



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

***Facultad de Estudios
Superiores Iztacala***

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

**Evaluación de las respuestas fisiológicas y
morfológicas de crías del pez espada *Xiphophorus
helleri* Heckel, 1848 (Pisces: Poeciliidae),
alimentados con diferentes concentraciones de
vitamina A.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

José Ariel Olvera Ramos

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Luis Hector Hernández Hernández

MÉXICO, D.F.

MARZO, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

***Facultad de Estudios Superiores
Iztacala***

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

**Evaluación de las respuestas fisiológicas y
morfológicas de crías del pez espada *Xiphophorus
helleri* Heckel, 1848 (Pisces: Poeciliidae),
alimentados con diferentes concentraciones de
vitamina A.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

José Ariel Olvera Ramos

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Luis Hector Hernández Hernández

MÉXICO, D.F.

MARZO, 2011



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de octubre del 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **OLVERA RAMOS JOSÉ ARIEL** con número de cuenta 96039780 con la tesis titulada "Evaluación de las respuestas fisiológicas y morfológicas de crías del pez espada *Xiphophorus helleri* Heckel, 1848 (Pisces: Poeciliidae), alimentados con diferentes concentraciones de vitamina A", realizada bajo la dirección del (la) **DR. LUIS HÉCTOR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ:**

Presidente: DR. ISAÍAS HAZARMABETH SALGADO UGARTE
Vocal: DR. CARLOS ROSAS VÁZQUEZ
Secretario: DR. LUIS HÉCTOR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ
Suplente: DR. LUIS ZAMBRANO GONZÁLEZ
Suplente: M. EN C. MARIO FERNÁNDEZ ARAIZA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 2 de marzo de 2011.

M. del Coro Arizmendi
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Tesis de Maestría
Biólogo José Ariel Olvera Ramos.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

JOSÉ ARIEL OLVERA RAMOS
No de Cuenta. 09603978-0
Presente.

Por medio de la presente me permito informar a usted que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas en la sesión ordinaria **26 de octubre del 2009**, aprobó el Jurado para la presentación de su examen y así obtener el grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**, del Posgrado en Ciencias Biológicas con el título de tesis "Evaluación de las respuestas fisiológicas y morfológicas de crías del pez espada *Xiphophorus helleri* Heckel, 1884 (Pisces: Poecillidae) alimentados con diferentes concentraciones de vitamina A" el jurado quedó integrado de la siguiente manera:

Presidente:	DR. ISAÍAS HAZARMABETH SALGADO UGARTE
Secretario:	DR. LUIS HECTOR HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ
Vocal:	DR. CARLOS ROSAS VAZQUEZ
Suplente:	DR. LUIS ZAMBRANO GONZÁLEZ
Suplente:	M. en C. MARIO FERNÁNDEZ ARAIZA

Asimismo, informo a usted y a los honorables miembros del jurado, que el Comité Académico aprobó un plazo de hasta 30 días naturales para recibir la revisión del manuscrito de tesis y, en su caso, el voto respectivo.

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Los Reyes Iztacala, a 29 de octubre de 2009.

DR. SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA
Responsable de la Entidad

C.c.p.: Miembros del Jurado
C.c.p. Expediente del interesado

Agradecimientos

Deseo dar gracias a las siguientes instituciones y personas:

- Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM, por la oportunidad que presentó en mi vida académica.
- Al CONACYT, por el apoyo económico recibido que me sirvió para impulsar mi posgrado (CVU 226485).
- A los miembros de mi comité tutorial y jurado:
 - Dr. Isaías Hazarmabeth Salgado Ugarte Presidente
 - Dr. Luis Hector Hernández Hernández Secretario
 - Dr. Carlos Rosas Vazquez Vocal
 - Dr. Luis Zambrano González Suplente
 - M. en C. Mario Fernández Araiza Suplente

Sin cuya presencia hubiera sido imposible la elaboración y conclusión de la actual tesis de Maestría.

Tesis de Maestría
Biólogo José Ariel Olvera Ramos.

Agradecimientos personales.

Igualmente agradezco a mis Profesores, Familia y Amigos, que me acompañaron, apoyaron y guiaron durante el camino. ¡Gracias!

