



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

**TESIS:**

**“Requerimiento nutricional de vitamina C y efectos de su deficiencia  
en el desarrollo de juveniles de pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*),  
(Steindachner, 1869)”**

**POR:**

**Briseida Osuna Durán**

**MAZATLÁN, SINALOA; 27 DE NOVIEMBRE DE 2009.**

## CARTA DE APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la Ing. Briseida Osuna Durán, 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. Armando García Ortega  
Asesor de Tesis

---

Dr. Miguel Ángel Olvera Novoa  
Asesor de Tesis

---

M. en C. Luz Estela Rodríguez Ibarra  
Asesor de Tesis

---

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

## DECLARACIÓN DE LA INSTITUCIÓN

Se permiten citas breves sin permiso especial del autor, siempre y cuando, se otorgue el crédito correspondiente. Se podrá solicitar permiso al Director del Centro o Jefe del Área correspondiente del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Apartado Postal 1725, Hermosillo, Sonora, CP 83000, México, para citas o consultas más completas con fines académicos. En otras circunstancias, se deberá solicitar permiso al autor.

La publicación en comunidades científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar créditos al CIAD, previa aprobación escrita del Director.

---

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

## DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de vivir, disfrutar y aprender de todas las cosas que me ha dado.

A mis padres Esperanza y Miguel Ángel por su ejemplo de vida, por creer en mí y depositar su confianza para la realización de este proyecto, porque me han dado una buena educación, pero sobre todo por su enorme cariño; los amaré siempre.

A mis hermanos Miguel Ángel y Yamileth, por todos los momentos que hemos pasado juntos, por su apoyo incondicional y cariño.

A mi sobrina Romina, por arrancarme sonrisas y regalarme su ternura.

A mis abuelos Santiago y Rogelia, por ser como son, unas personas nobles y generosas, gracias por ser mis abuelos, los quiero.

A mi novio, Alfredo por estar conmigo en todo momento y darme fuerzas para seguir adelante cuando las cosas fueron difíciles para mí, te amo.

A mis compadres y ahijada, Horacio, Monserrat y Camila por abrirme las puertas de su hogar y hacerme parte de su familia, gracias.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo al proyecto CONACyt-CB 82992 “Determinación de los requerimientos de algunas vitaminas hidrosolubles en peces marinos de importancia comercial”.

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.

A la Dra. María Cristina Chávez Sánchez, por su apoyo y sus valiosas observaciones para la realización de este trabajo; además de haber sido una extraordinaria directora de tesis.

A mis asesores de tesis M. en C. María Isabel Abdo de la Parra, M. en C. Luz Estela Rodríguez Ibarra, Dr. Miguel Ángel Olvera Novoa, Dr. Armando García Ortega, por su apoyo para la realización de este trabajo.

A la M. en C. Selene María Abad Rosales, por sus consejos y ayuda para la realización de los cortes histológicos.

A la M. en C. Irma Eugenia Martínez Rodríguez por la realización del análisis de las dietas e hígado de los peces experimentales por el método HPLC.

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

Al M. V. Z. Rodolfo Lozano Olvera y a la Biol. Rosa María Medina Guerrero, por su gran ayuda en la preparación de las muestras histológicas.

A la M. en C. Ana C. Puello Cruz y Virginia Patricia Domínguez Jiménez por prestarme equipo de su laboratorio.

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

Al Ingeniero Francisco Negrete de DSM Nutritional Products por proporcionarnos la mezcla de vitaminas y minerales, nuestro agradecimiento por su apoyo.

Al M. en C. Edgar Sánchez Zazueta por su apoyo en la modelación del efecto de la vitamina C en el crecimiento de juveniles de *Lutjanus guttatus*.

A Manuel Cruz, Oscar, Cesar, Cecilia Peraza, Biol. Jesús Armando Ibarra Soto, Biol. Horacio e Ing. Alfredo, por su gran ayuda técnica en la etapa experimental.

Al club de feás, Cecy, Elva y Nayelli, por su valiosa amistad y estar conmigo en las buenas y en las malas.

A Katia Y. Preciado por brindarme su ayuda para obtener bibliografía.

A mis compañeros: Abril, Alma, Anny, Bety, Felipe, Giovanni, Horacio, Lorenzo y Yeni, por todos los momentos que pasamos juntos.

A todas aquellas personas que de una u otra forma participaron en la realización de esta tesis.

## CONTENIDO

CARTA DE APROBACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE LA INSTITUCIÓN.....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
ÍNDICE DE TABLAS .....	x
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
1.INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES .....	5
2.1. Acuicultura.....	5
2.2. Género Lutjanus .....	6
2.3. Requerimiento de Vitaminas en Distintas Especies de Peces.....	7
2.4. Vitamina C (Ácido Ascórbico) .....	9
2.5. Requerimiento de Vitamina C (Ácido Ascórbico) en Peces.....	10
3. HIPÓTESIS .....	15
4. OBJETIVOS .....	15
4.1. Objetivo General .....	15
4.2. Objetivos particulares .....	165
5. METODOLOGÍA.....	156
5.1. Periodo Experimental.....	16

5.2. Dieta Experimental .....	16
5.3. Sistema Experimental.....	20
5.4. Peces Experimentales.....	211
5.5. Régimen de Alimentación .....	22
5.6. Variables de Respuesta .....	233
5.7. Análisis Histológico.....	255
5.7.1. Técnicas Especiales de Tinción. ....	266
5.7.2 Criterios Utilizados para Determinar el Grado de Severidad de los Signos Clínicos Reportados en este Trabajo.....	26
5.7.3. Proporción de Órganos Afectados.....	277
5.8. Diseño Experimental y Análisis Estadístico .....	258
6.RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	299
6.1 Determinación de la Composición Proximal y de la Concentración de Vitamina C en las Dietas Experimentales.....	29
6.2. Análisis Proximal de la Composición Corporal de los Peces. ....	30
6.3. Variables de respuesta. ....	303
6.3.1. Crecimiento en peso.....	333
6.3.2. Tasa de Conversión Alimenticia.....	334
6.3.3. Requerimiento Óptimo de Vitamina C. ....	335
6.4. Signos Clínicos Externos .....	388



6.5. Determinación de la Concentración de Vitamina C en el Hígado de los Pargos Experimentales.....	42
6.6. Análisis Histológico.....	444
6.6.1. Análisis Histológico de los Peces Iniciales.....	444
6.6.2. Análisis Histológico de los Peces Experimentales. ....	444
6.6.3. Alteraciones Histológicas Observadas en el Hígado.....	466
6.6.4. Alteraciones Histológicas Observadas en el Riñón.....	52
6.6.5. Alteraciones Histológicas Observadas en el Cerebro. ....	57
6.6.6. Alteraciones Histológicas Observadas en las Branquias. ....	61
7. CONCLUSIONES .....	677
8. RECOMENDACIONES .....	688
9. LITERATURA CITADA.....	699

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Dieta control para la alimentación de los juveniles experimentales. ....	17
<b>Tabla 2.</b> Escala de valores para determinar el grado de severidad de los signos clínicos por deficiencia de vitamina C. ....	277
<b>Tabla 3.</b> Composición proximal y concentración final de vitamina C (L-ascorbil-2 polifosfato) en las dietas experimentales. ....	299
<b>Tabla 4.</b> Análisis proximal corporal de los pargos experimentales.....	30
<b>Tabla 5.</b> Promedios de las variables biológicas evaluadas en los pargos experimentales. ....	333
<b>Tabla 6.</b> Requerimiento de vitamina C óptimo (mg/kg de dieta) para el crecimiento de diferentes especies de peces marinos, obtenidos a partir de distintas investigaciones. .	377
<b>Tabla 7.</b> Concentración de vitamina C en el hígado de los pargos experimentales en función de las dietas.....	422
<b>Tabla 8.</b> Cambios patológicos observados en diversos órganos en los pargos experimentales alimentados con diferentes niveles de vitamina C.....	425

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura química de la vitamina C (ácido ascórbico).....	200
<b>Figura 2.</b> Procedimiento para la elaboración de las dietas experimentales: a) el molido de las harinas, b) mezcla, c) elaboración de pelets, d) secado y e) almacenaje en refrigeración hasta su uso.....	208
<b>Figura 3.</b> Tanques experimentales empleados para la realización del bioensayo.....	20
<b>Figura 4.</b> Ejemplar de pargo flamenco.....	220
<b>Figura 5.</b> Relación entre la concentración de LA2PP y el contenido de lípidos en el cuerpo de los pargos experimentales.....	31
<b>Figura 6.</b> Relación entre la concentración de LA2PP y el contenido de proteína en el cuerpo de los pargos experimentales.....	31
<b>Figura 7.</b> Variación de la Tasa de Conversión Alimenticia en función de la dieta evaluada durante el periodo experimental.....	34
<b>Figura 8.</b> Correlación con punto de quiebre, entre la concentración de LA2PP de las dietas experimentales y el peso ganado por los pargos experimentales.....	366
<b>Figura 9.</b> Erosión de las aletas y descamación.....	19
<b>Figura 10.</b> Oscurecimiento de la piel.....	19
<b>Figura 11.</b> Pargo con color, escamas y piel normal ..... <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	9
<b>Figura 12.</b> Proporción de pargos juveniles que presentaron signos clínicos en función de la concentración de vitamina C.....	40
<b>Figura 13.</b> Relación entre la concentración de vitamina C ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ de dieta) en las dietas experimentales y el nivel de almacenamiento de vitamina C en el hígado de los pargos experimentales.....	493

<b>Figura 14.</b> Hepatopáncreas de un pez experimental, con tejido sin patologías, hígado (flecha delgada); páncreas (flecha gruesa), barra 10μ H&E.....	499
<b>Figura 15.-</b> Granulomas hepáticos (flechas delgadas), presentes en las dietas con 82-718 mg/kg, también se puede observar degeneración grasa (flechas gruesas), barra 10μ H&E. ....	49
<b>Figura 16.</b> Granulomas compuestos de capas concentricas de células epiteloides que forman una lesión esférica que encapsula a las bacterias (flechas delgadas); presentes en las dietas con niveles de 0 a 47 mg/kg , también se muestra degeneración grasa en grado 4 (flecha gruesa), barra (20μ) H&E .....	50
<b>Figura 17.-</b> Identificación positiva de <i>Mycobacterium sp.</i> a través del método de tinción de Ziehl Neelsen, barra (20μ) .....	50
<b>Figura 18.</b> Riñón de un pez experimental, con tejido sin patologías. Glomerulos (flechas delgadas) túbulos (flechas gruesas), barra (20μ) H&E.....	533
<b>Figura 19.</b> Porción del riñón posterior de los peces experimentales que fueron alimentados con la dieta VC0, muestra atrofia glomerular con clara dilatación de los vasos sanguíneos (flechas delgadas), atrofia de túbulos proximales (doble flecha) y vacuolación de los túbulos renales distales (flecha gruesa), barra (20μ) H&E.. .....	533
<b>Figura 20.</b> Varios túbulos renales con vacuolas. Estos cambios fueron observados en los peces experimentales que fueron alimentados con un nivel de inclusión de vitamina C de ≤47 mg/kg, barra (20μ), H&E.....	544
<b>Figura 21.</b> Corte del riñón de los peces experimentales que fueron alimentados con un nivel de vitamina C de 20 mg/kg, muestra atrofia glomerular con dilatación en sus vasos sanguíneos, barra (20μ) H&E. ....	544
<b>Figura 22.-</b> Neuronas de un pez experimental de la dieta VC718, donde se observa el tejido sin patologías con su núcleo central y la sustancia de Nissl (retículo endoplasmático rugoso) distribuída homogéneamente, barra (20μ), H&E. ....	599
<b>Figura 23.-</b> . Cerebro de los peces experimentales que fueron alimentados con la dieta VC0, cuyas neuronas presentan migración del núcleo y concentración de los gránulos de Nissl en la periferia, barra (20μ) H&E. ....	599
<b>Figura 24.-</b> Necrosis de las células de Purkinjie de los peces alimentados con VC0 en las que se observan núcleos excéntricos (flecha delgada), citoplasma con eosinofilia	

intensa y marginación periférica de la la sustancia de Nissl (flecha gruesa), barra (20 $\mu$ ), H&E. ....60

**Figura 25.-** Neurona de peces experimentales alimentados con la dieta VC20, con clara cromatólisis central en donde se observa migración del núcleo a la periferia con marginación periférica de la sustancia de Nissl, barra (20 $\mu$ ), H&E.....60

**Figura 26.-** Branquias de un pez experimental de la dieta VC718, donde se observan las lamelas primarias y secundarias sin patologías, barra (100 $\mu$ ), H&E.....633

**Figura 27.-** Porción de la lamela branquial de los peces experimentales alimentados con la dieta VC0, muestra hiperplasia (flechas delgadas), edema (flechas gruesas), barra (20 $\mu$ ), H&E. ....63

**Figura 28.-** Branquias de peces experimentales alimentados con VC20, con hipertrofia de condrocitos, barra (20 $\mu$ ) H&E.....644

**Figura 29.-** Porción de la lamela branquial de los peces experimentales alimentados con la dieta VC0, muestra hiperplasia (flecha delgada), telangiectasis (doble flecha) y edema (flecha gruesa), barra (20 $\mu$ ) H&E. ....644

**Figura 30.-** Branquias de los peces alimentados con VC20, con acortamiento de las lamelas secundarias y deformación del cartilago debido a la hipertrofia de los condrocitos, barra (20 $\mu$ ) H&E .....645

**Figura 31.-** Branquias con clara infiltración de linfocitos en el arco branquial y aumento de las células de moco de los peces alimentados con VC0, barra (20 $\mu$ ), H&E.....64

5

## RESUMEN

En el presente estudio, se estableció el requerimiento nutricional de vitamina C y el efecto de su deficiencia en el desarrollo de juveniles de *Lutjanus guttatus*. Se elaboraron seis dietas experimentales con una dieta basal formulada para proporcionar 45 % de proteína y 11 % de lípidos; a dichas dietas, se les incluyeron diferentes concentraciones de vitamina C en la forma de L-ascorbil-2-polifosfato (LA2PP). Las concentraciones de LA2PP evaluadas fueron 0, 20, 47, 82, 177 y 718 mg/kg de alimento (designadas como VC0, VC20, VC47, VC82, VC177 y VC718, respectivamente). El sistema estuvo compuesto por 21 tanques de fibra de vidrio con una capacidad de 600 l c/u. Se colocaron 20 pargos juveniles ( $8\pm 1.85$  g) en cada tanque (33 peces/m<sup>3</sup>). Los peces fueron alimentados con las dietas experimentales durante 13 semanas a saciedad aparente tres veces por día y se mantuvieron a una temperatura promedio de  $24.8\pm 0.10$ . Se calculó el Peso Ganado (PG), Tasa de Crecimiento (TC), Tasa de Crecimiento Específico (TCE) y Tasa de Conversión Alimenticia (TCA). Durante el experimento se llevaron a cabo observaciones de las señales clínicas externas causada por la deficiencia de LA2PP. Se observó erosión de las aletas, oscurecimiento de la piel, descamación y nado errático. Al final del experimento, se comparó la cantidad de LA2PP almacenada en el hígado y se realizó el análisis histopatológico para cada tratamiento. De acuerdo con los resultados obtenidos, el PG, TC y TCE de los pargos alimentados con la dieta VC0 fue el más bajo, mientras que los peces alimentados con la dieta VC177 mostraron el valor más alto de PG y TCE; sin embargo, esa dieta no fue significativamente diferente ( $P>0.05$ ) a VC82 y VC718. Por su parte, en la TCA no se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) entre los tratamientos evaluados. El análisis de punto de quiebre indicó que los juveniles de *L. guttatus*, requieren una concentración de 137 mg de L-áscorbil-2-polifosfato (47 mg de ácido ascórbico/kg de su dieta) para obtener el máximo crecimiento. Después de ocho semanas de evaluación, se presentaron signos clínicos externos por deficiencia de vitamina C en los pargos juveniles alimentados con VC0 a VC82. La concentración de LA2PP en el hígado de los peces aumentó proporcionalmente al incremento de la concentración de LA2PP en las dietas. Respecto al análisis histológico, se observaron alteraciones en el hígado, riñón cerebro y branquias de los peces alimentados con las dietas VC0-VC47. Conforme se incrementó la concentración de LA2PP en la dieta, disminuyó la presencia y el grado de severidad de las alteraciones histopatológicas, incluso desaparecieron en el cerebro. Entre las alteraciones histopatológicas observadas se encuentran: identificación positiva de *Mycobacterium* sp. y degeneración grasa en el hígado; el riñón mostró vacuolación en los túbulos renales, atrofia glomerular y dilatación de los vasos sanguíneos. En el cerebro, las neuronas presentaron su núcleo excéntrico con clara cromatólisis central y pérdida del núcleo. Por su parte las branquias presentaron hipertrofia de condrocitos, hiperplasia del epitelio, telangiectasis, edema lamelar multifocal, infiltración de linfocitos, incremento de las células de moco y acortamiento de las lamelas secundarias.

pérdida del núcleo. Por su parte las branquias presentaron hipertrofia de condrocitos, hiperplasia del epitelio, telangiectasis, edema lamelar multifocal, infiltración de linfocitos, incremento de las células de moco y acortamiento de las lamelas secundarias.

## 1. INTRODUCCIÓN

Por largo tiempo la producción pesquera ha proporcionado la mayor parte de los productos acuáticos comestibles; sin embargo, hoy en día ha llegado a su nivel máximo sustentable, por lo que la producción pesquera no se incrementa de la misma forma que si lo hace la demanda de productos pesqueros por el crecimiento de la población. Un aspecto favorable, es que la acuicultura en el 2006 proporcionó 47 % de los 110 millones de toneladas de productos acuáticos, casi la mitad del pescado consumido por la población mundial, satisfaciendo una parte de la creciente demanda y compensando la baja producción obtenida de la captura (FAO, 2008).

En México se han identificado varias especies marinas con potencial acuícola, entre las que destacan los robalos (*Centropomus undecimalis* y *C. medius*), el pámpano y palometa (*Trachinotus carolinus* y *T. falcatus*), los lenguados (*Paralichthys californicus* y *P. woolmani*), el botete (*Sphoeroides annulatus*), el huachinango y el pargo flamenco (*Lutjanus campechanus* y *Lutjanus guttatus*), el mero (*Epinephelus morio*), la cabrilla sardinera (*Mycteroperca sp.*), el jurel (*Seriola lalandi*) y el atún (*Thunnus thynnus* y *T. albacares*), (Avilés, 2002).

El pargo flamenco *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869), es una especie demersal que habita en arrecifes costeros hasta unos 30 metros de profundidad, generalmente solitario o en pequeños cardúmenes. En su etapa juvenil, habita en estuarios y bocas de ríos (Allen, 1985). Es depredador con distintos hábitos alimenticios, en su hábitat natural se alimenta de peces, crustáceos, moluscos y poliquetos (Rojas, 1997).



Estudios iniciales en la Unidad Mazatlán del CIAD indican que es una especie con alto potencial de cultivo, debido a que se adapta fácilmente a las condiciones en cautiverio y al alimento formulado, además de que actualmente se comercializa a un buen precio en el mercado. Por ello es importante llevar a cabo investigaciones sobre aspectos de su fisiología tales como la reproducción, tolerancia a distintos aspectos medio ambientales, nutrición, y enfermedades.

La nutrición es un aspecto importante, ya que actualmente para generar volúmenes significativos de producción de biomasa y disminuir el tiempo para obtenerlos, se formulan dietas específicamente balanceadas con un nivel de proteína, grasas, fibra y micronutrientes como minerales y vitaminas que permiten optimizar el desarrollo de los peces en cultivo (Akiyama, 1995).

Entre los micronutrientes utilizados para formular dietas balanceadas destacan las vitaminas, las cuales son un grupo de compuestos orgánicos heterogéneos requeridos como trazas y que son esenciales para el desarrollo adecuado del pez. Algunos de estos micronutrientes deben ser ingeridos en su dieta puesto que dichos organismos no pueden sintetizarlas (Lenntech, 2004). Las vitaminas difieren de los otros nutrientes principales (proteínas, lípidos y carbohidratos) en que éstas no están químicamente relacionadas unas con otras y existen en cantidades muy pequeñas dentro de las materias alimenticias de origen animal y vegetal (Tacon, 1989).

