Shiau, Shi-Yen., 2011. Estimation of dietary pantothenic acid requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus* according to physiological and biochemical parameters, Aquaculture. 2011.10.020.