Índice

I. Título	6
Resumen (español)	6
Resumen (inglés)	7
II. Introducción y planteamiento del problema	9
III. Antecedentes	13
IV. Hipótesis	14
V. Objetivos	15
VI. Materiales y métodos	15
VI. 1. Diseño experimental	15
VI. 2. Elaboración de microcápsulas y enriquecimiento	16
VI. 3. Pruebas de alimentación	17
VI. 4. Consumo de oxígeno y excreción de nitrógeno	18
VI. 5. Análisis del esqueleto	19
VI. 6. Contenido de lípidos y proteína	19
VI. 7. Análisis estadístico	20
VII. Resultados	20
VII. 1. Crecimiento	20
VII. 2. Porcentaje de supervivencia	25
VII. 3. Condiciones óseas anómalas	24
VII. 4. Consumo de oxígeno	28
VII. 5. Excreción de amonio	28
VII. 6. Contenido de lípidos	29
VII. 7. Contenido de proteínas	31
VIII. Discusión	32

Tesis de Maestría
Biólogo José Ariel Olvera Ramos.

IX. Conclusiones	34
X. Recomendaciones	35
XI. Referencias bibliográficas	35
Anexos	43

I. Título

Evaluación de las respuestas fisiológicas y morfológicas de crías del pez espada *Xiphophorus helleri* Heckel, 1848 (Pisces: Poeciliidae), alimentados con diferentes concentraciones de vitamina A.

Resumen

El término vitamina A (vitA) define a los compuestos con la actividad biológica cualitativa del retinol. Este compuesto es muy importante en diversos procesos fisiológicos de los vertebrados, como la diferenciación y el mantenimiento de los epitelios, el crecimiento, embriogénesis y la visión. Aun cuando la vitA es un ingrediente muy importante en la dieta, existe poca información referente a los requerimientos cualitativos en especies acuáticas de importancia comercial y prácticamente nula para especies que se comercializan para ornato. Por ello, en el presente trabajo se planteo determinar los efectos de la vitA en el crecimiento y algunas respuestas fisiológicas en crías de *Xiphophorus helleri*, una de las especies comerciales de ornato más importantes en el país. Se realizaron dos pruebas de alimentación en las cuales, crías de *X. helleri* se alimentaron con pulga de agua (*Moina macrocopa*), enriquecida con retinil palmitato a concentraciones de 67,000; 133,000; 267,000 y 533,000 UI de vitA/L de medio de enriquecimiento (UI/L) para la primera y 33,000; 67,000; 100,000 y 133,000 UI/L en la segunda prueba. Al finalizar las pruebas de alimentación, se determino el crecimiento, excreción de amonio, consumo de oxígeno, contenido de lípidos y proteínas y se realizaron observaciones de la columna vertebral. Los resultados indican que la concentración óptima de vitA para las crías de *X. helleri* se sitúa entre las 67,000 y las 133,000 UI/L medio. El peso final, la ganancia en

peso, la tasa específica de crecimiento y las medidas morfométricas se incrementaron conforme al aumento entre los niveles antes mencionados de vitA. También se observó una distribución diferencial de lípidos, que aumentaban tanto en vísceras como en músculos con el incremento de vitA, pero siendo ligeramente mayor en las primeras. Bajo estas condiciones, hay un mejor aprovechamiento de la dieta debido al crecimiento y una menor producción de amonio.

Abstract

Vitamin A (vitA) is the generic descriptor for compounds with retinol-like activity. It plays an important role in several physiological processes in animals including differentiation and maintenance of epithelial cells, growth and vision. That includes fish species, and for many of them has been established the optimal amount in feeding; however, for commercial importance species there is little bit information and even less for the ornamental ones. Thus, fry of the livebearer *Xiphophorus helleri* have been chosen to determine the effects of dietary vitA on the growth and some physiological responses to get establishment of optimal amount in diet, one of the most important ornamental species in our country. There were two feeding trials using the water flea *Moina macrocopa* as meal, enriched with retinyl plamate at concentrations of 67,000; 133,000; 267,000 and 533,000 UI vitA/L of enrichment media (UI/L media) for first trial and 33,000; 67,000; 100,000 and 133,000 UI/L media for the second trial. The present data indicates that optimal concentration for *X. helleri* is between 67,000-133,000 UI/L media. Final weight, weight gain, specific growth rate, and morphometric measures increased with the increment of vitA between the aforementioned levels of vitA. There was too a differential distribution of

Tesis de Maestría

Biólogo José Ariel Olvera Ramos.

lipids, which increases with higher vitA concentrations to both viscera and muscles, being slightly greater at first one. The data indicates that mechanism have evolved as a system for oocytes with a bigger amount of vitellus, and thus obtaining better frys. Under these conditions, there is a better diet use due to growing and a lesser ammonia production.