Se han aislado aproximadamente 15 vitaminas a partir de materiales biológicos; su condición de esencial depende de las características biológicas y fisiológicas de las especies (Lenntech, 2004). Las vitaminas se clasifican en dos grandes grupos dependiendo de su solubilidad, las hidrosolubles y las liposolubles (Lovell, 1989). Las vitaminas liposolubles son las absorbidas por el tracto gastrointestinal en la presencia de grasas y pueden ser almacenadas en las reservas lipídicas corporales (Tacon, 1989); por su parte, las vitaminas hidrosolubles son las que han adquirido mayor importancia en la fabricación de los alimentos balanceados para la acuicultura, ya que pueden perderse

fácilmente durante la preparación o almacenaje inadecuado de los alimentos o al estar en contacto con el agua antes de ser consumidas por los peces (Akiyama, 1995).

Entre las vitaminas hidrosolubles destaca la vitamina C (ácido ascórbico), la cual es un compuesto de carbono, glucosa y hexosa (Lovell, 1989). Esta vitamina es esencial para los peces teleósteos porque carecen de la capacidad para sintetizarla debido a la falta de la enzima L-gulonolactona oxidasa (Wilson, 1973; Yamamoto *et al.*, 1978).

La vitamina C está involucrada en diferentes procesos fisiológicos de los peces, destacando el crecimiento, ya que es necesaria para la formación de colágeno y cartílago, interviene en el desarrollo normal y mantenimiento del tejido conectivo y tejido óseo y juega un papel importante en la reparación del tejido dañado (Panush y Delafuente, 1985; Frischknecht *et al.*, 1994; Verlhac *et al.*, 1996).

El ácido ascórbico es importante para prevenir la oxidación de los órganos; puede encontrarse almacenada en el cerebro, hígado, riñón y su concentración está relacionada con la ingesta (Gabaudan y Verlhac, 2001; Ríos *et al.*, 2006).

De acuerdo con Murray *et al.* (1993), se considera que el hígado de los peces es un buen indicador del nivel de almacenamiento de vitamina C, puesto que en dicho órgano se deposita después de ser absorbida en el intestino y por ser el sitio a partir del cual se distribuye a los tejidos que la requieran. Ai *et al.* (2004), indican que el nivel de almacenamiento máximo de vitamina C en el hígado de los peces se presenta cuando estos organismos han cubierto su requerimiento para realizar sus procesos fisiológicos, por lo que mencionan que es importante la evaluación del nivel de almacenamiento en dicho órgano.

La falta de vitamina C en la dieta de peces se refleja en signos clínicos (manifestaciones consecuentes de una alteración de la salud) por deficiencia. Entre estos signos clínicos se encuentran: 1.- Los que pueden observarse a simple vista (escoliosis, lordosis, nado errático, opérculos deformes, oscurecimiento de la piel). 2.- Cambios histopatológicos

(alteraciones a nivel celular y tisular tales como hipertrofia, hiperplasia y telangiectasis en las lamelas branquiales, atrofia glomerular, separación de la cápsula de Bowman y dilatación túbular en el riñón), (Alexis *et al.*, 1997; Phromkunthong *et al.*, 1997; Adham *et al.*, 2000).

En función de que la vitamina C representa un factor determinante para el adecuado crecimiento y estado de salud de los peces y que es fácilmente susceptible de perderse durante la elaboración de las dietas, el almacenamiento y al ingresar al agua en los sistemas de cultivo, con el presente trabajo se pretende optimizar el suministro de vitamina C en la dieta del pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*) de tal forma que se incremente su crecimiento y se minimice la posibilidad de que se presenten patologías nutricionales durante su cultivo.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Acuicultura

Con el fin de contar con información acerca de la producción generada por la acuicultura y su importancia en términos de producción de alimento, en especial el aporte de proteína para consumo humano, la FAO (2008), realizó un estudio a partir del cual determinó que la producción mundial de acuicultura suministró alrededor de 51.7 millones de toneladas de pescado para consumo humano en 2006, equivalente al 47 % de la producción total.

La actividad pesquera en México está en crisis debido a la sobrepesca, cambios del medio ambiente y a la contaminación (Chávez *et al.*, 2008). Ante tal problemática, la maricultura es una opción para mantener e inclusive incrementar la producción de alimentos, empleos y divisas, sin embargo, en el país la maricultura comercial está limitada a pocas especies, principalmente de camarones y ostiones; no obstante, en la actualidad se estudian alternativas con peces marinos y otros moluscos y crustáceos (Chávez *et al.*, 2008). En relación con el cultivo de peces marinos, existe un caso de éxito reciente; se trata de la especie barramundi (*Lates calcarifer*), cuya producción en el 2005 alcanzó las 30,000 toneladas (Álvarez y Tsuzuki, 2008). Actualmente, un número importante de pescadores de distintas partes del Pacífico mexicano están demandando la producción de crías de pargo para ser cultivadas en jaulas, por lo que se están realizando esfuerzos para lograr su producción.

## 2.2. Género *Lutjanus*

Referente a las especies de pargos del género *Lutjanus*, se han realizado distintos estudios que han permitido conocer mejor su biología y fisiología en su hábitat natural, lo cual ha servido como base para la producción de organismos bajo condiciones controladas. Entre dichos estudios destacan el de Rojas *et al.* (2004), quienes establecieron los hábitos alimenticios del pargo *L. guttatus* en el Salvador; Santamaría *et al.* (2005), determinaron los hábitos alimenticios del pargo amarillo *L. argentiventris* y del pargo rojo *L. colorado* en el norte de Sinaloa, México, en función de la época del año, el sexo y la talla. Amezcua *et al.* (2006) estudiaron la edad, crecimiento y mortalidad del pargo *L. guttatus* del sureste del Golfo de California. Por su parte, Arellano *et al.* (2001), investigaron y establecieron el ciclo reproductivo anual del pargo flamenco (*L. guttatus*) en las costas de Guerrero, México, encontrando que esta especie mantiene una proporción sexual de 1:1 y se reproduce prácticamente todo el año, siendo los periodos reproductivos principales marzo-abril y agosto-noviembre.

En relación al cultivo de especies de pargos, se han reportado algunos avances en la producción de larvas del pargo rojo del Pacífico (*L. peru*) y el pargo flamenco (*L. guttatus*); sin embargo, las altas mortalidades fueron en los primeros años de estudio un obstáculo para lograr una producción exitosa (García y Lazo, 2004). En relación con lo anterior, Álvarez (2006), indujo el desove de reproductores maduros del pargo flamenco (*L. guttatus*) por primera vez en cautiverio con implantes intraperitoneales (IP), durante el periodo de junio y julio de 2005, obteniendo huevos de alta calidad en el 80 % de los desoves. Ibarra y Álvarez (2009), realizaron un experimento con este mismo objetivo, utilizando implantes de 50 µg/pez, 75 µg/pez y 100 µg/pez, resultando más eficiente para lograr desoves en el pargo flamenco recientemente capturado el implante de 75 µg/pez. Por su parte, Ibarra y Duncan (2007), evaluaron el efecto de la hormona liberadora de gonadotropina para el desove del pargo *L. guttatus*. Como resultado se

obtuvieron huevos de buena calidad que permitieron la experimentación con el cultivo larvario.

En relación al aspecto nutricional, los primeros protocolos de cultivo larvario de *L. guttatus* reportan el uso de alimento vivo y de microdietas en la producción de larvas y juveniles (García *et al.*, 2005). Posteriormente se han realizado varios trabajos para determinar los requerimientos nutricionales y desarrollar alimentos para el pargo flamenco *L. guttatus* (García, 2009). En un experimento orientado a determinar el requerimiento de proteína del pargo flamenco (*L. guttatus*) en la fase de engorda (>140 g de peso inicial), García *et al.* (2004), determinaron que la especie necesita de un nivel de proteína de 40 % para un crecimiento óptimo. Otro estudio acerca de juveniles de *L. guttatus* fue el realizado por Hernández (2007), en el que se llevaron a cabo dos experimentos. En el primero se probaron nueve dietas semipuras con tres niveles distintos de proteína (40, 45 y 50 %) y tres niveles de lípidos (9, 12 y 15 %). En el segundo experimento se formularon dos dietas con el nivel de proteína y lípidos que produjeron mejor crecimiento de la especie en el experimento 1 (45 % de proteína y 9 % de lípidos) utilizando como fuente de nutrientes calamar en una dieta y gónada de atún en la otra. Los peces alimentados con la dieta de calamar obtuvieron mayor incremento en peso, tasa de eficiencia alimenticia y tasa de eficiencia proteica ( $P < 0.05$ ).

### 2.3. Requerimiento de Vitaminas en Distintas Especies de Peces

En el caso de los niveles adecuados de vitaminas, no existen actualmente estudios sobre los requerimientos de estos nutrientes en el pargo flamenco *L. guttatus*; sin embargo, existen investigaciones sobre otras especies de peces marinos. A continuación se presentan algunas de ellas.

Grahl-Madsen *et al.* (1997), evaluaron diferentes concentraciones de vitamina K en la dieta de juveniles de bacalao (*Gadus morhua*). De acuerdo con sus resultados, el nivel mínimo requerido para el máximo crecimiento fue de 0.2 mg/kg de dieta.

Hamre *et al.* (1997), realizaron un estudio acerca de la interacción de la vitamina C y E en juveniles de salmón del atlántico (*Salmo salar*). Encontrando que la vitamina C tiene un efecto sinérgico con la vitamina E al proteger a tejidos como el hígado contra la oxidación.

Ortuño *et al.* (2001), evaluaron el efecto sinérgico de la vitamina C y E en juveniles de dorada (*Sparus aurata*). Sus resultados mostraron que los peces que fueron alimentados con la interacción de 3 g de vitamina C y 1.2 g de vitamina E/kg de dieta, tuvieron mayor actividad fagocítica y complementaria después de 30 días de evaluación.

Mohamed *et al.* (2003), en juveniles de mero lutria (*Epinephelus tauvina*), evaluaron ocho dietas semipuras con diferentes concentraciones de vitamina A (210, 476, 914, 1774, 3764, 7063, 14,342 y 29,193 IU), obteniendo que los peces alimentados con la dieta con una concentración de 210 UI/kg desarrollaron signos clínicos como hemorragias en la piel y en la base de las aletas. Así mismo estimaron que el requerimiento mínimo de vitamina A para obtener el máximo crecimiento es de 3101 UI/kg.

Paul *et al.* (2004), evaluaron el requerimiento de vitamina E en juveniles de carpa mrigal (*Ciprinius mrigala*), en base a su desarrollo y composición corporal. Determinaron que los peces alimentados con la dieta cuya concentración fue de 99 mg de tocoferol/kg de alimento, tuvieron mayor ganancia en peso, tasa de crecimiento específico, eficiencia proteica y el factor de conversión alimenticia más bajo.

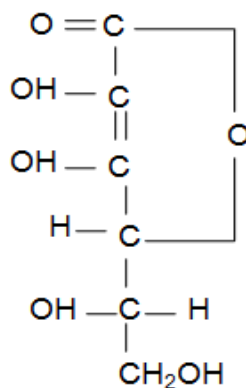
Fontagné *et al.* (2006), evaluaron el efecto de los lípidos oxidados y de la vitamina A como antioxidante en juveniles de esturión (*Acipenser baeri*). Concluyeron que un aumento del estrés oxidativo da como resultado un escaso crecimiento y supervivencia, mientras que una dieta con una concentración de 771.500 UI de vitamina A/kg de alimento, contrarresta parcialmente los efectos negativos de los lípidos oxidados.

Hernández *et al.* (2007), realizaron un estudio acerca del efecto que tiene la vitamina A en el crecimiento, actividad antibacteriana y glutamil pirúvico transaminasa en juveniles de hirame *Paralichthys olivaceus*. Evaluaron tres dietas semipuras con diferentes concentraciones de vitamina A (0, 10,000 y 25,000 UI/kg). De acuerdo con sus resultados, al incrementar los niveles de vitamina A se presentó mayor crecimiento e incremento de los niveles de hematocrito, albúmina, actividad de glutamil pirúvico transaminasa y actividad bacteriana.

#### 2.4. Vitamina C (Ácido Ascórbico)

La vitamina C o ácido ascórbico fue aislada por primera vez en forma pura y cristalizada a partir del jugo de limón por los bioquímicos americanos King y Waugh en 1932 (Lehninger, 1994). Por su parte, Lovell (1989), Tacon (1989), Lehninger (1994), Merchie *et al.* (1995) y Basabe (2000), indican que el ácido ascórbico es una vitamina compuesta de seis átomos de carbono y estructuralmente relacionada con la glucosa y otras hexosas (Fig. 1) y tiene propiedades antioxidantes e hidrosolubles. De acuerdo con Guillaume (2004), participa en procesos de óxido-reducción por la interconversión reversible entre su forma reducida (ácido ascórbico) y su forma oxidada (ácido dehidro-ascórbico).





**Figura 1.** Estructura química de la vitamina C (Ácido ascórbico)

Como función biológica, actúa como antioxidante fisiológico al facilitar el transporte de hidrógeno dentro de la célula animal. También se requiere como intermediario para llevar a cabo dentro del cuerpo numerosas reacciones que permiten la síntesis de aminoácidos tales como triptófano, tirosina, lisina, fenilalanina, prolina y colágeno, lo cual juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad del tejido conectivo, vasos sanguíneos, tejido óseo y reparación del tejido dañado, además es esencial para la cicatrización de las heridas (Wahli *et al.*, 2003).

El ácido ascórbico sirve como un cofactor en la hidroxilación de reacciones implicadas en la excreción de sustancias tóxicas (O'Keefe y Grant, 1991). Así mismo está involucrado en la respuesta al estrés, puesto que se almacena en tejidos donde se lleva a cabo la biosíntesis de catecolamina y se liberan corticosteroides (Dabrowski, 2001).

### 2.5. Requerimiento de Vitamina C (Ácido Ascórbico) en Peces

Se han realizado un número importante de estudios relacionados con la influencia de la vitamina C en procesos fisiológicos de los peces. Se ha estudiado su absorción, su relación con la reproducción, crecimiento y sistema inmunológico. También se ha estudiado el nivel de almacenamiento en órganos y los efectos provocados por la

deficiencia de esta vitamina. A continuación se presentan brevemente los resultados obtenidos en algunos de ellos.

Miyasaki *et al.* (1993), estudiaron la absorción intestinal y la actividad de la hidrólisis enzimática del L-ascorbil-2 fosfato (LA2P) en la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Encontraron que el LA2P es absorbido en el intestino y el ácido ascórbico fue detectado en el fluido seroso; la hidrólisis enzimática desde LA2P hasta ácido ascórbico se encontró en los ciegos pilóricos, en el intestino e hígado.

Blom y Dabrowski (1996), estudiaron el efecto de dos concentraciones de ácido ascórbico (AA), (20 y 500 mg/kg de dieta) en la progenie de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). De acuerdo con los autores, las mortalidades fueron superiores cuando la madre fue alimentada con la concentración de 20 mg/kg.

Alexis *et al.* (1997), evaluaron las alteraciones patológicas provocadas por la falta de vitamina C en la dieta de juveniles de la dorada (*Sparus aurata*). Los signos histopatológicos observados fueron daño túbular, glomerulonefritis, respuesta inflamatoria y granulomas en el riñón, mientras que los signos externos encontrados fueron anorexia, pérdida de escamas, despigmentación y hemorragias.

Henrique *et al.* (1998), realizaron un estudio de 12 semanas para establecer el requerimiento de L-ascorbil-2 polifosfato (LA2PP) de la dorada (*Sparus aurata*) y evaluar su efecto en la respuesta al estrés. De acuerdo con sus resultados, no encontraron diferencia significativa en la tasa de crecimiento; sin embargo, los niveles de cortisol fueron significativamente más bajos en los peces alimentados con un nivel de LA2PP mayor a 100 mg/kg de su dieta ( $P < 0.05$ ).

Aguirre y Gatlin (1999), probaron durante 10 semanas una dieta semipurificada isoenergética para juveniles de corvina (*Sciaenops ocellatus*), conteniendo 0, 10, 20, 30, 45, 60, 75 y 150 mg de polifosfato de áscorbato (PPA)/kg de dieta como suplemento de vitamina C. A partir de sus resultados determinaron que los peces alimentados con las dietas cuya concentración fue menor a 10 mg/kg presentaron los signos clínicos lordosis, escoliosis y pérdida de equilibrio.

Montero *et al.* (1999), en un experimento realizado con juveniles de dorada (*Sparus aurata*), analizaron el efecto del ácido ascórbico (AA) como respuesta al estrés. Estos autores mencionan que el AA evita que se incrementen los niveles de cortisol, actividad de lisozima, actividad complementaria y glucosa.

Dabrowski (2000), evaluó la absorción del ácido ascórbico en la forma de sulfato de ácido ascórbico (SAA) en la carpa común (*Cyprinus carpio*). Sus resultados mostraron que el mayor sitio de absorción está localizado en la parte anterior del intestino, también encontraron pequeñas cantidades de SAA en el intestino y el vaso, por lo que concluyó que estos peces cyprinidos son capaces de utilizar el SAA como fuente de vitamina C.

Adham *et al.* (2001), realizaron un estudio acerca de la deficiencia de ácido ascórbico (AA) en juveniles de bagre africano (*Clarias gariepinus*). Observaron que la privación de AA en la dieta de ese pez, ocasiona alteraciones histopatológicas tales como hipertrofia y telangiectasis de las lamelas branquiales y desprendimiento de la cápsula de Browman en el riñón.

Wang *et al.* (2003), realizaron un estudio para determinar el requerimiento de L-ascorbil-2 monofosfato (LA2MP) del pez loro japonés (*Oplegnathus fasciatus*), en base al peso ganado y el nivel de almacenamiento de ácido ascórbico (AA) en tejidos como el músculo, hígado, branquias y cerebro. A partir de sus resultados determinaron que esa especie requiere un nivel de 118 mg de LA2MP/kg de dieta para el máximo crecimiento. Observaron que en los órganos de los peces alimentados con una concentración de 50

mg de AA/kg de dieta, el contenido de la vitamina fue significativamente menor que en los alimentados con las concentraciones de 205, 426 y 1869 mg/kg de dieta. Los peces alimentados con la dieta libre de LA2MP presentaron anorexia, reducción del crecimiento, coloración oscura y alta mortalidad.

Wang *et al.* (2003), evaluaron el efecto de L-ascorbil-2-monofosfato Ca (LA2MP-Ca) y L-ascorbil-2-monofosfato-Na/Ca (LA2MP-Na/Ca), sobre el crecimiento y el nivel de almacenamiento de ácido ascórbico (AA) en el músculo y el hígado de juveniles de chancharro coreano (*Sebastes schlegeli*). Después de dos semanas de alimentación, determinaron que la concentración de AA en el músculo y el hígado aumentó al incrementar los niveles en la dieta. El peso ganado y la eficiencia alimenticia fueron significativamente menores en los peces alimentados con la dieta que careció de vitamina C, así mismo establecieron que el requerimiento para obtener el máximo crecimiento es de 101 mg de LA2MP-Na/Ca y 112 mg de LA2MP-Ca/kg de dieta. A partir de la novena semana se desarrollaron los signos clínicos anorexia, nado errático, coloración oscura y pérdida de peso en los peces alimentados con la dieta que careció de vitamina C.

Ai *et al.* (2004), investigaron el nivel de almacenamiento de ácido ascórbico (AA) en el músculo e hígado de juveniles del serránido japonés (*Lateolabrax japonicus*). En función de sus resultados, determinaron que la concentración de almacenamiento máximo de AA en el músculo e hígado fue de 207.2 y 93.4 mg/kg de dieta respectivamente.

Lin y Shiau (2005), evaluaron el requerimiento de ácido ascórbico (AA) en juveniles de mero malabárico (*Epinephelus malabaricus*) para fortalecer su respuesta inmune a infecciones bacterianas (*Vibrio carcharia*). Las concentraciones utilizadas fueron de 0, 20, 50, 80, 150, 250, 400 y 800 mg/kg de dieta. Determinaron que concentraciones iguales o superiores a 50 mg/kg de dieta produjeron significativamente mayor ganancia en peso y eficiencia alimenticia. Además sus resultados mostraron que los peces

alimentados con una concentración  $\geq 76$  mg/kg de dieta tuvieron mayor actividad complementaria.

Lin y Shiau (2005), probaron el efecto de L-ascorbil-2-sulfato (LA2S) y L-ascorbil-2-polifosfato (LA2PP) en diferentes concentraciones, con motivo de determinar los requerimientos de juveniles de mero malabarico (*Epinephelus malabaricus*). Sus resultados indican que una concentración de 46 mg de LA2S y 18 mg de LA2PP/kg de alimento es adecuada para el crecimiento de la especie. Los signos clínicos observados por la falta de vitamina C en la dieta de los peces fueron menor crecimiento, coloración obscura y mortalidad.

Ai *et al.* (2006), evaluaron el nivel de almacenamiento de ácido ascórbico (AA) en el hígado de juveniles de corvina japonés (*Pseudosciaena crocea*). Determinaron que la concentración de AA en ese órgano tiene una correlación positiva con la ingesta en su dieta y que su nivel de almacenamiento máximo es de 87 mg/kg de dieta.

Eo y Lee (2008), evaluaron el efecto del ácido ascórbico (AA) en el crecimiento y la respuesta inmune no específica en juveniles de botete tigre (*Takifugu rubripes*). Determinaron que el requerimiento mínimo para que el sistema inmunológico elimine las patologías es de 29 mg/kg de dieta. También observaron que en los peces que fueron alimentados con la dieta carente de AA, el índice hepatosomático, factor de condición, valores de hematocrito, acción fagocítica y actividad de lisozima fueron significativamente más bajos ( $P < 0.05$ ).

### 3. HIPÓTESIS

El requerimiento de vitamina C en la dieta de juveniles de *L. guttatus*, para mejorar su desarrollo y evitar signos clínicos por su deficiencia será mayor a 50 mg/kg.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. Objetivo General

Evaluar el requerimiento nutricional de vitamina C y los efectos de su deficiencia en el desarrollo de juveniles de *L. guttatus*.

#### 4.2. Objetivos Particulares

- Establecer el requerimiento de vitamina C para obtener el máximo crecimiento de juveniles de *L. guttatus*.
- Establecer el nivel de almacenamiento de vitamina C en el hígado de los juveniles de *L. guttatus*.
- Evaluar los efectos histopatológicos derivados de la deficiencia de vitamina C en los juveniles de *L. guttatus*.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Periodo Experimental

El presente estudio se realizó en las instalaciones del CIAD unidad Mazatlán, durante el periodo noviembre del 2008-febrero del 2009.

### 5.2. Dieta Experimental

Las dietas experimentales se elaboraron con una dieta basal (Tabla 1), a la cual se le incluyó L-ascorbil-2-polifosfato (LA2PP) marca Rovimix Stay como fuente de vitamina C. Se seleccionó esta forma de vitamina C para disminuir su pérdida y/o desnaturalización durante la elaboración y almacenamiento de las dietas (Ruff *et al.*, 2003; Lin y Shiau, 2005). El LA2PP empleado contó con 35 % de actividad y fue incluido en concentraciones de 0, 20, 47, 82, 177 y 718 mg/kg de alimento. A cada dieta se le agregó adicionalmente 35 % de la vitamina para evitar posibles pérdidas durante su elaboración, de acuerdo a lo realizado por Liu *et al.* (1989). Para facilitar la identificación de las dietas experimentales, fueron designadas como VC0, VC20, VC47, VC82, VC177 y VC718.

La cantidad de vitamina C, incluida fue restada de la dextrina con el propósito de contar siempre con el 100 %.

Las dietas fueron formuladas para proporcionar 45 % de proteína y 12 % de lípidos; esto en función de los valores reportados como óptimos para juveniles de *Lutjanus sp.* (Hernández, 2007).

**Tabla 1.** Dieta control para la alimentación de los juveniles experimentales.

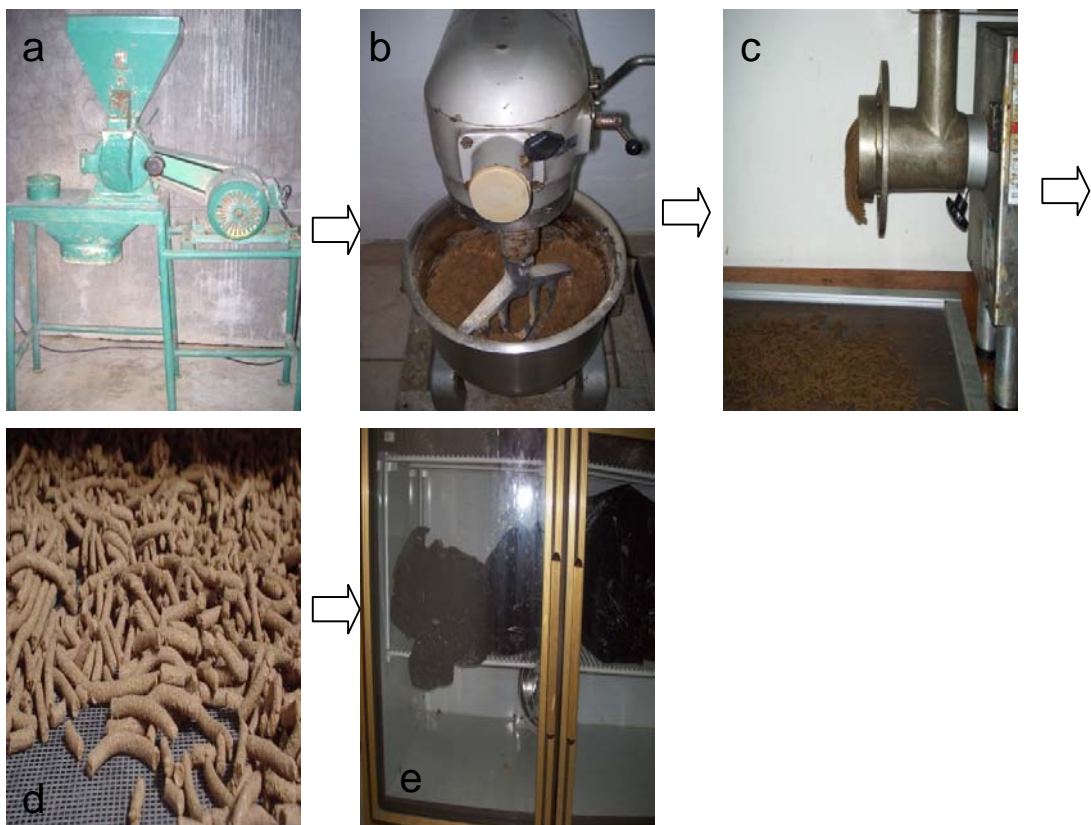
<b>Ingredientes</b>	<b>%</b>
Harina de pescado	32.83
Soya	8.36
Calamar	11.03
Harina de camarón	22.56
Aceite de pescado	2.29
Aceite de soya	5.61
Dextrina	15.07
*Pre mezcla de vitaminas	0.10
**Pre mezcla de minerales	0.10
Cloruro de colina	0.05
Alginato	2.00

\*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: DSM Nutritional Products.

Para la preparación de cada una de las dietas, los ingredientes secos como la harina de pescado, soya y camarón fueron finamente molidos utilizando un molino de martillo marca Micrón y mezclados junto con la dextrina y alginato en una batidora Kitchen Aid con capacidad de 5L hasta obtener una mezcla homogénea; posteriormente se le adicionaron los micronutrientes agregando primero todas las vitaminas; este procedimiento se llevó a cabo obteniendo una pequeña cantidad de la mezcla homogénea con la finalidad de realizar una pre-mezcla de estos ingredientes; de la misma forma se incluyó la vitamina C y la colina por separado y finalmente los minerales. Una vez agregados los micronutrientes, se adicionó el calamar y finalmente los aceites. Ya que fue completada la mezcla, se le agregó agua en cantidades suficientes para dar a la masa la consistencia apropiada para posteriormente pasarla por un molino de carne marca Torrey con un dado de 3 mm de diámetro. Los pelets obtenidos fueron colocados en un secador a una temperatura de 40 °C durante 12 h para eliminar el contenido de agua (Fig. 2).



Después de que los alimentos fueron secados, se trituraron y tamizaron a un tamaño de 3.5 mm para formar un granulado apropiado al tamaño de la boca de las crías de *L. guttatus*. Finalmente las dietas se almacenaron en recipientes herméticos previamente etiquetados y se mantuvieron en refrigeración a una temperatura de 5 °C para prevenir su degradación y la posible aparición de hongos (Fig. 2).



**Figura 2.** Procedimiento para la elaboración de las dietas experimentales: a) molido de las harinas, b) mezcla, c) elaboración de pelets d) secado y e) almacenaje en refrigeración hasta su uso.

Después de que las dietas fueron terminadas, se les realizó un análisis proximal, basado en los métodos descritos por la AOAC (1984). El contenido de proteína cruda fue determinado con el método de combustión utilizando el equipo LECO FP-520, el de lípidos crudos mediante la extracción de éter de petróleo utilizando el equipo microSoxhlet; por su parte, el contenido de ceniza se determinó calentando una muestra

(previamente pesada) en una mufla a 450 °C por 12 horas, mientras que el contenido de humedad se estableció introduciendo las muestras en una estufa a 105 °C durante 24 horas.

Una vez determinada la composición proximal de las dietas, se tomó una muestra de cada una para determinar las posibles pérdidas de vitamina C durante el proceso de elaboración por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), mediante el método desarrollado por *Ai et al.* (2004, 2006), con algunas modificaciones en la fase móvil. A continuación se presentan el método empleado de forma detallada.

Para detectar y cuantificar el ácido ascórbico en las dietas experimentales se utilizó un cromatógrafo líquido modelo HP Hewlett Packard 1050 con un detector ultravioleta-visible (UV-Vis); se utilizó una columna Lichrosorb RP18 (5 µm, 250 x 4 mm), a temperatura ambiente. La elución fue isocrática con una fase móvil compuesta de acetato de sodio 0.04 M, 0.5 mM tetrabutilamonio dehidrogenofosfato (TBAPH) con un pH de 3.76 y 0.05 EDTA y un flujo de 0.5 ml/min. La detección se realizó a una longitud de onda de 245 nm.

Se prepararon soluciones estándar de ácido ascórbico con las siguientes concentraciones: 5, 10, 20, 30, 40 y 50 µg/L. Se inyectaron 20 µL de cada estándar y se obtuvo el área correspondiente a cada concentración.

Para la extracción de ácido ascórbico en las dietas experimentales, se tomaron aproximadamente de 3 a 5 g de muestra homogenizada, a la cual se le agregó 25 ml de cloroformo y 100 ml de agua destilada, se mezcló durante 25 minutos y se dejó reposar por otros 25 minutos.

Del sobrenadante que resultó de la mezcla que se dejó reposar se tomaron 30 ml para posteriormente centrifugar a 2739 xg por 5 min (modelo Beckman Gs-15R); se tomó 1 ml del sobrenadante que se obtuvo de la centrifugación y se agregó una solución buffer

de acetato de sodio 0.02M (pH=4.8), DTT (ditioeritritol) al 0.2 % y 5 mg de fosfatasa ácida (ALP). Posteriormente se mantuvo en un baño de ultrasonido a 37 °C durante 2 h y se centrifugó a 2739 xg por 10 min. Finalmente el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  y se tomaron 20  $\mu\text{l}$  para ser inyectados en el cromatógrafo.

### 5.3. Sistema Experimental

Se utilizó un sistema de circulación abierta con flujo continuo de agua marina; estuvo compuesto por 21 tanques de fibra de vidrio con capacidad de 600 l c/u (Fig. 3) y un drenaje central de 30 mm de diámetro cubierto con malla (poro de 5 mm) para evitar la salida de los peces. Cada tanque contó con aireación y flujo de agua continuos (6 L  $\text{min}^{-1}$  aproximadamente) pudiéndose regular según fue necesario. El agua marina fue bombeada de la playa Las Brujas y pasó a través de filtros de arena y de cartuchos de 16 micrómetros. El fotoperiodo fue de 12 horas luz/12 de oscuridad. La temperatura promedio del agua fue de 24.88 °C  $\pm$  2.07, mientras que el oxígeno disuelto quedó establecido en 5.00 mg/L  $\pm$  0.48.



**Figura 3.** Tanques experimentales empleados para la realización del bioensayo.

#### 5.4. Peces Experimentales

Los peces fueron obtenidos en la planta piloto para la producción de juveniles de peces marinos ubicada en el Centro de Investigación Alimentación y Desarrollo (CIAD), Unidad Mazatlán. Se utilizaron juveniles de pargo flamenco *L. guttatus* con un peso promedio inicial de  $8.0 \pm 1.85$  g (Fig. 4).

Se colocaron veinte juveniles en cada tanque, lo que equivalió a una densidad aproximada de 33 peces/m<sup>3</sup>.



**Figura 4.** Ejemplar de pargo flamenco (*L. guttatus*) experimental.

Al inicio del experimento se tomaron al azar diez peces del lote de abastecimiento para realizar el análisis bromatológico del cuerpo de los peces. Al finalizar el bioensayo se tomaron 3 peces por tratamiento para realizar el mismo análisis. Los peces fueron sacrificados por choque térmico (colocándolos en hielo), después se lavaron con agua destilada y se mantuvieron en congelación, posteriormente se molieron hasta obtener

una mezcla homogénea para finalmente realizar los análisis proximales de acuerdo con los métodos descritos por la AOAC (1984).

Para establecer el nivel de almacenamiento de vitamina C en el hígado de los peces, al final del experimento se colectaron 12 muestras de cada tratamiento. Las muestras fueron analizadas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), mediante el método desarrollado por *Ai et al.* (2004, 2006), el cual se describe a continuación.

Para detectar y cuantificar el ácido ascórbico en el hígado de los peces experimentales se utilizó el mismo sistema de cromatografía utilizado en el análisis de alimento.

Para la preparación de la curva estándar, se elaboraron soluciones estándar de ácido ascórbico con las siguientes concentraciones: 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 µg/l. Se inyectaron 20 µl de cada estándar y se obtuvo el área correspondiente a cada concentración.

Se tomaron aproximadamente 2 g de hígado y se realizó un pool de este tejido, al cual se le agregó ácido metafosfórico al 5 % en presencia de DTT, posteriormente se homogenizó utilizando un baño de hielo. Por último se centrifugó a 2739 g durante 6 minutos (modelo Beckman Gs-15R), el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.22 µm y se tomaron 20 µl para ser inyectados en el cromatógrafo.

### 5.5. Régimen de Alimentación

Los peces fueron alimentados a saciedad aparente tres veces al día (8 a.m., 12 p.m. y 4 p.m.) durante 13 semanas. Al final de cada período de alimentación se registró la cantidad de alimento suministrado a cada tanque. Diariamente se sifoneó cada uno de los

tanques para evitar la acumulación de materia orgánica, producto del alimento no consumido y de las heces fecales.

### 5.6. Variables de Respuesta

Se realizaron biometrías cada 15 días, en las que se evaluaron el peso y longitud total de los peces. Para reducir el estrés durante el proceso de medición, previo a la evaluación, los organismos fueron anestesiados empleando una concentración de 0.3 ml de 2-phenoxy-ethanol/L de agua. Diariamente se hicieron observaciones en relación con el comportamiento y apariencia física de los peces, los cuales fueron registrados en una bitácora de trabajo.

El efecto de las dietas sobre el desempeño de los organismos en el experimento fue evaluado mediante la respuesta en términos de crecimiento, supervivencia y eficiencia alimenticia, usando las siguientes fórmulas.

1. Peso Ganado (Fattah y Sayed, 2002).

$$PG = P_f - P_i$$

Donde:

PG = Peso Ganado (g)

$P_f$  = Peso promedio final (g)

$P_i$  = Peso promedio inicial (g)

2. Tasa de Crecimiento (Zhou *et al.*, 2003).

$$TC = \frac{P_f - P_i}{P_i} \times 100$$

Donde:

TC = Tasa de Crecimiento (g/día)

P<sub>f</sub> = Peso promedio final (g)

P<sub>i</sub> = Peso promedio inicial (g)

3. Tasa de Crecimiento Específico (Cho *et al.*, 2003).

$$TCE = \frac{\ln P_f - \ln P_i}{t} \times 100$$

Donde:

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

P<sub>f</sub> = Peso promedio final (g)

P<sub>i</sub> = Peso promedio inicial (g)

t = tiempo (días)

Ln = Logaritmo natural

4. Tasa de Conversión Alimenticia (Guillaume *et al.*, 2004).

$$TCA = \frac{As}{Gpc}$$

Donde:

TCA = Tasa de Conversión Alimenticia (N:N)

As= Alimento suministrado (g)

Gpc = Ganancia en peso corporal (g)

5.7. Análisis Histológico

Antes de iniciar el experimento se tomó al azar una muestra de 10 peces para realizar el análisis histológico, con el fin de evaluar el estado del lote en cuanto a las alteraciones patológicas en células, tejidos y órganos.

Al final del experimento, se tomaron 15 peces de cada tratamiento, tomando en cuenta aquellos que presentaron claros signos clínicos externos. En las dietas en las que no se observaron esos signos clínicos se colectaron los 15 peces al azar para tratar de identificar cambios histopatológicos.

En el caso del análisis histológico, se realizó una disección completa de cada juvenil para extraer y fijar los órganos de manera individual con formol al 10 % (Kamonporn *et al.*, 1999). Después de la fijación, tanto los tejidos blandos (corazón, hígado, cerebro, bazo, estómago e intestino) como los tejidos duros (riñón con parte de columna vertebral, branquias y vejiga natatoria) se colocaron en un molde Tissue-Tek unicassette # 4170. Después se llevó a cabo su deshidratación en alcoholes seriados (70, 80 y 96 %)



hasta absoluto, para luego ser aclarados por xilol, el cual es intermediario para permitir la inclusión en parafina, puesto que el alcohol no se disuelve en la parafina.

Posteriormente se hizo la inclusión en parafina (Histoembebedor Leica-Jung, USA). Los bloques que pertenecían a los tejidos duros fueron descalcificados.

Se realizaron cortes de 5 micras en un micrótopo rotatorio (Jung Histo-cut Leica #820), los cortes obtenidos se tiñeron con la técnica de hematoxilina y eosina y se montaron con bálsamo de Canadá para su estudio histopatológico bajo microscopio compuesto (Olympus mod. CH-30 RF100, USA), (Lee y Luna, 1968; Drury y Wallington, 1980).

#### **5.7.1. Técnicas Especiales de Tinción.**

Al observar granulomas en los cortes de hígado se utilizaron los métodos de tinción de Gram Humbertone, para detectar bacterias gram positivas y gram negativas y el método de tinción de Ziehl Neelsen, para la detección de bacterias ácido resistentes (Lee y Luna, 1968).

#### **5.7.2. Criterios Utilizados para Determinar el Grado de Severidad de los Signos Clínicos Reportados en este Trabajo.**

Para determinar el grado de severidad de los signos clínicos causados por la deficiencia de vitamina C se tomó en cuenta la escala de valores que se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Escala de valores para determinar el grado de severidad de los signos clínicos por deficiencia de vitamina C.

<b>Nivel de severidad</b>	<b>Característica</b>
0	No se observa ningún tejido dañado
1	Escaso tejido dañado
2	Algunos focos del tejido dañado
3	Tejido dañado ampliamente distribuido
4	Destrucción severa del tejido

### **5.7.3. Proporción de Órganos Afectados.**

Para calcular la proporción de órganos afectados se utilizó la siguiente fórmula:

$$POA = \frac{NOG}{TOR} \times 100$$

Donde:

POA: Proporción de órganos afectados

NOG: Número de órganos afectados

TOR: Total de órganos revisados

### 5.8. Diseño Experimental y Análisis Estadístico.

En el ensayo se aplicó un diseño completamente aleatorizado con tres réplicas por tratamiento (20 peces por tanque). Tanto los juveniles como los tratamientos fueron asignados al azar entre los tanques experimentales.

Se determinó la normalidad y homoscedasticidad de los datos aplicando una prueba de Lilliefors y de Barthlet respectivamente, empleando el paquete estadístico Sigma Stat.3.0

Una vez que se aplicaron las pruebas correspondientes, a los datos paramétricos, se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), (Zar, 1984), en todos los casos con un nivel de significancia del 95 %. A los datos que resultaron no paramétricos se les aplicó la prueba de Kruskal-Wallis empleando el mismo nivel de significancia.