II. Introducción y planteamiento del problema

El término vitamina A (vitA) define a los compuestos con actividad biológica cualitativa del retinol, molécula monocíclica que contiene una doble ligadura entre los carbonos 5-6, junto a un grupo funcional en el término de su porción acíclica. La porción cíclica es un núcleo de β -ionona sustituido [4-(2, 6, 6-trimetil 1-2-ciclohexeno-1-y1)-3-buten-2-ona], y la cadena lateral (la porción acíclica) está compuesta de dos unidades isoprenoides (relacionadas con el isopreno, el 2-metil-1,3 butadieno) unidas por cabeza y cola al carbono 6 del núcleo de β -ionona. Las formas con actividad biológica de la vitA existen de manera natural bajo tres formas:

- 1) Retinol (un alcohol cristalino ligeramente amarillo)
- 2) Retinal o retinaldehído (vitA bajo la forma de un aldehído)
- 3) Retinil éster (la vitamina bajo su forma esterificada) (Combs, 1998).

La forma oxidada del retinol, el ácido retinoico, es un importante retinoide y que está involucrado en el control de la diferenciación celular. Sin embargo, al no poder convertirse en retinol metabólicamente, no se considera vitA.

La vitA es esencial para los vertebrados, pues juega un papel importante en varios procesos fisiológicos: la función visual, hasta ahora el proceso mejor conocido y que realiza el retinal. Así mismo, el desarrollo, mantenimiento de los epitelios y el crecimiento, realizado por el ácido retinoico al mediar en la expresión genética de las células. El retinol parece que tiene un papel en la reproducción (Baud *et al.*, 1999; Kruk *et al.*, 2008).

La deficiencia de vitA en la dieta provoca retraso en el crecimiento, debilidad visual y ceguera nocturna al reducir la regeneración del pigmento visual rodopsina, pérdida de la integridad del epitelio, poca resistencia a las infecciones, alteración de la morfología del hígado, muerte embrionaria temprana y mortalidad en organismos ya desarrollados, hipogonadismo como consecuencia de atrofia testicular y una disminución en la

espermatogénesis, anemia, anorexia, y malformaciones que incluye defectos oculares, cardiovasculares, renales, del paladar y labio hendido, etc.

El exceso de vitA se acumula en los riñones, hígado y ovarios, incrementándose conforme a la concentración provocando intoxicación y hasta la muerte. También induce anormalidades en el desarrollo tales como hemorragias, coloraciones anormales en la piel y deformidades óseas (Shim *et al.*, 1989; Combs, 1998; Baud *et al.*, 1999; Alzota, 2001; Hornby *et al.*, 2003; Kruk *et al.*, 2008).

Los problemas asociados a la deficiencia o exceso de vitA son una cuestión fundamental en la producción de peces, porque están asociadas con una disminución del crecimiento, altas tasas de mortalidad, susceptibilidad al estrés y enfermedades. Además, afectan la calidad y el valor comercial de los peces (Moretti *et al.*, 1999; Cahu *et al.*, 2003). Aunque las concentraciones elevadas de vitA en la alimentación proveen de cierta protección contra las enfermedades y favorece la regeneración de los tejidos dañados por alguna herida o bajas temperaturas (Lall, 2000), también se ha mostrado que los niveles elevados en la dieta resultan en una alta incidencia de deformaciones óseas de la columna vertebral, de los radios de las aletas y de la mandíbula, que se presentan principalmente en las crías (Cahu *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2004, 2006).