Cuando se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó el análisis de comparaciones múltiples (prueba de Duncan) cuando los datos fueron paramétricos y la prueba de Tukey cuando los datos fueron no paramétricos.

Se realizó el modelo de regresión lineal con punto de quiebre basándose en el peso ganado; con el objetivo de encontrar a partir de que concentración de vitamina C se obtuvo el máximo crecimiento (Zeitoun *et al.*, 1976; De Silva *et al.*, 1989; Shearer, 2000; Ai *et al.*, 2006; Robbins *et al.*, 2006).

Para establecer la relación entre algunas de las variables evaluadas, se realizó un análisis de correlacion simple de Pearson ajustado al modelo lineal ( $P < 0.05$ ).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Determinación de la Composición Proximal y Concentración de Vitamina C en las Dietas Experimentales.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la composición proximal de las dietas experimentales, no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre los tratamientos evaluados, por lo tanto, se pudo determinar que fueron isoenergéticas e isoprotéicas (Tabla 3). Es importante señalar que los niveles de proteína y lípidos obtenidos se encontraron dentro de los recomendados por Hernández (2007), para el crecimiento de juveniles de *L. guttatus* (45:9 y 45:12).

En la Tabla 3, se puede observar que se presentaron pérdidas de vitamina C durante la elaboración de las 6 dietas experimentales. Al respecto, al igual que en el presente estudio, distintos autores han encontrado que se presentan pérdidas de ácido ascórbico durante la elaboración de la dietas. También mencionan que esas pérdidas se presentan independientemente de la forma de vitamina C utilizada (Soliman *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 2003; Ai *et al.*, 2004; Lin y Shiau, 2005).

**Tabla 3.** Composición proximal y concentración final de vitamina C (L-ascorbil-2 polifosfato) en las dietas experimentales.

Composición	Dieta					
	1	2	3	4	5	6
Humedad	6.49±0.05 <sup>a</sup>	6.60±0.01 <sup>a</sup>	6.61±0.05 <sup>a</sup>	6.90±0.03 <sup>a</sup>	6.70±0.02 <sup>a</sup>	5.93±0.01 <sup>a</sup>
Proteína	44.5±0.05 <sup>a</sup>	44.01±0.1 <sup>a</sup>	44.32±0.1 <sup>a</sup>	44.78±0.01 <sup>a</sup>	44.84±0.1 <sup>a</sup>	44.5±0.1 <sup>a</sup>
Lípidos	13.16±0.2 <sup>a</sup>	13.25±0.2 <sup>a</sup>	14.08±0.2 <sup>a</sup>	13.19±0.2 <sup>a</sup>	13.77±0.2 <sup>a</sup>	13.31±0.2 <sup>a</sup>
Ceniza	15.19±0.05 <sup>a</sup>	15.19±0.05 <sup>a</sup>	15.26±0.05 <sup>a</sup>	15.04±0.05 <sup>a</sup>	15.85±0.05	15.20±0.05
<b>Contenido de Vit. C (mg/kg)</b>						
Calculado	0	25	50	100	200	800
Analizado	0	20.09±2.09	47.61±5.68	82.59±2.04	177.85±5.69	718.64±10.84
Diferencia		20	6	18	11	10

<sup>1</sup>Valores con el mismo superíndice no son significativamente diferentes ( $P > 0.05$ )

## 6.2. Análisis Proximal de la Composición Corporal de los Peces.

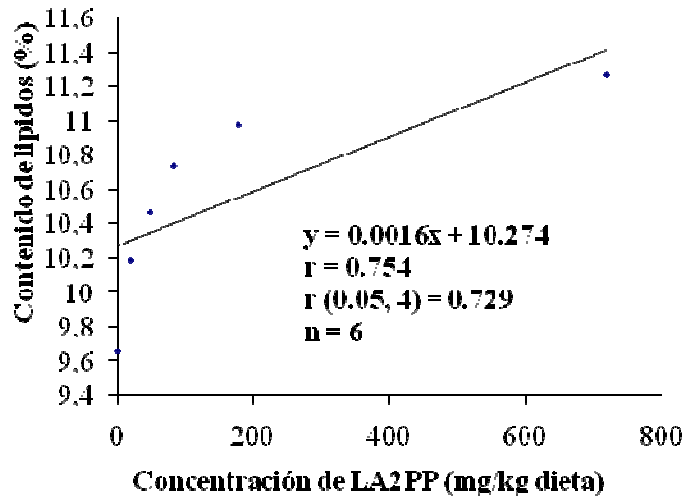
A continuación en la Tabla 4, se presentan los promedios obtenidos del análisis proximal del cuerpo de los pargos (*L. guttatus*), al inicio y al final del experimento.

**Tabla 4.** Análisis proximal corporal de los pargos experimentales.

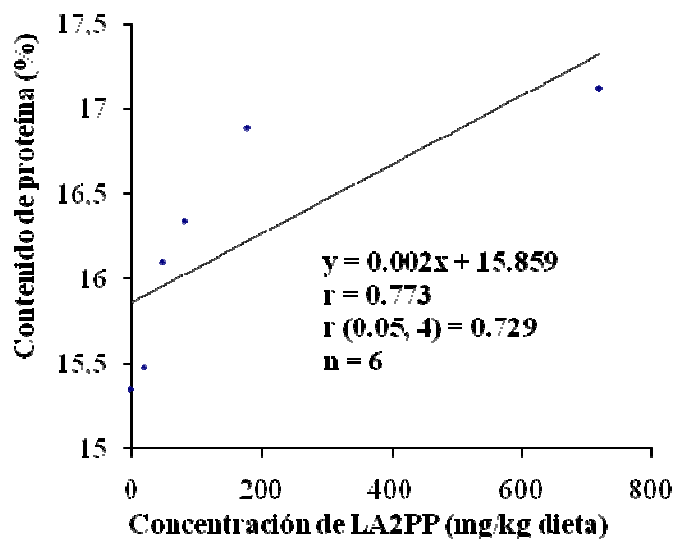
Muestras	%Humedad	%Ceniza	%Lípidos	%Proteína
<b>Inicial</b>	68.56±0.33	6.06±0.2	4.95±0.05	18.26±0.1
<b>VC0</b>	69.64±0.15 <sup>a</sup>	4.66±0.1 <sup>a</sup>	9.66±0.1 <sup>a</sup>	15.35±0.1 <sup>a</sup>
<b>VC20</b>	69.45±0.05 <sup>a</sup>	4.17±0.1 <sup>a</sup>	10.19±0.1 <sup>b</sup>	15.48±0.1 <sup>a</sup>
<b>VC47</b>	69.04±0.7 <sup>a</sup>	4.32±0.1 <sup>a</sup>	10.47±0.1 <sup>bc</sup>	16.10±0.1 <sup>b</sup>
<b>VC82</b>	68.92±0.04 <sup>a</sup>	4.23±0.1 <sup>a</sup>	10.74±0.1 <sup>c</sup>	16.34±0.1 <sup>b</sup>
<b>VC177</b>	68.28±0.35 <sup>a</sup>	4.09±0.0 <sup>a</sup>	10.98±0.0 <sup>cd</sup>	16.89±0.1 <sup>c</sup>
<b>VC718</b>	67.87±1.10 <sup>a</sup>	4.03±0.0 <sup>a</sup>	11.27±0.0 <sup>d</sup>	17.12±0.0 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Valores con el mismo superíndice no son significativamente diferentes (P>0.05)

De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 4, al aumentar la concentración de L-áscorbil-2 polifosfato (LA2PP) en la dieta de pargos juveniles *L. guttatus* tendió a incrementarse significativamente (P<0.05) el contenido de proteína y lípidos en el cuerpo de los peces al final del bioensayo. Este argumento pudo ser corroborado mediante un análisis de correlación ajustado al modelo lineal entre la concentración de LA2PP y el porcentaje de lípidos y proteína incorporados por los pargos experimentales en sus cuerpos (Fig. 5 y 6).



**Figura 5.** Relación entre la concentración de LA2PP y el contenido de lípidos en el cuerpo de los pargos experimentales.



**Figura 6.** Relación entre la concentración de LA2PP y el contenido de proteína en el cuerpo de los pargos experimentales.

De acuerdo con los resultados presentados en las Figuras 5 y 6, existe una correlación positiva significativa ajustada al modelo lineal ( $P < 0.05$ ) entre la concentración de LA2PP y el contenido de lípidos y proteína en el cuerpo de los pargos experimentales.

Abdelghany (1998), evaluaron el efecto de diferentes formas y concentraciones de vitamina C en la eficiencia alimentaria, la retención de nutrientes y la composición del cuerpo de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). Encontraron que al subir la concentración de ácido L-ascórbico, L-ascorbil-2 sulfato y L-ascorbil-2-Polifosfato en la dieta, se incrementó el contenido de proteína en su cuerpo de 67 a 71 %. Por su parte, Chen *et al.* (2004), en un estudio tendiente a evaluar el efecto de las vitaminas E y C en el desarrollo de peces juveniles de la carpita dorada (*Notemigonus crysoleucas*), encontraron que al aumentar la concentración de vitamina C en la dieta de estos peces, se incrementó significativamente el nivel de proteína y lípidos en su cuerpo ( $P < 0.10$ ).

Chatterjee (1967), citado por Wang *et al.* (2003) y Wahli *et al.* (2003), mencionan que el ácido ascórbico tiene un papel importante en ciertos aspectos del metabolismo de las proteínas, debido a que la vitamina en cuestión participa en la síntesis de diferentes aminoácidos como triptófano, tirosina, lisina, fenilalanina y prolina. Por su parte Bendich *et al.* (1986) y Kinsella *et al.* (1993) citado por Yi *et al.* (2009), mencionan que la función antioxidante de la vitamina C previene el deterioro oxidativo de los lípidos. Esto debido a que el ácido ascórbico actúa como antioxidante fisiológico al facilitar el transporte de hidrógeno dentro de la célula animal y de esta forma elimina radicales libres (Velázquez *et al.*, 2004).

Por lo tanto, el hecho de que en el presente estudio la cantidad de proteínas y lípidos haya sido mayor en los pargos que recibieron mayor concentración de LA2PP, concuerda con los resultados de los trabajos antes mencionados y se concluye que pudo deberse a un mejor metabolismo de las proteínas y a la inhibición o disminución de la oxidación de los lípidos en el cuerpo de los peces por efecto de la vitamina en cuestión, lo cual favoreció su deposición en el cuerpo.

### 6.3. Variables de Respuesta.

En la Tabla 5, se presentan los valores promedio de las variables de crecimiento obtenidos con las diferentes dietas experimentales.

**Tabla 5.** Promedios de las variables biológicas evaluadas en los pargos experimentales.

<b>Dieta</b>	<b>Peso inicial (g)</b>	<b>Peso final (g)</b>	<b>PG (g)</b>	<b>TC (%)</b>	<b>TEC (%/día)</b>
<b>VC0</b>	8.09±2.02 <sup>a</sup>	41.18±2.63 <sup>a</sup>	33.77±2.63 <sup>a</sup>	417.24±32.77 <sup>a</sup>	1.60±0.06 <sup>a</sup>
<b>VC20</b>	8.03±1.64 <sup>a</sup>	50.7±1.28 <sup>b</sup>	42.67±1.28 <sup>b</sup>	506.29±20.78 <sup>b</sup>	1.80±0.03 <sup>b</sup>
<b>VC47</b>	8.22±1.96 <sup>a</sup>	49.97±6.92 <sup>b</sup>	41.75±6.48 <sup>b</sup>	506.29±52.09 <sup>b</sup>	1.76±0.08 <sup>b</sup>
<b>VC82</b>	7.93±1.71 <sup>a</sup>	60.85±3.07 <sup>c</sup>	52.92±2.73 <sup>c</sup>	668.40±12.58 <sup>c</sup>	2.00±0.02 <sup>c</sup>
<b>VC177</b>	8.70±1.82 <sup>a</sup>	67.54±3.15 <sup>c</sup>	58.84±3.15 <sup>c</sup>	657.95±35.15 <sup>c</sup>	1.98±0.05 <sup>c</sup>
<b>VC718</b>	8.32±1.75 <sup>a</sup>	63.24±5.90 <sup>c</sup>	54.92±5.22 <sup>c</sup>	659.22±9.59 <sup>c</sup>	1.98±0.01 <sup>c</sup>

Donde: PG. = Peso ganado, TC = Tasa de crecimiento, TEC= Tasa de crecimiento específico.

<sup>1</sup>Valores con el mismo superíndice no son significativamente diferentes (P>0.05).

#### 6.3.1. Crecimiento en peso.

De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 5 y en función del análisis estadístico correspondiente, el crecimiento no mejoró significativamente (P>0.05) a partir de la dieta 4 (82.5 mg de vitamina C/kg de dieta).

En relación con el crecimiento, al igual que en el presente estudio distintos autores entre los que destacan Wang *et al.* (2003), Lin y Shiau (2005) así como Eo y Lee (2008), han determinado que no incluir ácido ascórbico (AA) en la dieta de juveniles del pez loro japonés (*Oplegnathus fasciatus*), mero malabarico (*Epinephelus malabaricus*) y botete tigre (*Takifugu rubripes*), resulta en una reducción del crecimiento y depresión del sistema inmunológico de los peces. También observaron que conforme se incrementa la concentración de AA en la dieta de estos organismos se obtiene un mayor crecimiento,

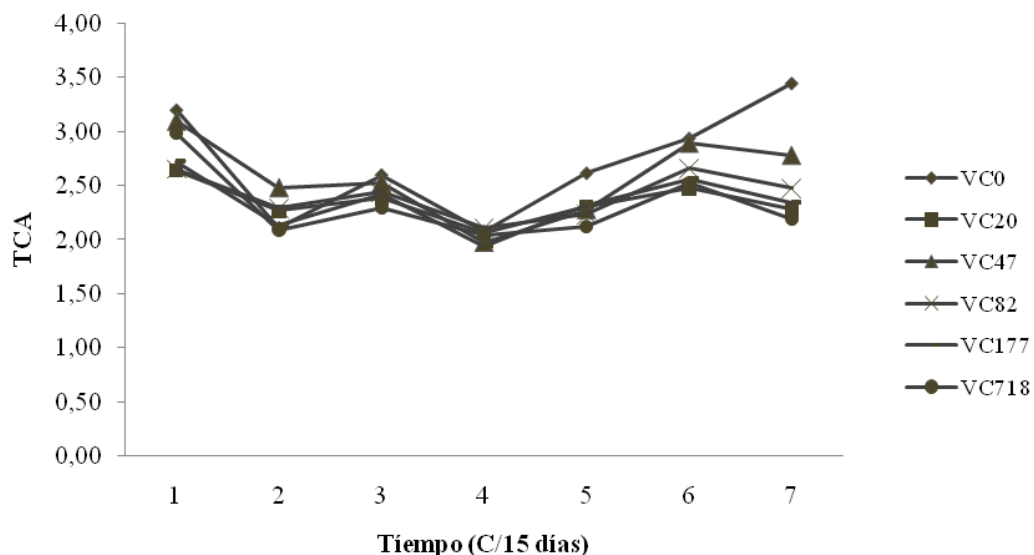


siendo este significativo hasta una concentración determinada a partir de la cual el aumento del crecimiento no es significativo.

En la presente evaluación incrementar la concentración de vitamina por encima de 82.5 mg/kg de dieta, no produjo un incremento significativo del crecimiento de los peces ( $P>0.05$ ), posiblemente porque a partir de dicha concentración el requerimiento de ácido ascórbico necesario para la síntesis de diferentes aminoácidos como triptófano, tirosina, lisina, fenilalanina y prolina ya había sido cubierto, por lo que el excedente de vitamina C no intervino en el crecimiento de los organismos (O'keefe, 1991).

### 6.3.2. Tasa de Conversión Alimenticia.

La Tasa de Conversión Alimenticia (TCA) no fue significativamente diferente ( $P>0.05$ ) entre los tratamientos evaluados; sin embargo, es importante destacar que a partir de los 60 días de evaluación, tendió a incrementarse en la dieta en la que no se suministró vitamina C (Fig. 7).



**Figura 7.** Variación de la Tasa de Conversión Alimenticia en función de la dieta evaluada durante el periodo experimental.

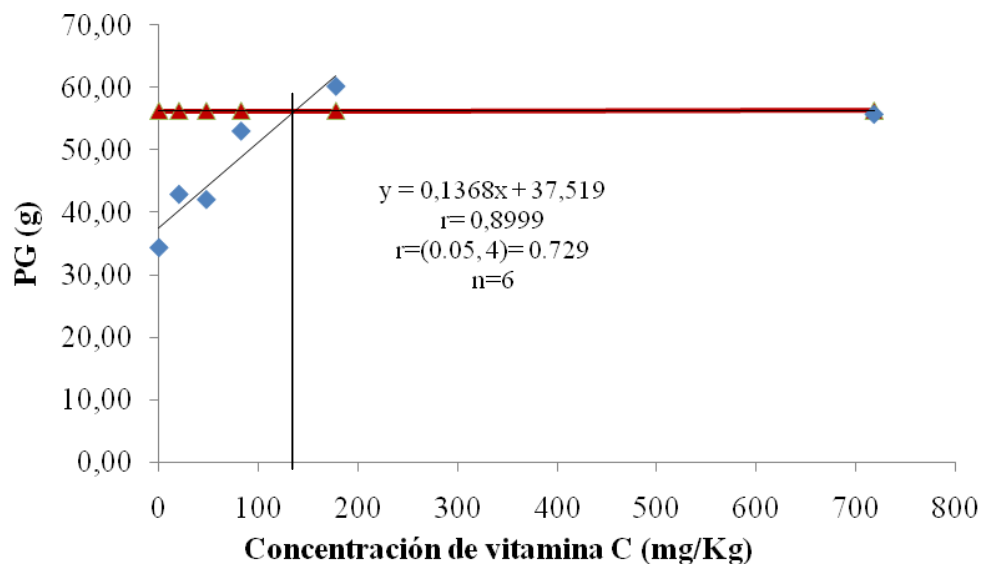
Chen *et al.* (2004), en un estudio realizado con alevines de carpita dorada (*Notemigonus crysoleucas*), no encontraron diferencias significativas en la TCA al evaluar tres concentraciones de LA2MP (43, 98 y 222 mg/kg de dieta); sin embargo el valor más alto se presentó con la concentración de LA2MP más baja. Por su parte, Eo y Lee (2008), si encontraron una reducción significativa de la TCA al incrementar la concentración de LA2MP desde 0 hasta 80 mg/kg de dieta, y no significativa al seguir incrementando la concentración de vitamina C hasta 700 mg/kg de dieta, inclusive con esta última concentración la TCA tendió a incrementarse nuevamente por que los organismos rechazaron alimento debido a la acidez que tuvo por la alta concentración de ácido ascórbico incluida.

En función de lo anterior, se puede inferir que la deficiencia y la inclusión excesiva de vitamina C en la dieta de especies marinas como el pargo *L. guttatus* posiblemente reduce su apetito.

### **6.3.3. Requerimiento Óptimo de Vitamina C**

Para poder establecer la concentración óptima de LA2PP, se siguió el método recomendado por la literatura para el cálculo de niveles óptimos de nutrientes tales como proteínas, lípidos y vitaminas en la dieta (Zeitoun *et al.*, 1976; De Silva *et al.*, 1989; Shearer 2000; Ai *et al.*, 2006; Robbins *et al.*, 2006). Para este estudio se utilizó un análisis de correlación con punto de quiebre ajustada al modelo lineal entre la concentración de LA2PP en las dietas y el peso ganado por los pargos juveniles (Fig. 8).

Para ello, los datos de peso ganado fueron trazados usando la línea de “broken line” en la cual los valores de LA2PP son expresados por una regresión lineal y una segunda línea que indica el máximo peso ganado.



Rombos representan la regresión lineal, triángulos representan los niveles de vitamina C.

**Figura 8.** Correlación con punto de quiebre, entre la concentración de LA2PP de las dietas experimentales y el peso ganado por los pargos experimentales.

De acuerdo con los resultados obtenidos, existe una correlación positiva significativa ( $P < 0.05$ ) entre la concentración de LA2PP y el peso ganado por los pargos juveniles; es decir a medida que aumentó la concentración de LA2PP en la dieta de los pargos juveniles también se incrementó su ganancia en peso hasta un cierto nivel donde se estabiliza (Fig. 8).

Con base en este método gráfico, la concentración de vitamina C para el crecimiento óptimo de pargos juveniles pudo ser establecida en 137 mg de L-ascorbil-2 polifosfato/kg de dieta, equivalente a 47.95 mg de ácido ascórbico/kg de dieta.

En relación con la concentración óptima de vitamina C para el crecimiento, distintos autores han encontrado resultados variables en diferentes especies de peces juveniles carnívoros marinos (Tabla 6).

**Tabla 6.** Requerimiento de vitamina C óptimo (mg/kg de dieta) para el crecimiento de diferentes especies de peces marinos, obtenidos a partir de distintas investigaciones.

<b>Especie</b>	<b>PI (g)</b>	<b>Temp. (°C)</b>	<b>Nivel óptimo</b>	<b>Autor</b>
<i>Oplegnathus fasciatus</i>	3.9±0.06	20	41.3	Wang <i>et al.</i> (2003)
<i>Sebastes schlegeli</i>	3.1±0.02	20	42.4	Wang <i>et al.</i> (2003)
<i>Epinephelus malabaricus</i>	7.58±0.05	?	45.3	Lin y Shiau (2005)
<i>Takifugu rubripes</i>	35±0.04	18	29	Eo y Lee (2008)
<i>L. guttatus</i>	8±1.85	25	47.9	Evaluación actual

Donde: PI = Peso inicial, PF = Peso final, Tem.= Temperatura.

De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 6, se presentaron diferencias en la concentración óptima de vitamina C entre las especies evaluadas. Algo que es importante mencionar es que el requerimiento óptimo de todas las evaluaciones, se encuentra dentro del rango establecido por el NRC (1983) para peces (20-50 mg/kg de dieta). La diferencia en la concentración óptima encontrada entre las evaluaciones puede ser atribuida a distintos factores como son:

1. Condiciones del cultivo. Estas influyen en la variación del requerimiento de vitamina C, destacando la temperatura. En relación con lo anterior, en la Tabla 6, se puede observar una tendencia que al disminuir la temperatura promedio en las evaluaciones realizadas, se presentó una tendencia a la disminución del requerimiento óptimo de vitamina C por parte de las especies evaluadas. Chien y Hwang (2001), encontraron que al incrementar la temperatura del agua, de 32 a 36 °C, el requerimiento de vitamina C para peces juveniles de perca tigre (*Terapon jarbua*) tendió a ser mayor. Esto ocurrió porque el requerimiento de

vitamina C se relaciona con el proceso metabólico de los peces, el cual a su vez, se incrementa al aumentar la temperatura del agua (Dabrowski 2001; Guillaume, 2004).

2. Edad de los peces. La edad de los organismos es otra característica que puede influir en la variación del requerimiento, puesto que la tasa metabólica de los peces tiende a disminuir conforme son más longevos ya que su requerimiento energético disminuye (Guillaume *et al.*, 2004; Lall y Lewis-McCrea, 2007).

#### 6.4. Signos Clínicos Externos

Después de ocho semanas de evaluación, se presentaron diferentes signos clínicos por deficiencia de vitamina C en los pargos experimentales que carecieron de la vitamina en su dieta. Estos signos clínicos fueron erosión de las aletas, oscurecimiento de la piel, descamación y nado errático. En el caso de la erosión de las aletas, se observó separación de los radios en la parte final de la aleta caudal, de tal forma que se mostraban separadas como hilos; la pigmentación de la piel se tornó de un color más oscura conforme transcurrió el tiempo de evaluación, por su parte, durante la descamación se observó un desprendimiento de las escamas de la parte pectoral del cuerpo, dejando áreas de la piel sin protección (Fig. 9, 10). Por último los peces presentaron un comportamiento anormal al nadar en círculos alrededor del tanque y chocar entre ellos. A pesar de los padecimientos observados durante el período experimental, no se presentaron casos de mortalidad.



**Figura 9.** Erosión de las aletas y descamación

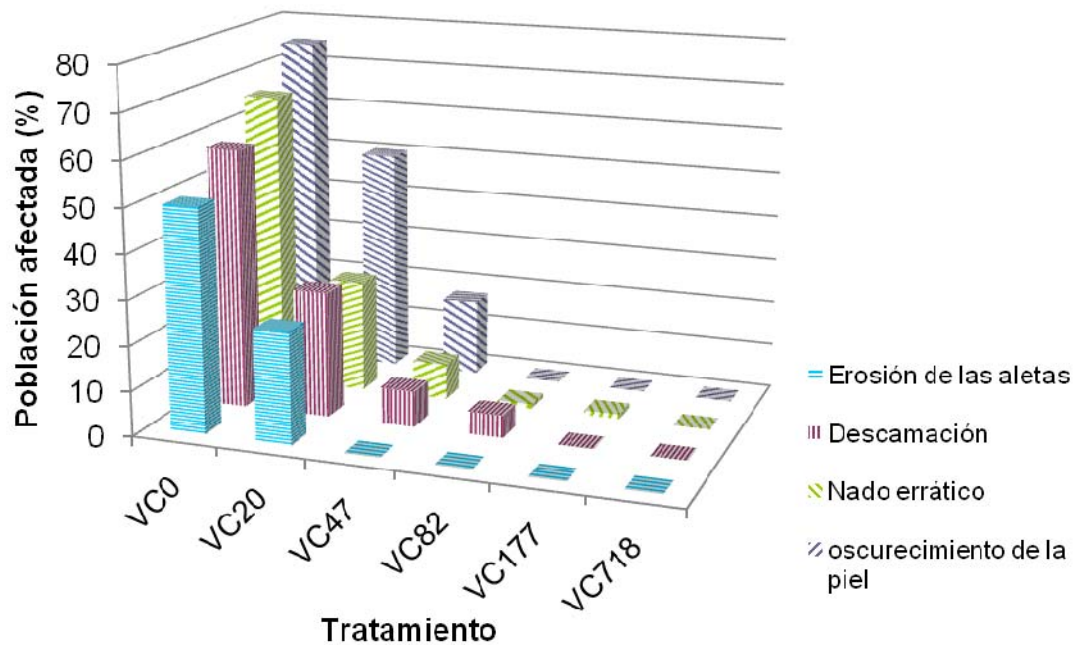


**Figura 10.** Oscurecimiento de la piel



**Figura 11.** Pargo con color, escamas y piel normales

Conforme se incrementó la concentración de vitamina C en la dieta de los pargos juveniles experimentales tendieron a disminuir los signos clínicos, de tal forma que en las dietas que tuvieron una concentración de LA2PP de 177 mg/kg de dieta en adelante, no se presentaron estos signos. También es importante destacar que el oscurecimiento de la piel fue el signo clínico más representativo en los tratamientos evaluados (Fig. 12).



**Figura 12.** Proporción de pargos juveniles que presentaron signos clínicos en función de la concentración de vitamina C.

El oscurecimiento de la piel en los peces experimentales correspondió a un incremento de melanina en la piel, la cual fue producto de un proceso oxidativo. Por lo tanto se puede establecer que la vitamina C como un potente antioxidante pudo contrarrestar el proceso de oxidación necesario para su formación. Además el ácido ascórbico actúa como un inhibidor de tirosinasa, enzima que cataliza la formación de melanina (Rothe, 2003). Referente a esto Yi *et al.* (2009), realizaron una evaluación del efecto de los ésteres de vitamina C como inhibidor de la tirosinasa en hongos. Sus resultados mostraron que al incrementar la concentración de vitamina C en los hongos tendió a disminuir la producción de melanina por efecto de inhibición de la tirosinasa.

Las manifestaciones de los signos clínicos por deficiencia de vitamina C como la erosión de las aletas y la descamación, pudo deberse a un mecanismo que involucra la degeneración oxidativa en ausencia de la vitamina en cuestión (Adham *et al.*, 2000); ya que el ácido ascórbico participa en funciones metabólicas como la síntesis de colágeno (componente proteico más abundante del tejido conectivo). El colágeno ayuda a la formación y soporte de estructuras del cuerpo tales como las escamas y las aletas, por lo que la ausencia de esta vitamina puede provocar trastornos metabólicos que dan lugar a la presencia de signos clínicos como la erosión de las aletas y la caída de escamas.

Otro cambio patológico que fue observado en el presente estudio fue el nado errático de los peces del tratamiento VC0 (movimientos lentos y discontinuos, pérdida del sentido de orientación). De acuerdo con Lagler *et al.* (1990) el nado correcto de los peces se relaciona con su línea lateral, la cual se compone de terminaciones que están conectadas a su sistema nervioso. Milby *et al.* (1981), sugieren que el ácido ascórbico desempeña un papel muy importante en el funcionamiento neuronal. Lall y Lewis-McCrea (2007), reportaron que la vitamina C es un cofactor de muchos de los procesos biológicos relacionados con la neuromodulación. Por lo tanto, es posible que el nado errático observado en los juveniles de *L. guttatus*, se debe a una deficiencia de vitamina C en la dieta.

Aguirre y Gatlin (1999) y Ai *et al.* (2004), estudiaron el efecto de la deficiencia de vitamina C en juveniles de corvina (*Sciaenops ocellatus*), ( $3.6 \pm 0.47$  g) y en juveniles de serránido japonés (*Lateolabrax japonicus*), ( $6.26 \pm 0.10$  g) respectivamente. Al igual que en el presente estudio, después de ocho semanas de evaluación, dichos autores determinaron que se presentaron signos clínicos por deficiencia de vitamina C en los peces que carecieron de esta vitamina en su dieta. Estos signos clínicos fueron: reducción del apetito, nado errático, descamación, oscurecimiento de la piel, erosión de la aleta caudal, deformidad opercular, lordosis, escoliosis y mortalidad. Por su parte, Wang *et al.* (2003), observaron los mismos signos clínicos en juveniles ( $3.1 \pm 0.02$  g) de chancharro coreano (*Sebastes schlegeli*) después de la novena semana de evaluación.



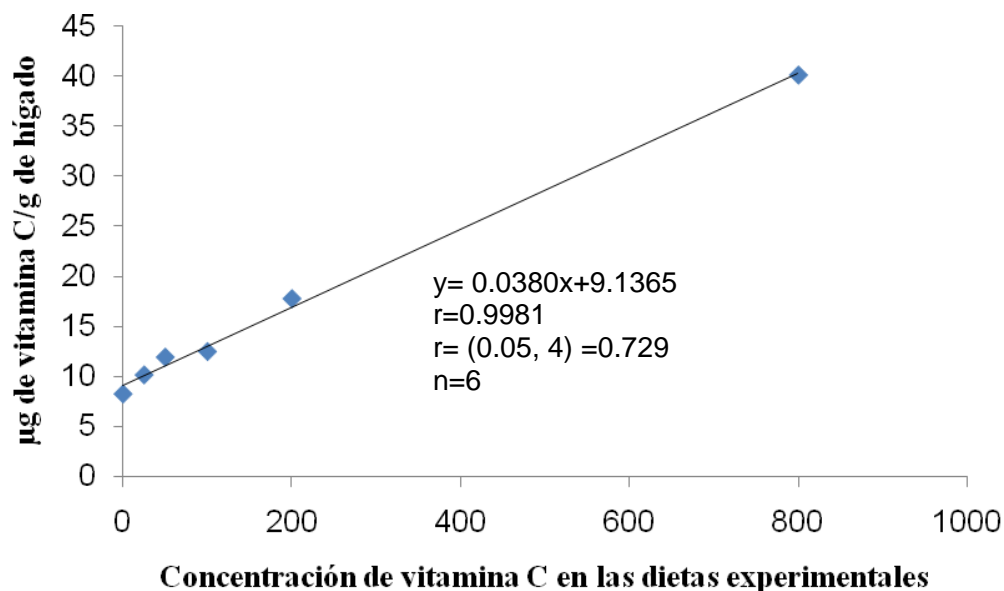
6.5. Determinación de la Concentración de Vitamina C en el Hígado de los Pargos Experimentales

A continuación en la Tabla 7 se presentan los niveles de almacenamiento de vitamina C en el hígado del pargo *L. guttatus*.

**Tabla 7.** Concentración de vitamina C en el hígado de los pargos experimentales en función de las dietas

<b>Concentración de vitamina C en las dietas experimentales (mg/kg de dieta)</b>	<b>Concentración de vitamina C en el hígado de los pargos experimentales (µg/g de peso húmedo)</b>
VC0	8,22±4.14 <sup>a</sup>
VC20	10.13±1.96 <sup>ab</sup>
VC47	11.90±2.99 <sup>bc</sup>
VC82	12.46±3.45 <sup>c</sup>
VC177	17.75±1.20 <sup>d</sup>
VC718	40.09±5.25 <sup>e</sup>

De acuerdo con los resultados obtenidos, la cantidad de vitamina C almacenada en el hígado de los pargos experimentales tendió a incrementarse significativamente ( $P < 0.05$ ) al aumentar la concentración de vitamina C en las dietas. Esto se puede corroborar al observar la Figura 13, donde se muestra que existe una correlación positiva significativa ( $P < 0.05$ ) ajustada al modelo lineal, entre la concentración de vitamina C en las dietas experimentales y el nivel de almacenamiento de la misma vitamina en el hígado de los peces experimentales.



**Figura 13.** Relación entre la concentración de vitamina C (mg/kg de dieta) en las dietas experimentales y el nivel de almacenamiento de vitamina C en el hígado de los pargos experimentales.

Al igual que en el presente estudio, Wang *et al.* (2003) y Eo y Lee (2008), en experimentos realizados con juveniles de chancharro coreano (*Sebastes schlegeli*), ( $3.1 \pm 0.02$  g) y botete tigre (*Takifugu rubripes*), ( $35 \pm 0.04$  g) encontraron que al incrementarse los niveles de vitamina C en las dietas de estos peces tendió a ser mayor el nivel de almacenaje de dicha vitamina en sus hígados, sin embargo no se pudo establecer el nivel de almacenamiento máximo. Por su parte, Ai *et al.* (2004 y 2006), encontraron una correlación positiva entre la concentración de vitamina C en las dietas de serránido japonés (*Lateolabrax japonicus*), ( $6.26 \pm 0.1$  g) y la corvina japonesa (*Pseudosciaena crocea*), ( $17.82 \pm 0.68$  g) respecto al nivel de almacenamiento en sus hígados. A partir de sus resultados establecieron que el nivel de almacenamiento máximo fue de 93.4 y 87 µg/g de hígado respectivamente.

## 6.6. Análisis Histológico

### **6.6.1. Análisis Histológico de los Peces Iniciales.**

El análisis histológico de los 10 peces iniciales mostró que el 20 % de los peces presentaron granulomas en el hígado, lo cual sirvió para evaluar si la vitamina C contribuyó a la reducción o eliminación de esta anomalía.

### **6.6.2. Análisis Histológico de los Peces Experimentales.**

En la Tabla 8, se describen las alteraciones histológicas observadas en el hígado, branquias, riñón y cerebro respectivamente. Cabe señalar que en el resto de los órganos analizados (bazo, corazón, vejiga natatoria, estómago e intestino) no se presentaron signos clínicos por deficiencia de vitamina C. Actualmente no se han reportado patologías en estos órganos, posiblemente porque el ácido ascórbico se almacena en órganos vitales que tienen un metabolismo activo (Dabrowski, 2001).

**Tabla 8.** Cambios patológicos observados en diversos órganos de los peces experimentales alimentados con diferentes niveles de vitamina C.

Órgano afectado	Cambios patológicos	VC0		VC20		VC47		VC82		VC177		VC718	
		POA	GS	POA	GS	POA	GS	POA	GS	POA	GS	POA	GS
Hígado	Degeneración grasa	100	4	100	4	95	4	95	4	100	4	100	4
	Granulomas	85	4	76	4	80	4	60	3	60	2	53	2
Riñón	Vacuolación en túbulos renales	95	4	89	4	85	3	0	0	0	0	0	0
	Atrofia glomerular	95	4	89	3	75	4	60	2	0	0	0	0
	Dilatación de vasos sanguíneos	95	4	95	3	95	3	33	2	13	1	13	1
Cerebro	Cromatolisis Central	80	4	71	3	66	3	20	1	0	0	0	0
	Pérdida del núcleo	33	2	23	2	14	1	20	1	0	0	0	0
	Células eosinófilas	78	4	66	3	38	2	0	0	0	0	0	0
Branquias	Hipertrofia de condorcitos	89	4	100	4	57	3	0	0	0	0	0	0
	Hiperplasia del epitelio lamelar	100	4	94	4	71	3	53	2	20	1	0	0
	Fusión de las lamelas secundarias	89	4	52	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	Telangiectasis	94	4	63	3	71	3	26	1	13	1	0	0
	Edema	68	3	52	2	33	2	0	0	0	0	0	0
	Infiltración de células inflamatorias	100	4	89	4	66	3	46	2	0	0	0	0
	Incremento de células de moco	94	4	89	4	57	2	33	1	0	0	0	0
	Atrofia de lamelas secundarias	26	1	26	1	9	1	0	0	0	0	0	0

POA: Proporción de órganos afectados en %, GS: Grado de severidad

### **6.6.3. Alteraciones Histológicas Observadas en el Hígado.**

En la Tabla 8, se describen las patologías observadas en el hígado de los peces experimentales de los diferentes tratamientos. Los peces alimentados con las dietas de VC0, VC20 y VC47 fueron los que presentaron mayores problemas en este órgano y conforme se incrementó la concentración de vitamina C en la dieta, disminuyeron algunos de los signos clínicos observados en el mismo.

La degeneración grasa se presentó en todos los tratamientos (Tabla 8). En relación a esto, Chien y Hwang (2001) y Hwang y Lin (2002) evaluaron el efecto de la vitamina C en la oxidación de lípidos y la composición de ácidos grasos en el hígado de juveniles de perca tigre (*Terapon jarbua*) y carpa común (*Cyprinus carpio*) respectivamente. Mencionan que la vitamina C influyó en la composición de los lípidos, puesto que el ácido ascórbico disminuyó el contenido de ácidos grasos poliinsaturados y aumentó el de ácidos grasos saturados en el hígado conforme se elevó la concentración de vitamina C en la dieta. Esto ocurrió porque los lípidos representan el grupo más susceptible a ser dañado por los radicales libres debido a la presencia de dobles enlaces en sus ácidos grasos, de tal forma que la célula ha desarrollado sus propios métodos de protección contra agentes nocivos como son los radicales libres, en base a un complejo sistema de defensa constituido por los antioxidantes, entre los que se encuentra el ácido ascórbico, el cual protege a la membrana de la célula contra la peroxidación lipídica (Bendich *et al.*, 1986; Velázquez *et al.*, 2004).

Existen estudios acerca de los factores que influyen en la acumulación de ácidos grasos en el hígado, entre los cuales se encuentra la composición de la dieta. Al respecto, Mnari *et al.* (2007), evaluaron el contenido de grasa en el hígado y musculatura dorsal y ventral de juveniles de dorada (*Sparus aurata*), silvestres y cultivados. De acuerdo con sus resultados, la cantidad de lípidos en los peces cultivados fue mayor y el nivel más alto se observó en el hígado. Concluyeron que la diferencia entre el contenido de ácidos grasos de los juveniles de *Sparus aurata* silvestres y cultivados, se debió a que estos últimos

fueron criados en un ambiente artificial con una dieta con alto contenido de lípidos. Asimismo, Krajnović-Ozretik *et al.* (1994), analizaron la tasa de crecimiento y la asimilación de los ácidos grasos en lubina (*Dicentrarchus labrax*) silvestres y cultivados. Sus resultados mostraron que la concentración de ácidos grasos poliinsaturados de los peces cultivados fue significativamente menor que la de los peces silvestres ( $P > 0.05$ ), lo que indicó que la calidad nutricional fue mayor en estos últimos.