Una de las especies de las que no se tienen reportes sobre su requerimiento óptimo de vitA es el pez cola de espada *Xiphophorus helleri*. Esta especie se caracteriza por que los machos poseen una prolongación de los radios caudales inferiores terminada en punta, a manera de “espada” de coloración vistosa. *Xiphophorus helleri* Heckel (1848) se distribuye de manera natural en las desembocaduras hacia el Atlántico del río Nautla, en Veracruz, y hacia el sur hasta los ríos Usumacinta en Guatemala y Sarstún en Belice, llegando al norte de Honduras, yendo desde el nivel del mar hasta los 1450 msnm en Campeche, Chiapas, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco y Veracruz. Habita diversos cuerpos de agua, incluyendo charcas, arroyo, lagunas abiertas y ríos con gran diversidad de sustratos, y con aguas que van desde

cristalinas a muy contaminadas, ya sea que no presenten vegetación o que esta sea moderadamente abundante; a profundidades de 1.5 m. Rosen (1960) reconoció cuatro subespecies: *X. h. helleri* Heckel, *X. h. strigatus* Regan, *X. h. guentheri* Jordan y Evermann y *X. h. alvarezi*. A la especie se le conoce coloquialmente por el nombre de pez cola de espada verde, aunque hay variedades de color rojizo (fig. 1) (Marty y Couto, 1976; Rosen y Bailey, 1963).



Figura 1. *Xiphophorus helleri*, variedad roja.

Al igual que todo el grupo de los Poeciliidae, muestran grandes modificaciones dimórficas sexuales tales como el tamaño, la aleta anal y la suspensión de esta, las aletas pectorales y pélvicas e incluso la aleta dorsal y la caudal, partes de la boca y la parte dorsal del cráneo, las costillas pleurales y el patrón de coloración. La aleta caudal está modificada a manera de un gonopodio con suspensorio formado por su base. Este gonopodio es utilizado por el pez como órgano intromitente para introducir el esperma en la hembra, siendo interna la

fertilización. La hembra incluso da un aporte de nutrientes a los embriones, ya que el vitelo es insuficiente para su mantenimiento (Rosen y Bailey, 1963).

La mayor parte de la información acerca de los requerimientos nutricionales cuantitativos y cualitativos de los peces ornamentales se deriva principalmente de la investigación llevada a cabo por la industria de la acuicultura desde 1970. Sin embargo, tales resultados tienen aplicaciones limitadas porque se ha trabajado aún con muy pocas especies de estos vertebrados acuáticos, o los trabajos de esta categoría se aplican principalmente a especies destinadas a la alimentación y que por tanto se crían bajo condiciones diferentes a las de aquellas dedicadas al ornato, lo que lleva a la administración de dietas inadecuadas (Sales, 2003). Por demás, el uso de alimentos balanceados y distinción de los requerimientos nutricionales de crías y adultos machos y hembras en diferentes estadios de vida ha sido el factor que contribuyó a la expansión del hobby en el último medio siglo (Ezhil *et al.*, 2008).

Existen reportes acerca de la influencia de la nutrición sobre la reproducción y crecimiento de peces ornamentales, pero no se han realizado trabajos sobre especies de peces de ornato mexicanos, y solo existe un reporte del uso de vitA en poecilidos (*Poecilia reticulata*), lo que deja un amplio campo de investigación y aplicación para estas especies de importancia económica.

Se ha escogido a la especie *X. helleri* porque es una de las especies de ornato más populares, y por tanto de importancia comercial, para establecer las concentraciones óptimas de vitA a suministrar en la dieta de las crías; tales puntos óptimos estuvieron determinados principalmente por los mayores aumentos en talla de los organismos (Raja, 2004) (Martty y Couto, 1976). Derivado de esta búsqueda, se buscaron conocer los efectos que provoca su déficit o su exceso (efecto tóxico-hipervitamínico junto a los defectos del esqueleto que, dicho sea oportunamente, no fueron especialmente notables) debido a la importancia que tiene este nutriente en el desarrollo de los peces durante sus primeras fases

de desarrollo (Lall, 2000; Haga, 2006). A esto se suma el promover el conocimiento de una especie endémica, cuya conservación es importante.

También destaca el uso de un pez con modo de reproducción vivíparo, cuyos reportes no son especialmente abundantes (además de *Poecilia reticulata*) y cuyo desarrollo podría o no ser distinto en presencia de alimento suplementado con esta vitamina, otorgando las características de un estudio neto exploratorio. Igualmente importante es el haber utilizado otros parámetros no considerados en trabajos anteriores con alimentos vitaminados: el consumo de oxígeno y la producción de amonio.