Otro factor que se atribuye al incremento de lípidos en el hígado es la deficiencia de colina en la dieta; Ketola (1976) y Mai *et al.* (2009), hicieron un estudio acerca del requerimiento de colina para juveniles de cobia (*Rachycentron canadum*), observando que al aumentar los niveles de colina en la dieta tendió a disminuir la concentración de lípidos en el hígado. De acuerdo con lo anterior, se puede concluir que en este caso, la vitamina C no influyó en la degeneración grasa en el hígado de los peces experimentales dado que con o sin vitamina C, todos los peces presentaron hígado grasoso en grado 4.

La concentración de ácidos grasos en el hígado de los peces experimentales no fue medida en el presente estudio, pero es necesario que en investigaciones posteriores se identifique la causa de la acumulación de grasa en este órgano.

Al inicio del experimento se pudo observar que los peces experimentales ya presentaban granulomas, los cuales por el método histoquímico de tinción de Ziehl Neelsen, resultaron positivos a las bacterias ácido resistentes *Mycobacterium sp.* Se considera que estas bacterias son oportunistas (Sniezko, 1978) y que pueden transmitirse a través del ovario (Ashburner, 1977). Por lo tanto, *Mycobacterium sp.*, pudo ser transmitido a los pargos juveniles a través de la madre. El tamaño de los granulomas fue mayor en las dietas VC0, VC20 y VC47, tendiendo a disminuir al incrementarse la concentración de vitamina C en las dietas (Tabla 8).

Los peces infectados por *Mycobacterium sp.* mostraron lesiones similares a las ya descritas en numerosos trabajos en los cuales se observaron focos de granulomas en

diferentes estados de desarrollo (Chávez y Richards, 1991; Colorni *et al.*, 1998; Prouty *et al.*, 2003).

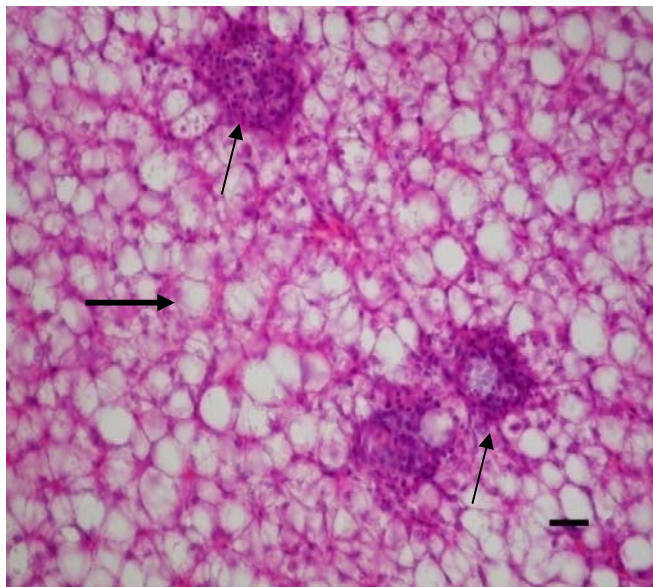
Pequeños granulomas se muestran como focos de infiltración de linfocitos y material necrótico en el centro (Fig. 15), los cuales van incrementando su tamaño hasta llegar a tubérculos suaves con un área central de material necrótico caseoso y la zona periférica está rodeada de macrófagos y linfocitos, mismos que reciben el nombre de células epiteloideas por su apariencia de epitelio (Fig. 16); esto de acuerdo con lo descrito por Muse *et al.* (2002) y Gauthier *et al.* (2009). En la Figura 17 se muestra la identificación positiva de *Mycobacterium sp.* mediante la técnica de Ziehl Neelsen.

Al igual que en el presente estudio, Chávez y Richards (1991) y Alexis *et al.* (1997), en experimentos realizados con juveniles de mojarra (*Cichlasoma urophthalmus*) y con dorada (*Sparus aurata*), respectivamente, observaron granulomas en diferente órganos como el hígado, riñón y bazo. Ellos mencionan que las dietas con concentraciones altas de vitamina C previenen la entrada a infecciones bacterianas. Por su parte, O'Keefe y Grant (1991), afirman que la vitamina C incrementa la resistencia del sistema inmunológico a infecciones bacterianas.

En el presente estudio, se pudo observar un efecto positivo de la concentración de vitamina C, puesto que en las dietas VC82, VC177 Y VC718 los granulomas fueron menores en número y tamaño y la proporción de órganos afectados tendió a reducirse al aumentar el nivel de LA2PP en la dieta (Tabla 8).

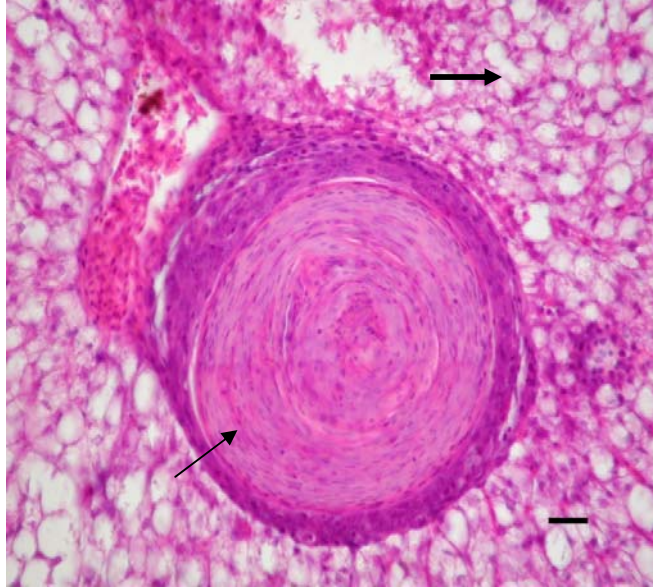


**Figura 14.** Hepatopáncreas de un pez experimental con tejido sin patologías. Hígado (flecha delgada), páncreas (flecha gruesa), barra (100 $\mu$ ) H&E.



**Figura 15.-** Granulomas hepáticos (flechas delgadas), presente en las dietas con 82-718 mg/kg; también se puede observar degeneración grasa (flechas gruesas), barra (20 $\mu$ ) H&E.





**Figura 16.** Granuloma compuesto de capas concéntricas de células epiteloides que forman una lesión esférica que encapsula a las bacterias (flecha delgada) presentes en las dietas con niveles de 0 a 47 mg/kg; también se muestra degeneración grasa en grado 4 (flecha gruesa), barra (20 $\mu$ ) H&E.



**Figura 17.-** Identificación positiva de *Mycobacterium* sp. a través del método de tinción de Ziehl Neelsen, barra (20 $\mu$ ).

Actualmente no existe un tratamiento para atacar la infección por *Mycobacterium sp.* en peces (Gauthier y Rhodes, 2009). Sin embargo, Stone (1991) y Andosca y Foley (2009), en experimentos realizados para evaluar el efecto de la vitamina C en el tratamiento de la tuberculosis en seres humanos, establecieron que el ácido ascórbico puede combatir infecciones bacterianas, como la tuberculosis, puesto que se considera que dicha vitamina es un poderoso bactericida por dos razones:

1. Tiene el poder de neutralizar y desactivar una gran variedad de toxinas bacterianas.
2. Ayuda a mantener la integridad de las células blancas, las cuales intervienen en la defensa del organismo contra sustancias extrañas o agentes infecciosos.

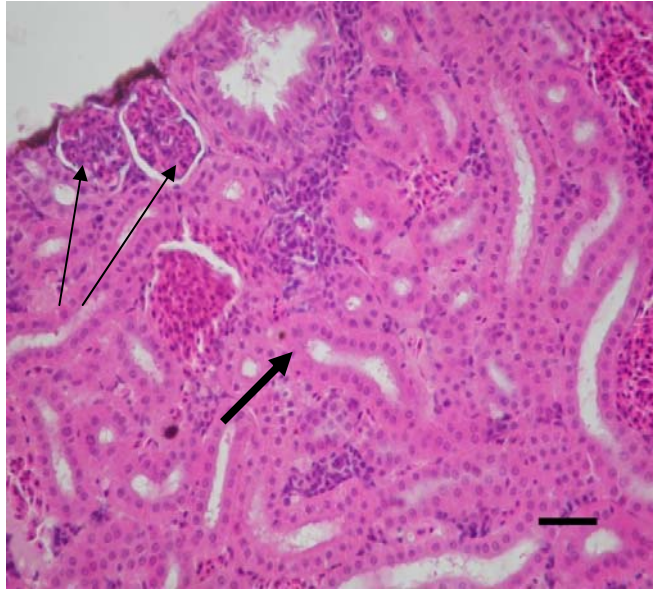
Recientemente, Anbarasu y Chandran (2001), Sobhna *et al.* (2002) y García *et al.* (2007), han mencionado que la vitamina C juega un papel importante en las funciones fisiológicas y mejora de la resistencia contra la bacteria *Aeromonas hydrophila* en especies de peces como bagre bigotón (*Mystus julio*), carpa mrigal (*Cirrhinus mrigala*) y pez chato (*Piaractus mesopotamicus*) respectivamente. Lin y Shiau (2005) y Ai *et al.* (2006), encontraron que juveniles de mero malabarico (*Epinephelus malabaricus*) y corvina japonesa (*Pseudosciaena crocea*), requieren una concentración >76 y 20 mg de vitamina C/kg de dieta respectivamente para mejorar la respuesta inmune inespecífica de los peces que fueron infectados con bacterias (*Vibrio carchariae*, *Vibrio harveyi*).

La concentración de LA2PP óptima para el crecimiento de los pargos juveniles *L. guttatus* obtenida en el presente estudio fue de 137 mg/kg de dieta. Sin embargo, en función de que se presentaron signos clínicos en los peces que manifestaron mayor desarrollo, es probable que los juveniles de *L. guttatus*, requieran una concentración mayor a 137 mg/kg de dieta para prevenir infecciones bacterianas como las causadas por *Mycobacterium sp.*

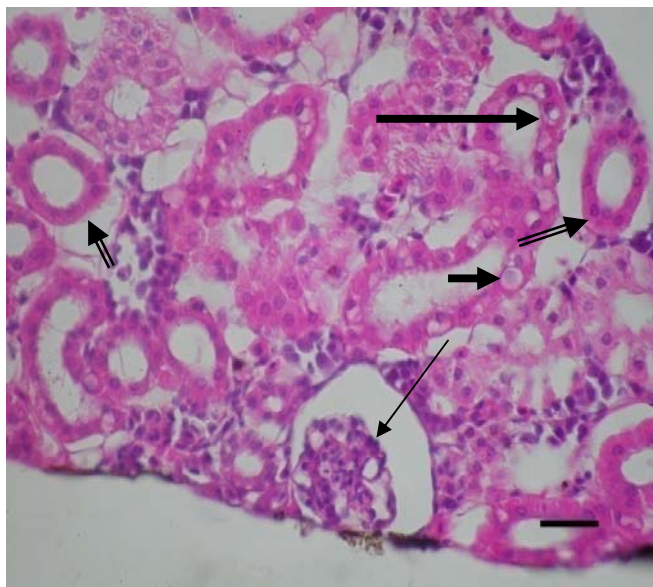
#### **6.6.4. Alteraciones Histológicas Observadas en el Riñón.**

Mediante el análisis histopatológico del riñón de los peces experimentales, se observó que en los organismos alimentados con las dietas con mayor inclusión de vitamina C, disminuyó el grado de severidad de los signos clínicos analizados en este órgano e incluso algunos de las patologías no fueron localizadas en esos peces experimentales (Tabla 8).

La vacuolación del epitelio de los túbulos renales (acumulación de grandes vacuolas en el citoplasma de las células como resultado del inchamiento de las mitocondrias) (Ferguson, 2006), solo fue observada en las dietas de menor concentración de ácido ascórbico (VC0, VC20 y VC47), mientras que la atrofia glomerular y la dilatación de los vasos sanguíneos del glomérulo se presentó en todos los tratamientos; sin embargo, el número de organismos afectados y el grado de severidad fue menor en las dietas que tuvieron mayor nivel de inclusión de ácido ascórbico (Tabla 8), (Fig. 19, 20, 21). Referente a lo anterior no hay ningún estudio que reporte las patologías de la vacuolación del epitelio de los túbulo renales y dilatación de los vasos sanguíneos del glomérulo en relación con la variación de la concentración de vitamina C en la dieta de peces. Sin embargo, en algunas investigaciones se han localizado otras alteraciones histopatológicas en el riñón que han sido atribuidos a la carencia de vitamina C en la dieta. Entre dichas investigaciones se encuentra la realizada por Alexis *et al.* (1997), quienes evaluaron el efecto de la falta de ácido ascórbico en la dorada (*Sparus aurata*). En relación con sus resultados mencionan que el riñón fue el órgano más afectado por la deficiencia de vitamina C. Los daños observados fueron granulación eosinófila en las células endoteliales, glomerulonefritis y migración de células inflamatorias. Por su parte, Phromkunthong *et al.* (1997), analizaron diferentes concentraciones de L-ascorbil-2 magnesio en juveniles de perca gigante (*Lates calcarifer*), encontrando que la falta de vitamina C en la dieta produce cambios en el riñón, tales como deformación y fusión de las mitocondrias de las células epiteliales del túbulo renal.



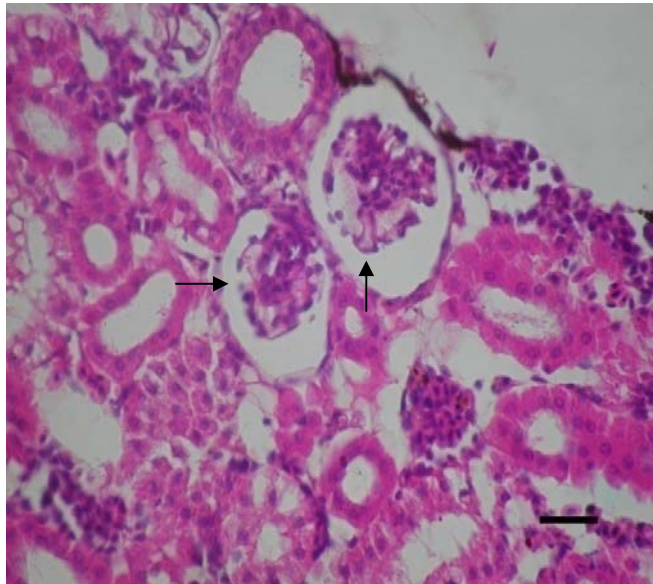
**Figura 18.** Riñón de un pez experimental, con tejido sin patologías. Glomerulos (flecha delgada), túbulos renales (flechas gruesas), barra (20 $\mu$ ) H&E.



**Figura 19.** Porción del riñón posterior de los peces experimentales que fueron alimentados con la dieta VC0 muestra atrofia glomerular con clara dilatación de los vasos sanguíneos (flechas delgadas), atrofia de túbulos proximales (doble flecha) y vacuolación de los túbulos renales distales (flecha gruesa), barra (20 $\mu$ ) H&E.



**Figura 20.** Varios túbulos renales con vacuolas. Estos cambios fueron observados en los peces experimentales que fueron alimentados con un nivel de inclusión de vitamina C de  $\leq 47$  mg/kg, barra (20 $\mu$ ) H&E.



**Figura 21.** Corte del riñón de los peces experimentales que fueron alimentados con un nivel de vitamina C de 20 mg/kg muestra atrofia glomerular con dilatación en sus vasos sanguíneos, barra (20 $\mu$ ) H&E.

La vacuolación del epitelio de los túbulos renales ha sido identificada en otras investigaciones. Kurtović *et al.* (2008), realizaron un estudio histológico comparativo del bazo y el riñón de juveniles de lubina (*Dicentrarchus labrax*) silvestres y en cultivo. La evaluación histopatológica mostró diferencias significativas en el número de centros melanomacrófagos del bazo y el riñón y atrofia glomerular del riñón de los organismos cultivados, también fue observada degeneración vacuolar tanto en los organismos silvestres como cultivados, donde la frecuencia fue mayor en los peces cultivados, sin embargo, estadísticamente no se encontraron diferencias significativas. Los autores concluyeron que estas alteraciones histológicas posiblemente se debieron a una respuesta fisiológica al estrés.

Referente a lo anterior, se considera que la vitamina C mejora la resistencia contra factores estresantes como lo son patógenos oportunistas, cambios ambientales, transporte, manejo, entre otros. Los peces reaccionan ante situaciones de estrés secretando hormonas como corticosteroides y catecolaminas. El papel que desempeña el ácido ascórbico en la reducción del estrés se relaciona al hecho de que la liberación de las hormonas inmunodepresivas se lleva a cabo a través de las células interrenales y de Cromafin, las cuales presentan un alto consumo de ácido ascórbico (Dabrowski, 2001).

Para comprobar lo mencionado anteriormente, se han hecho investigaciones acerca de como la vitamina C está involucrada en la respuesta al estrés. Henrique *et al.* (1998), evaluaron el efecto de la vitamina C en el crecimiento y la respuesta al estrés por parte de juveniles de *Sparus aurata* cuando fueron sometidos a diferentes intervalos de tiempo de hipoxia. De acuerdo con sus resultados, encontraron que los niveles de cortisol fueron significativamente más bajos en los peces alimentados con un nivel de LA2PP de 100mg/kg. Por su parte, Montero *et al.* (1999) y Ortuño *et al.* (2001), analizaron el efecto de respuesta al estrés en experimentos realizados con juveniles de *Sparus aurata*, al suministrar diferentes concentraciones de vitamina C y E. Estos autores mencionan que el ácido ascórbico y el tocoferol ayudan a reducir los parámetros del mecanismo de

defensa inmuno inespecífica (niveles de cortisol, actividad de lisozima, actividad complementaria y glucosa).

Cualquier enfermedad es un factor estresante y como tal hace que se debilite el sistema inmunológico. Por ello es posible que en los juveniles de *L. guttatus* que fueron alimentados con dietas que contuvieron menor concentración de vitamina C, su sistema inmunológico se deprimió y esto causó que se volvieran más susceptibles a contraer patologías.

Por otra parte, es posible que la dilatación de los vasos sanguíneos se halla presentado en este estudio porque la vitamina C juega un papel vital en el mantenimiento de la integridad de los vasos sanguíneos, ya que el ácido ascórbico interviene en la síntesis del colágeno, el cual es parte esencial de los mismos (Wahli *et al.*, 2003).

La atrofia glomerular observada en el riñón de los peces experimentales (Fig. 21), tuvo un grado de severidad de 3 a 4 en las dietas VC0, VC20 y VC47, mientras que en las dietas con una concentración mayor se observó escaso tejido dañado y el grado de severidad se redujo hasta llegar a 1 (Tabla 8).

Al igual que en el presente estudio, Adham *et al.* (2000), en un experimento realizado con juveniles de bagre africano (*Clarias gariepinus*), observaron atrofia glomerular además de desprendimiento de cápsula de Bowman y dilatación tubular en el riñón de estos peces. Sus resultados indican que la deficiencia de vitamina C causa cambios histopatológicos en diferentes órganos y que estos cambios degenerativos reflejan claramente la importancia del ácido ascórbico como antioxidante.

En el presente estudio, se pudo observar un efecto positivo de la concentración de vitamina C en el riñón de los pargos juveniles, puesto que en las dietas VC82, VC177 y VC7184, la aparición de atrofia glomerular, vacuolación de los túbulos renales y la

dilatación de los vasos sanguíneos fue menor en número y el índice de presencia tendió a reducirse al aumentar el nivel de vitamina C en la dieta (Tabla 8). La desaparición de dichas patologías podrían observarse posiblemente con un nivel mayor de LA2PP a 718 mg/kg.

#### **6.6.4. Alteraciones Histológicas Observadas en el Cerebro.**

Los peces alimentados con las dietas VC177 y VC718 no mostraron ninguna alteración histológica en el cerebro, mientras que los peces que recibieron las dietas VC0-VC82 presentaron cambios celulares en dicho órgano (Tabla 8).

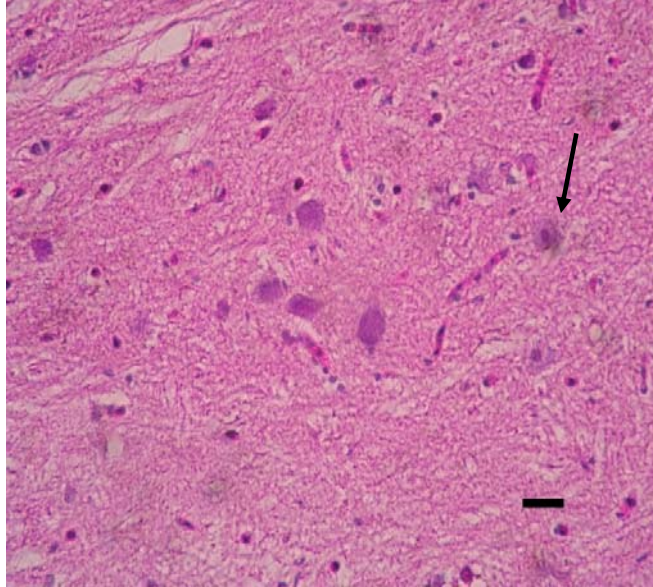
De acuerdo con los resultados que se presentan en la Tabla 8, los signos clínicos que provocaron mayor grado de severidad, se identificaron en las dietas VC0 y VC20.

En la Figura 22 se muestra una neurona normal, mientras que las neuronas afectadas presentan un núcleo excéntrico con clara cromatolisis central debido a que la fatiga o lesión neuronal ocasiona que la sustancia de Nissl (retículo endoplasmático rugoso) se movilice y concentre en la periferia del citoplasma. En ocasiones ya no se observa la sustancia de Nissl debido a su desaparición progresiva y algunas se observan muy eosinofílicas (Fig. 23, 24, 25). De acuerdo con Martin *et al.* (1999) el sitio principal donde se generan patologías en el cerebro es en las células nerviosas. En relación a esto, se considera que la vitamina C es más que un simple micronutriente en el sistema nervioso, ya que realiza numerosas funciones en el cerebro. Milby *et al.* (1981), sugieren que el ácido ascórbico desempeña un papel muy importante en el funcionamiento neuronal. Grünewald (1993), señala que la importancia del ácido ascórbico en la neurofisiología es por su alta concentración en el cerebro. Debido a que todas las acciones de la vitamina C implican la donación de un solo electrón, se considera como un poderoso antioxidante que protege al sistema nervioso de enfermedades neurodegenerativas (Harrison y May, 2009). En este sentido, Halliwell y Gutteridge (1985), afirman que la vitamina C actúa

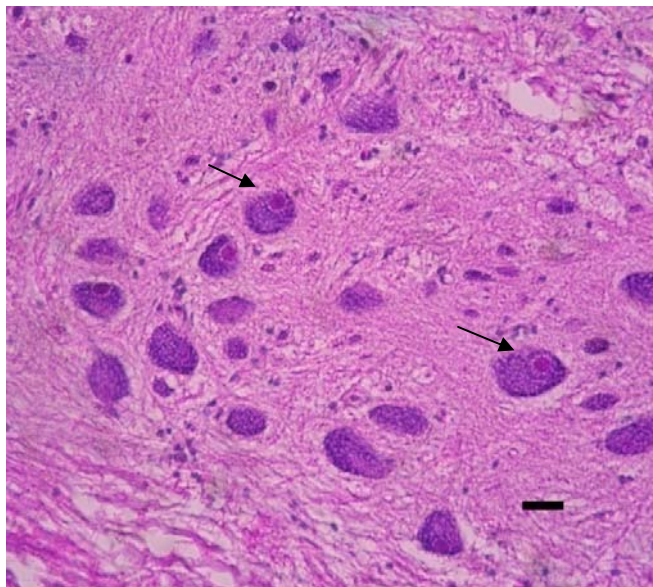


como un prooxidante en concentraciones bajas y como antioxidante en concentraciones altas.

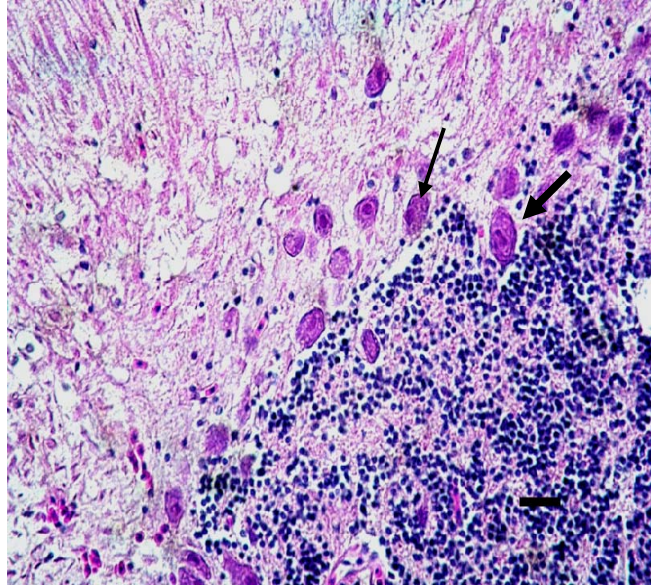
Sulkin y Sulkin (1967) utilizaron un microscopio electrónico para investigar los cambios de las células ganglionares de cobayos durante el consumo de ácido ascórbico. De acuerdo con sus resultados, concluyeron que la mayoría de las alteraciones ocurrieron en las células ganglionares de los animales que fueron alimentados con una dieta deficiente de vitamina C. Chávez y Richards (1991), en un experimento realizado con juveniles de mojarra (*Cichlasoma urophthalmus*), encontraron que las neuronas de los ganglios y tejido nervioso fueron anormales con cambios como inflamación leve, cromatólisis central, depósitos de melanina, núcleos excéntricos y disolución de los gránulos de Nissl, cuando los peces carecieron de vitamina C en su dieta. Por lo tanto, es posible que las concentraciones de vitamina C presentes en el cerebro de los juveniles de *L. guttatus*, que fueron alimentados con las dietas VC0-VC82 no fueron suficientes para promover un efecto antioxidante en el sistema nervioso.



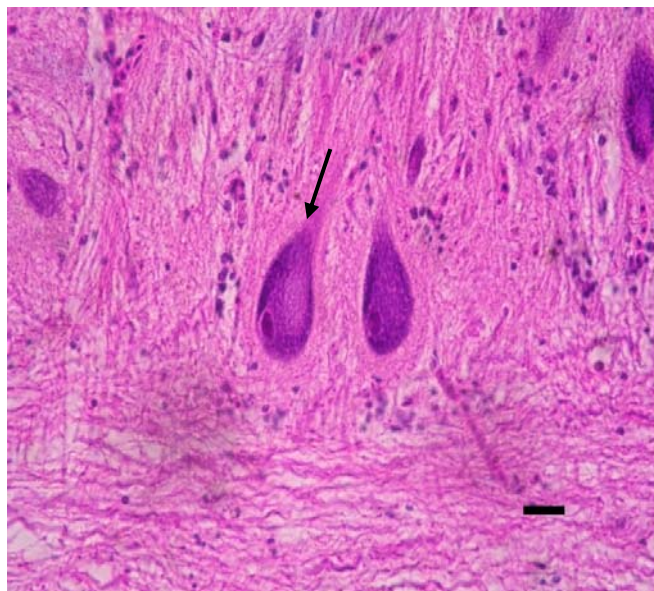
**Figura 22.-** Neuronas de un pez experimental de la dieta VC718, donde se observa el tejido sin patologías con su núcleo central y la sustancia de Nissl (retículo endoplasmático rugoso) distribuída homogéneamente, barra (20 $\mu$ ) H&E.



**Figura 23.-** Cerebro de los peces experimentales que fueron alimentados con la dieta VC0, cuyas neuronas presentan migración del núcleo y concentración de los gránulos de Nissl en la periferia, barra (20 $\mu$ ) H&E.



**Figura 24.-** Necrosis de las células de Purkinje de los peces alimentados con VC0 en las que se observan núcleos excéntricos (flecha delgada), citoplasma con eosinofilia intensa y marginación periférica de la sustancia de Nissl (flecha gruesa), barra (20 $\mu$ ) H&E.



**Figura 25.-** Neurona de peces experimentales alimentados con la dieta VC20, con clara cromatolisis central en donde se observa migración del núcleo a la periferia con marginación periférica de la sustancia de Nissl, barra (20 $\mu$ ) H&E.

### **6.6.5. Alteraciones Histológicas Observadas en las Branquias.**

En la Tabla 8, se describen las patologías observadas en las branquias de los peces de los diferentes tratamientos. Los peces alimentados con las dietas VC0, VC20 y VC47 fueron los que presentaron mayores problemas en este órgano y conforme se incrementó la concentración de vitamina C en la dieta disminuyeron los cambios patológicos (Fig. 27, 28, 29, 30).

Las branquias de los peces experimentales de la dieta VC0, VC20 y VC47 presentaron forma inusual del cartílago debido a la hipertrofia de los condrocitos, hiperplasia del epitelio y telangiectasis debido al rompimiento de las células pilar, edema lamelar multifocal, infiltración de linfocitos, incremento de las células de moco y acortamiento o atrofia de las lamelas secundarias (Tabla 8).

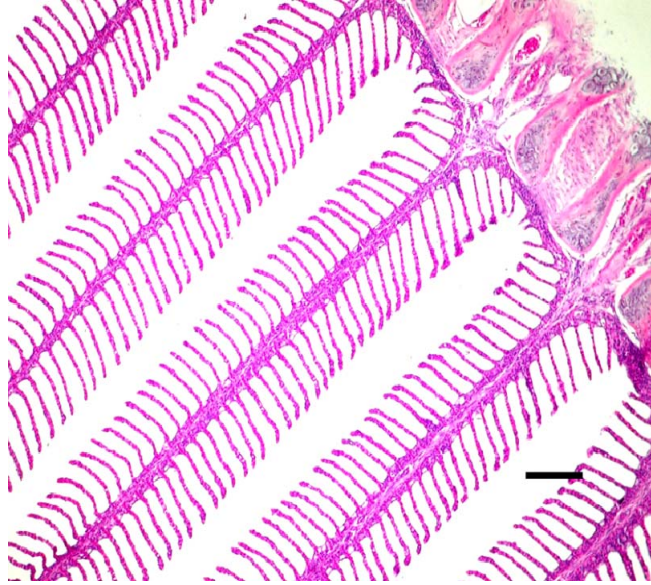
Las patologías localizadas en las branquias del pargo flamenco durante el presente estudio fueron similares a las descritas por Ashley *et al.* (1975) y Dabrowski *et al.* (1990), en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), Chávez y Richard (1991) en mojarra (*Cichlasoma urophthalmus*) y Adham *et al.* (2000), en bagre africano (*Clarias gariepinus*), quienes a partir de análisis histológicos, encontraron engrosamiento de las lamelas primarias, hiperplasia, edemas, telangiectasis, deformación del cartílago y fusión de las lamelas secundarias en las branquias.

La vitamina C esta involucrada en múltiples sistemas enzimáticos y en procesos de hidroxilación, incluyendo prolina y lisina, los cuales son necesarios para la formación de colágeno y cartílago, siendo estos últimos componentes importantes de la piel y de los huesos (Padh, 1991; Verlhac *et al.*, 1996). Adham *et al.* (2000), menciona que la vitamina C previene los daños oxidativos en diferentes tejidos. En relación con la oxidación, la vitamina C es cofactor de procesos biológicos como la síntesis de colágeno, funciones celulares, hormonales y sistema inmune (Lall y Lewis-Mcrea,

2007). Posiblemente esto explique en parte el porque de las patologías observadas en las branquias de los peces en el presente estudio, ya que los daños más severos fueron localizados en el tejido epitelial y el cartílago (deformación del cartílago de las lamelas branquiales, multiplicación anormal de células, fusión y acortamiento de las lamelas secundarias, agrandamiento de vasos sanguíneos y acumulación de líquido en el espacio tisular, intercelular o intersticial).

En cuanto a la infiltración de linfocitos (Fig. 31), se considera que estos son células altamente diferenciadas con capacidad de respuesta frente a los estímulos inmunológicos (Ellis, 1977). Son los responsables de la respuesta inmune específica celular, que se traduce en la producción de anticuerpos (Campbell *et al.*, 1990). Posiblemente en este estudio se observó infiltración de linfocitos en la base de las lamelas branquiales, porque esas células actúan como defensa del organismo y aparecen en tejidos afectados por procesos inflamatorios, refiriéndose este últimos procesos a una respuesta inespecífica y por lo tanto ayuda a reparar el tejido u órgano dañado (Nero, 2005).

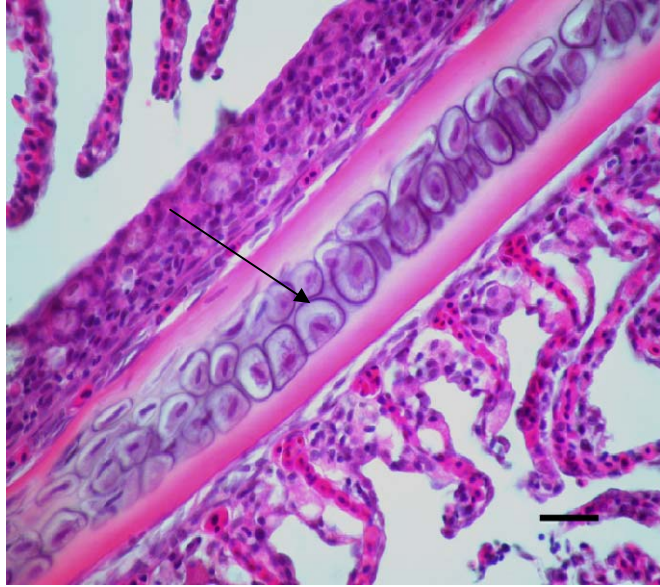
El sistema inmune en los peces también incluye otra serie de propiedades defensivas, como lo son la activación y el aumento en número y tamaño de las células de moco branquiales, en respuesta casi siempre a la migración de células productoras de anticuerpos a las mucosas branquiales (Lodemel *et al.*, 2001). Estas propiedades defensivas pueden ser activadas por estrés y como respuesta a una alteración patológica (Zacarias, 2009). De acuerdo con la literatura analizada, no se encontró información que permita relacionar la vitamina C y la producción de células de moco braquiales. En función de lo anterior y lo descrito en este párrafo, se puede determinar que en el presente estudio la producción de células de moco branquiales posiblemente estuvo asociada a una respuesta del sistema inmunológico de los pargos juveniles para contrarrestar los efectos patológicos y estresantes provocados por la deficiencia de vitmina C en su dieta.



**Figura 26.-** Branquias de un pez experimental de la dieta VC718, donde se observan las lamelas primarias y secundarias sin patologías, barra (100 $\mu$ ) H&E.



**Figura 27.-** Porción de la lamela branquial de los peces experimentales alimentados con la dieta VC0, muestra hiperplasia (flechas delgadas), edema (flechas gruesas), barra (20 $\mu$ ) H&E.



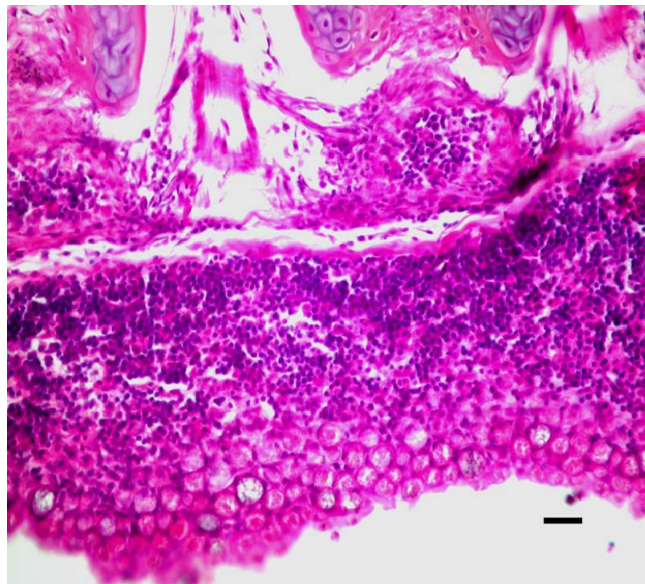
**Figura 28.-** Branquias de peces experimentales alimentados con VC20, con hipertrofia de condrocitos, barra (20 $\mu$ ) H&E.



**Figura 29.-** Porción de la lamela branquial de los peces experimentales alimentados con la dieta VC0, muestra hiperplasia (flecha delgada), telangiectasis (doble flecha) y edema (flecha gruesa), barra (20 $\mu$ ) H&E.



**Figura 30.-** Branquias de los peces alimentados con VC20, con acortamiento de las lamelas secundarias y deformación del cartilago debido a la hipertrofia de los condrocitos, barra (20 $\mu$ ) H&E.



**Figura 31.-** Branquias con infiltración de linfocitos en el arco branquial y aumento de las células de moco de los peces alimentados con VC0, barra (20 $\mu$ ) H&E.



De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede establecer que el requerimiento de vitamina C que permite el máximo crecimiento de los pargos juveniles *L. guttatus* evitando el desperdicio vitamínico, es de 137 mg de L-ascorbil 2 polifosfato/kg de dieta, equivalente a 47 mg de ácido ascórbico/kg de dieta, sin embargo, dicha concentración e inclusive la concentración mas alta (718 mg L-ascorbil 2 polifosfato/kg de dieta equivalente a 251 mg de ácido ascórbico/kg de dieta) no pudieron eliminar la presencia de granulomas y la infiltración grasa en el hígado.

## 7. CONCLUSIONES

- La falta de vitamina C en la dieta del pargo *L. guttatus* durante su etapa juvenil, provoca reducción del crecimiento y la presencia de signos clínicos.
- La concentración de vitamina C que permite el máximo crecimiento de los pargos juveniles *L. guttatus* es de 137 mg de L–ascorbil-2 polifosfato/kg de dieta, equivalente a 47.95 mg de ácido ascórbico/kg de dieta.
- En el presente estudio no fue posible establecer el nivel de almacenamiento máximo de vitamina C en el hígado del pargo juvenil *L. guttatus*, sin embargo, se determinó que existe una correlación positiva entre el nivel de almacenamiento en el hígado del pez y la concentración incluida en su dieta.
- Cuando se alimenta juveniles de pargo *L. guttatus* con dietas cuya concentración de vitamina C fluctua entre 0 y 82 mg de L –ascorbil-2 polifosfato (0-28.7 mg de ácido ascórbico)/kg, se presentan los siguientes signos clínicos externos: nado errático, oscurecimiento de la piel, erosión de las aletas y descamación y alteraciones histopatológicas en el hígado, riñón, cerebro y branquias de estos peces.
- Incluir más de 177 mg de L –ascorbil-2 polifosfato (61.95 mg de ácido ascórbico)/kg del alimento suministrado al pargo juvenil *L. guttatus*, disminuye las alteraciones histopatológicas y el grado de severidad en el hígado, riñón y branquias y elimina los cambios celulares patológicos del cerebro de estos peces.

## 8. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un estudio en el que se incremente las concentraciones de vitamina C por encima de 718 mg de L -ascorbil-2 polifosfato (251.3 mg de ácido ascórbico)/kg del alimento suministrado a los pargos juveniles *L. guttatus*, para determinar la concentración de almacenamiento máximo de esta vitamina en su hígado y establecer la concentración más adecuada para fortalecer su respuesta inmune.
- Se recomienda seguir realizando proyectos tendientes a la optimización de la concentración de vitamina C y demás vitaminas para el máximo desarrollo del pargo *L. guttatus*, caracterizándolos para cada etapa del cultivo (alevinaje, pre engorde y engorde).