Por tanto la actual tesis se puede considerar como una importante contribución al conocimiento sobre el desarrollo de peces vivíparos mexicanos, su osteología y parámetros fisiológicos nunca antes medidos o comprobados como efecto de la vitA.

III. Antecedentes

- Para adultos de trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, el óptimo de vitA para su mantenimiento se encuentra entre las 2,500 – 3,500 UI/Kg de alimento balanceado (Kitamura *et al.*, 1967).

- El guppy *Poecilia reticulata* tiene su óptimo en juveniles entre 2,000 – 4,000 UI/Kg, concentración a la que se da el mayor crecimiento (Shim *et al.*, 1990).

- En adultos del jurel de cola amarilla *Seriola quinqueradiata*, el óptimo está entre 10,500 – 12,500 UI/Kg (Shimeno, 1991).

- En juveniles de tilapia *Oreochromis niloticus*, el mayor crecimiento se da entre 5,000 – 10,000 UI/Kg (Saleh *et al.*, 1995).

- Para larvas del lenguado *Paralichthys olivaceus*, con *Artemia* con medio enriquecido, se recomiendan una concentración menor de 20 mg vitA/ 10 L de medio (Dedi *et al.*, 1995).

- Para adultos de bagre de canal *Ictalurus punctatus*, se reporta un óptimo de 1,000 – 2,000 UI vitA/Kg de alimento balanceado en adultos para fines de consumo (Sealey, 1997).

- En juveniles de mero lutria *Ephinephelus tauvina*, la concentración óptima de vitamina es de 3101 UI/Kg (Mohamed *et al.*, 2003).

- En juveniles del lenguado *Paralichthys olivaceus*, el óptimo es de 9,000 UI/Kg. También se observaron diferencias en cuanto a los lípidos totales, reduciéndose conforme a la concentración de vitamina (Hernández, 2005).

- Para carpa común en desarrollo *Cyprinus carpio*, se encuentra entre 4,000 – 20,000 UI/Kg para la alimentación de animales de consumo (Hernández *et al.*, 2005), pero también se reportan entre 2,500-5,000 UI/ Kg de dieta (Kitamura *et al.*, 1967).

- Para las crías de pargo rojo *Chrysophrys major* alimentadas con retinol palmitato, sus requerimientos se estimaron entre 5,000 y 20,000 UI/Kg de dieta) (Hernández, 2006).

- También en juveniles de lenguado japonés *Paralichthys olivaceus* usando palmitato de vitA administrada en nauplio de *Artemia*, el óptimo en la dieta está por debajo de las 5,000 UI de palmitato de vitA/L (Tarui *et al.*, 2006).

IV. Hipótesis

La Vit A es un nutriente indispensable en la dieta de los organismos y en etapas tempranas se requiere suministrar en concentraciones que no afecten el desarrollo y el crecimiento, por lo que al aplicar diferentes cantidades de la vitamina en la dieta el efecto que tengan sobre la respuesta fisiológica y morfológica de crías de *X. helleri* será distinta en cada caso.

V. Objetivos

General:

Evaluar las respuestas fisiológicas y morfológicas de crías del pez cola de espada *Xiphophorus helleri* alimentados con diferentes concentraciones de vitA.

Particulares:

- Cuantificar el efecto de diferentes concentraciones de vit A sobre la supervivencia de *X. helleri* administrada con microcápsulas usando como vehículo la pulga de agua *Moina macrocopa*.

- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de vit A sobre las respuestas fisiológicas (tasa de crecimiento, acción dinámica específica, excreción nitrogenada) de *X. helleri* suministradas mediante microcápsulas usando como vehículo *M. macrocopa*.

- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de vit A sobre las características morfológicas de *X. helleri* suministradas mediante microcápsulas usando como vehículo *M. macrocopa*.