## 9. LITERATURA CITADA

- Abdelghany, A., 1998. Feed efficiency, nutrient retention and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., fed diets containing L-ascorbic acid, L-ascorbyl-2- sulphate or L-ascorbyl-2-polyphosphate. *Aquaculture Research* 29, 503–510.
- Adham, K., Hashem, H., Abu-Shabana, M. and Kamel, A., 2000. Vitamin C deficiency in the catfish *Clarias gariepinus*. *Aquaculture Nutrition* 6 (2), 129-139.
- Aguirre, P. and Gatlin III, D., 1999. Dietary vitamin C of red drum *Sciaenops Ocellatus*, *Aquaculture Nutrition* 5, 247:249.
- Ai, Q., Mai, K., Zhang, C., Xu, W., Duan, Q., Tan, B. and Liufu, Z., 2004. Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicas*. *Aquaculture* 242, 489–500
- Ai, Q., Mai, K., Tan, B., Xu, W., Zhang, C., Ma, H. and Liufu, Z., 2006. Effects of dietary vitamin C on survival, growth, and immunity of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture* 261, 327–336
- Akiyama, D., 1995. Nutrición, alimentos y alimentación de los peces. *Soyanoticias* 3 (4), 22 – 25.
- 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., 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 nativas en el Caribe y avances en México. III Conferencia mexicana sobre cultivo de peces nativos, Morelia, Michoacán. pp. 114-133.
- Álvarez, L. L. and Tsuzuki, M., 2008. A review of methods for *Centropomus spp.* (snooks) aquaculture and recommendations for the establishment of their culture in Latin America. Aquaculture Research 39, 684-700.
- 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.
- Anbarasu, K. and Chandran, M., 2001. Effect of ascorbic acid on the immune response of the catfish, *Mystus gulio* (Hamilton), to different bacterins of *Aeromonas hydrophila*. Fish & Shellfish Immunology 11, 347–355
- Andosca, J. and Foley, J., 2009. Calcium Ribonate and Vitamin C in the Treatment of Tuberculosis. Official Publication of American Collage of Chest Physicians DOI 10.1378/chest.14.1.107
- AOAC, 1984. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists, 14th edition, Arlington, VA, 1141pp.
- 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.

- Ashburner, L. D., 1977. Micobacteriosis in Hatchery confined Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum) in Australia. *Journal of Fish Biology* 10, 523 – 528.
- Ashley, L., Halver, J. and Smith, R., 1975. Ascorbic acid deficiency in rainbow trout and coho salmon and efectos on wound healing, in William E. and Migaki. G. *The pathology of fishes*. The University of Wisconsin Press, pp 769-785.
- Avilés. Q., 2002. Estado actual y desafíos de la piscicultura marina en México en Reunión nacional sobre cultivo de peces marinos, INP, 23-24 de mayo 2002, La Paz, B.C.S. pp 72-86.
- Basabe, T., 2000. Funciones de la vitamina C en el metabolismo del colágeno. *Cubana Alimentation Nutrition* 14 (1), 46-54.
- Bendich., A., Machlin, L., Scandurra, O., Burton, G. and Wayner, D., 1986. The Antioxidant Role of Vitamin C. *Adv. in Free Radical Biology & Medicine* 2, 419-444.
- Bloom, J., Dabrowski, K., 1996. Ascorbic acid metabolism in fish: is there a maternal effect on the progeny?. *Aquaculture* 147, 215-224
- Campbell, T. and Murru, F., 1990. An Introduction to fish hematology. *The Compendium Small Animal* 12, 525 – 533.
- Chatterjee, G.C., 1967. Effect of ascorbic acid deficiency in animals. In: Sebrell, W.H., Harries, R.S. (Eds.), *the Vitamins*, vol. 1. Academic Press, New York, NY, pp. 407– 456 en Wang, X., Kim, K. and Sungchul, C., 2003. Comparison of L-ascorbyl-2-monophosphate-Ca with L-ascorbyl-2-monophosphate-Na/Ca on growth and tissue ascorbic acid concentrations in Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquaculture* 225, 387-395.

- Chávez, S.C.M. and Richards, R., 1991. Histopathology of vitamin C deficiency in a cichlid, *Cichlasoma urophthalmus* (Günther). *Journal of Fish Diseases* 14, 507-519.
- Chavéz-Sánchez, C., Álvarez-Lajonchère, L., Abdo de la Parra, M. and García-Aguilar, N., 2008. Advances in the culture of the mexican bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*, Jenyns (1842). *Aquaculture Research* 39, 718-730.
- Chen, R., Lochmann, R., Goodwin, A., Praveen, K., Dabrowski, K. and Lee, K., 2004. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). *Aquaculture* 242, 553-559.
- Chien, L. and Hwang, D., 2001. Effects of thermal stress and vitamin C on lipid peroxidation and fatty acid composition in the liver of thornfish *Terapon jarbua*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 128, 91-97.
- Cho, S., Lim, Y., Lee, J., Park, S. and Lee S., 2003. Effects of feeding rate and feeding frequency on survival, growth, and body composition of Ayu Post-Larvae *Plecoglossus altivelis*. *Journal of the World Aquaculture Society* 34 (1), 85–91.
- Colomi, A., Avtalion, R., Knibb, W., Berger, E., Colomi, B. and Timan, B., 1998. Histopathology of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) experimentally infected with *Mycobacterium marinum* and treated with streptomycin and garlic (*Allium sativum*) extract, *Aquaculture* 160, 1–17.
- Dabrowski, K., 2000. Absorption of ascorbic acid and ascorbic sulfate and ascorbate metabolism in common carp (*Cyprinus carpio*). *Com. Physiol B* 160,549-561.
- Dabrowski, K., 2001. *Ascorbic Acid in Aquatic Organisms: Status and Perspectives*. Boca Raton, FL: CRC Press 287pp.

- Dabrowski, K., El-Fiky, N., Köck, G., Frigg, M. and Wieser, W., 1990. Requirement and utilization of ascorbic acid and ascorbic sulfate in juvenile rainbow trout. *Aquaculture* 91, 317-337.
- De Silva, S., Gunasekera, R. and Atapattu, D., 1989. The Dietary Protein Requirements of Young Tilapia and an Evaluation of the Least Cost Dietary Protein Levels. *Aquaculture* 80, 271-284.
- Drury, R.A.B. and Walington E.A. 1980. Carleton's Histological Techniques. 5th Edition. Oxford University Press, 520 pp.
- Ellis, A. E., 1977. The leucocytes of fish: A review. *Journal Fish Biology* 11, 453-491.
- 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.
- FAO, 2008. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2008. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, Roma, pp. 1-196.
- Fattah, A. and Sayed, M., 2002. Effects of stocking density and feeding levels on growth and feed efficiency of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fry. *Aquaculture Research* 33 (8), 621–626.
- Ferguson, H. W., 2006. Systemic Pathology of fish. Ed. Scotian press. ed. 2a. London, UK. 367 pp.
- Fontagné, S., Bazin, D., Brèque, J., Vachot, C., Bernarde C., Rouault T. and Bergot, P., 2006. Effects of dietary oxidized lipid and vitamin A on the early development and antioxidant status of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) larvae. *Aquaculture* 257, 400–411.



- Frischknecht, R.T., Wahli, W. and Meier, W., 1994. Comparison of pathological changes due to deficiency of vitamin C, vitamin E and combinations of vitamins C and E in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 17, 31-45.
- Gabaudan, J. and Verlhac, V., 2001. Critical review of the requirements of ascorbic acid in cold and cool water fishes (salmonid, percids, plecoglossids and flatfishes). En: Dabrowski, K., 2001. *Ascorbic Acid in aquatic organisms, Statutes and perspectives.* CRC Press. U.S.A, pp. 33-48
- Garcia, F., Pilarski, F., Makoto, E., Ruas, F. and Laterça, M., 2007. Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 271, 39–46.
- García, O., 2009. Nutrition and feeding research in the spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) and bullseye puffer (*Sphoeroides annulatus*), new species for marine aquaculture. *Fish Physiol Biochem* 35, 69-80.
- 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.
- García, O., Abdo, I., Villa, Y. and González, B. 2004. Effect of different dietary protein levels in growth, survival and body composition of spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. *Resúmenes del VII Simposio Internacional de Nutrición Acuícola,* Noviembre 16-19, 2004, Hermosillo, Sonora, México.

- García, O., A. and Lazo, J., 2004. Marine fish larviculture in México: Advances and challenges in nutrition and feeding. In: Cruz, S. L., Ricque, M. D., Nieto, L. M., Villareal, D., Scholz, U. and M. González, 2004. Avances en nutrición acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, Noviembre 2004, Hermosillo, Sonora, México, pp. 16-19.
- Gauthier, D. and Rhodes, M., 2009. Mycobacteriosis in fishes: A review. *The Veterinary Journal* 180, 33–47.
- Grahl-Madsen, E. and Lie, O., 1997. Effects of different levels of vitamin K in diets for cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 15 (1), 269-274.
- Grünewald, R., 1993. Ascorbic acid in the brain. *Brain Research Reviews* 18, 123-133.
- Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P. and R. Métailler, 2004. Nutrición y alimentación de peces y crustáceos. Ediciones Mundiprensa, Madrid, España, 471 pp.
- Hallwell, B. and Gutteridge, J., 1985. Oxygen radicals and the nervous system. *FINS* 22-26.
- Hamre, K., Waagbo, R., Berge, R. and Lie O, 1997. Vitamin C and E interact in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*, L). *Free radical biology & medicine* 22, 137-149.
- Harrison, F. and May, J., 2009. Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radical Biology & Medicine* 46, 719–730
- 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.

- Hernández, H. L., Teshima, S., Koshio, S., Ishikawa, M., Tanaka, Y. and Shah A. M., 2007. Effects of vitamin A on growth, serum anti-bacterial activity and transaminase activities in the juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 262, 444–450.
- 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.
- Hwnag, D. and Lin, T., 2002. Effect of temperature on dietary vitamin C requirement and lipid in common carp. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 131, 1-7.
- 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.
- Kamonporn, T., Supranee, C., Temdoun, S., Pornlerd, C. and Somkeat, K., 1999. Diagnostic procedures for finfish diseases, Aquatic Animal Health Research Institute, Department of fisheries, Thailand, pp. 1-9.
- Ketola, H. G., 1976. Choline metabolism and nutritional requirement of lake trout (*Salvelinus namaycush*). *J. Anim. Sci.* 43, 474-477.
- Kinsella, J. E., Frankel, E., German, B. and Kanner, J. (1993). Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology*, 47(4), 85–89 en Yi, W., Wu, X., Cao, R., Song, H. and Ma, L., 2009. Biological evaluations of novel vitamin C esters as mushroom tyrosinase inhibitors and antioxidants, *Food chemistry*, doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.108.

- Krajnovic-Ozretic, M., Najdek, A. and Ozretic, B., 1994. Fatty acids in liver and muscle of farmed and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Camp. Biochem. Physiol* 109 (3), 611-617.
- Kurtovic, B., Teskeredzic, E. and Teskeredzic, Z., 2008. Histoological comparison of spleen and kidney tissue from farmed and wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Acta adriatic* 49 (2), 147-154.
- Lagler, K. F., Bardach, J. E., Miller, R. R. y May Passino, D. R., 1990. *Ictiología*. Ed. AGT Editor, S. A., México, D. F., 489 pp.
- Lall, S. and Lewis-McCrea, L., 2007. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish An overview. *Aquaculture* 267, 3-19.
- Lee, G. and Luna, H.L., 1968. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. Third edition. The Blackiston Division. Mac Graw-Hill Book Company. New York, Toronto, London, Sydney., 257pp.
- Lehninger, A., 1994. *Bioquímica*, segunda edición, ediciones Omega, S. A., Barcelona, 1117 pp.
- Lenntech, 2004. C vitamin. BBC Health and the Linus Pauling Institute. [www.lenntech.com/espanol/feedback\\_esp.htm](http://www.lenntech.com/espanol/feedback_esp.htm).
- Lin, M. and Shiau, Y., 2005. Requirements of vitamin C (L-ascorbyl-2-sulphate and L-ascorbyl-2-polyphosphate) and its effects on non-specific immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture Nutrition* 11, 183–189.
- 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.

- Liu, R., P., Plumb, A., J., Guerin, M. and Lovell, T., R., 1989. Effect of megalevels of dietary vitamin C on the immune response of channel catfish *Ictalurus punctatus* in ponds. *Diseases of Aquatic Organisms* 7, 191-194.
- Lodemel J., Mayhew T., Myklebust R., Olsen R., Espelid S. and Ringo E., 2001. Effect of three dietary oils on disease susceptibility in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) during cohabitant challenge with *Aeromonas salmonicida* ssp. *Salmonicida*. *Aquac Res* 32(12), 935-945.
- Lovell, R. T., (1989). The nutrients. In: *Nutrition and feeding of fish*. New York, AVI – VNR. v. 2, pp. 11- 71.
- Mai, K., Xiao, L., Ai, Q., Wang, X., Xu, W., Zhang, W., Liufu, Z. and Ren, M., 2009. Dietary choline requirement for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. *Aquaculture* 289, 124–128
- Martin, A., Janigian, D., Shukitt-Hale, B., Prior, R. and Joseph, J., 1999. Effect of vitamin E intake on levels of vitamins E and C in the central nervous system and peripheral tissues: implications for health recommendations. *Brain Research* 845, 50–59.
- Merchie, G., Laves, P., Dhert, Ph., Dehasque, M., Nelis, H., De Leenheer, A. and Sorgelos, P., 1995. Variation of ascorbic acid content in different live food organisms. *Aquaculture* 134 (3-4) 325-337.
- Milby H. K., Mefford I. N., Chey W. and Adams R. N., (1981). In vitro and in vivo depolarization coupled efflux of ascorbic acid in rat brain preparations. *Brain Research Bulletin* 7, 237-242.
- 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.

- Mnary, A., Bouhlel, I., Chraief, I., Hammami, M., Romdhane, M., El Cafsi, M. y Chaouch, A., 2007. Fatty acids in muscles and liver of Tunisian wild and farmed gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Food Chemistry* 100, 1393–1397.
- Mohamed, J., Sivaram, V., Roy, T., Mariam, M., Murugadass, S. and Hussain, M., 2003. Dietary vitamin A requirement of juvenile greasy grouper (*Epinephelus tauvina*). *Aquaculture* 219, 693–701.
- 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.
- Murray, R., Granner, D. and Rodwell, M., 1993. Bioquímica de Harper, Ed. Manual moderno, pp. 697-698.
- Muse, J., Clay, H., Lewis, J., Ghorri, N., Herbornel, F. and Ramakrishnan, L., 2002. Real-Time Visualization of *Mycobacterium*-Macrophage Interactions Leading to Initiation of Granuloma Formation in Zebrafish Embryos, *Immunity* 17, 693–702.
- Nero, V. G., 2005. La resorción como proceso inflamatorio. Aproximación a la patogenia de las resorciones dentaria y periodontal. *RCOE* 10 (5-6), 545-556.
- NRC (National Research Council), 1983. Nutrient requirement of warmwater fishes and Shell fishes, reviewed edition. National Academic Press, 115 pp.
- O'keefe, T. and Grant, B., 1991. Stable forms of vitamin C: essentiality, trazability and bioavailability. *Asa Technical Bulletin*, American Soybean Association, Vol. AQ 29-1991.

- Ortuño, J., Cuesta, A., Esteban, M. and Meseguer, J., 2001. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata L.*) innate immune system, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 79, 167-180.
- Padh, H., (1991). Vitamin C: newer insights into its biochemical functions. *Nutr. Rev.* 49, 65-70.
- Panush, M.E. and Delafuente, J.C., 1985. Vitamins and immunocompetence. *World Rev. Nutr. Diet* 45, 97–123.
- Paul, N. B., Sarkar, S., and Mohanty, N. S., 2004. Dietary vitamin E requirement of mrigal, *Cirrhinus mrigala* fry. *Aquaculture* 242 529–536.
- Phromkunthong, W., Boonyarapalin, M. and Storch, V., 1997. Different concentrations of ascorbyl-2-monophosphate-magnesium as dietary sources of vitamin C for seabass, *Lates calcarifer*. *Aquaculture* 151, 225-243.
- Prouty, M., Correa, N., Baker, L., Jagadeeswaran, P. and Klose, K., 2003. Zebrafish-*Mycobacterium marinum* model for mycobacterial pathogenesis. *FEMS Microbiology Letters* 225, 177-182.
- Ríos, D., Hernández, T., Martínéz, P. and Ross, L., 2006. The effect of transportation stress on tissue ascorbic acid levels of Mexican silverside (*Chirostoma estor estor* Jordan, 1979). *BIOCELL* 30(1): 149-155.
- Robbins, K., Saxton, A. and Southern, L., 2006. Estimation of nutrient requirements using broken-line regression analysis. *Journal of Animal Science* 84, E155.
- 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 Cóbanos y Puerto La Libertad, El Salvador. *Revista Biología Tropical* 52 (1), 163-170.
- Rothe de Arocha, 2003. Nuevas opciones en el tratamiento del melasma. *Dermatología Venezolana* 41 (3), 11-14.
- Ruff, N., Fitzgerald, R., Cross, T., Hamre, K. and Kerry, J., 2003. The effect of dietary vitamin E and C level on market-size turbot (*Scophthalmus maximus*) fillet quality. *Aquaculture Nutrition* 9, 91-103.
- Santamaría, M. A., Saucedo, L. M., Herrera, M. M. and Apún, J. P., 2005. Hábitos alimenticios del pargo amarillo *Lutjanus argentiventris* y del pargo rojo *Lutjanus colorado* (Pisces: Lutjanidae) en el norte de Sinaloa, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 40(1), 33–44.
- Shearer, K., 2000. Experimental design, statistical analysis and modelling of dietary nutrient requirement studies for fish: a critical review, *Aquaculture Nutrition* 6, 91-102.
- Snieszko, S.F., 1978. Mycobacteriosis (Tuberculosis) of fishes. US Fish and Wildlife Fish Disease Leaflet 55, 1–9.
- Sobhana, K., Mohan, C. and Shankar, K., 2002. Effect of dietary vitamin C on the disease susceptibility and inflammatory response of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) to experimental infection of *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* 207, 225–238
- Soliman, A., Jaucey, K. and Roberts, R. 1987. Stability of L-Ascorbic Acid (Vitamin C) and its Forms in Fish Feeds During Processing, Storage and Leaching. *Aquaculture* 60, 73-83.



- Stone, E., 1991. Vitamin C and tuberculosis; a neglected chapter in anti bacterial research Special Issue, Tuberculosis, Nutrition Health review. Find Articles.com, 22 Aug, 2009.
- Sulkin D. F. and Sulkin N. M., 1967. An electron microscopical study of autonomic ganglion cells of guinea pigs during ascorbic acid deficiency and partial inanition. Laboratory investigation 16, 142-152.
- Tacon, A., 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados. Manual de Capacitación. Proyecto Aquila II. Documento de Campo 4, FAO.
- Velázquez, P. M., Prieto, G. B. y Contreras, P. R., 2004. El envejecimiento y los radicales libres. Ciencias 75, 36-43.
- Verlhac, V., Gabaudan, J., Obach, A., Schuëp, W. and Hole, R., 1996. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 143, 123–133.
- Wahli, T., Verlhac, V., Girling, P., Gabaudan, J. and Aebischer, C., 2003. Influence of dietary vitamin C on the wound healing process in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 225, 371-386.
- Wang, X., Kim, K., C. Bai, S., Huh, M. and Cho B. Y., 2003. 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.
- Wang, X., Kim, K. and Sungchul, C., 2003. Comparison of L-ascorbyl-2-monophosphate-Ca with L-ascorbyl-2-monophosphate-Na/Ca on growth and tissue ascorbic acid concentrations in Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*). Aquaculture 225, 387-395.

- Wilson, R. P., 1973. Absence of ascorbic acid synthesis in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, and blue catfish, *Ictalurus frucatus*. *Comp. Biochemistry and Physiology B* 46, 635-638.
- Yamamoto, Y., Sato, M. and Ikeda, S., 1978. Existence of L-gluconato oxidase in some teleost. *Bull. Soc. Sci. Fish* 44 , 775-779.
- Yi, W., Wu, X., Cao, R., Song, H. and Ma, L., 2009. Biological evaluations of novel vitamin C esters as mushroom tyrosinase inhibitors and antioxidants. *Food chemistry* doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.108.
- Zacarías, M., Cadena, M. y Rivas, P., 2009. Modificaciones Estructurales en el Estómago y el Hígado de *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindacher, 1868) ante Situaciones de Estrés Crónico. *International Journal of Morphology* 27 (2), 425-433.
- Zar, J.H., 1984. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, New York, 622 pp.
- Zeitoun, I.H., Ulrey, D.F., Maguee, W.T. Gill and Bergen W.G. 1976. Quantifying nutrient requirement of fish. *J. Fish. Res. B. Can.* 33: 167-172.
- Zhou, Z., Cui, Y., Xie, S., Zhu, X., Lei, W., Xue, M. and Y. Yang, 2003. Effect of feeding frequency on growth, feed utilization, and size variation of juvenile gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Journal of Applied Ichthyology* 19 (4),244–249