VI. Materiales y métodos

VI. 1. Diseño experimental

El presente estudio realizó en el Laboratorio de Producción Acuícola (Acuario) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Se realizaron dos pruebas de alimentación, en la primera prueba se determinaron los rangos aproximados de la cantidad adecuada de vitamina en la dieta, y durante la segunda se determinó la concentración óptima. Este método está basado en el descrito por Hernández (2005) para encontrar la concentración adecuada de vitamina A en crías de lenguado *Paralichthys olivaceus* realizando una serie de aproximaciones para especies cuyo requerimiento se desconoce.

Para el enriquecimiento y descripción de la vitamina añadida, se siguió el método descrito por Dedi *et al.* (1995) para el lenguado *Paralichthys olivaceus*.

VI. 2. Elaboración de microcápsulas y enriquecimiento:

Las microcápsulas se prepararon de acuerdo a Esparza (2006), utilizando 2 ml de una solución de goma arábiga al 5% y grenetina al 5%. La vitA se disolvió en 2 ml de ácido oleico y se agregó a la solución de grenetina-goma arábiga, así como 40 ml de agua destilada a 50 °C. Se mezclaron inicialmente en licuadora durante 5 minutos al tiempo que se agregaron otros 60 ml de agua destilada a 50° C. Esta solución se aforó a 150 ml con agua a 0° C para que la gelación permitiera la formación de las microcápsulas. Estas se mantuvieron en refrigeración a 0° C hasta su uso. Las concentraciones de vitA en forma de retinil palmitato (Sigma-Aldrich Co.) se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones de vitA para las pruebas de alimentación.

Solución total (UI/L solución) - Etapa de detección de rangos	Solución total (UI/L solución)– Concentración óptima
Control	Control
67,000	33,000
133,000	67,000
267,000	100,000
533,000	133,000

Para alimentar a las larvas y administrar la vitamina, se utilizó la pulga de agua *Moina macrocopa* enriquecida, que se cultivo con la microalga *Chlorella vulgaris*. El enriquecimiento de las pulgas se realizó en matraces Erlenmeyer de 150 ml con una concentración de 80 organismos/ml, agregando 5 ml de la microcápsulas por recipiente y permitiendo un tiempo de captación de 15 minutos a temperatura ambiente y aireación continua (Esparza, 2006; Hernández *et al.*, 2006).

VI. 3. Pruebas de alimentación

Las dos pruebas de alimentación se desarrollaron bajo las condiciones descritas en la tabla 2. Al final de cada una de ellas, se evaluaron las siguientes variables de respuesta: crecimiento, supervivencia, incidencia de deformidades óseas, excreción nitrogenada y tasa respiratoria (Fierro, 1990).

Para evaluar el crecimiento, se realizaron mediciones de peso y longitud con periodicidad de 10 días. Para el peso se usó una balanza analítica marca Ohaus Explorer pro modelo EP213C con un rango de precisión de ± 0.001 G, y para la longitud un ictiómetro graduado con un rango de precisión de ± 0.01 cm. Se obtuvo el promedio de peso por cada acuario (suma/número de organismos). Con estos datos se determinó el peso promedio final (PF) expresado en gramos; la ganancia en peso, $GP = [(peso\ final\ PF - peso\ inicial\ PI)/PI] * 100$; y la tasa específica de crecimiento, $TEC = [(\ln\ PF - \ln\ PI)/ND] * 100$, donde ND= número de días de duración de la prueba de alimentación para cada tratamiento. También se tomaron las medidas morfométricas de acuerdo a la figura 2.

Tabla 2. Condiciones iniciales del experimento para la primera prueba de alimentación

Condiciones	Detección de rangos	Concentración óptima
Peso inicial	1.6 g	0.33 ± 0.05
Número de peces por acuario	10 (inicial)	10 (inicial)
Repeticiones	3	3
Período de alimentación	85 días	90 días
Tamaño de la ración	3,000 – 4,000 pulgas/acuario	3,000 – 4,000 pulgas/acuario
Frecuencia de alimentación	2 veces/día	2 veces/día
Tipo de alimento	<i>Moina macrocopa</i> + microencapsulados	<i>Moina macrocopa</i> + microencapsulados
Capacidad del acuario	15 litros	15 litros
Temperatura del agua	$25 \pm 2^{\circ}\text{C}$	$26 \pm 2^{\circ}\text{C}$
pH	8.4 ± 1	9.8 ± 0.2
Fotoperíodo	(10 luz – 14 oscuridad)	(10 - 14)

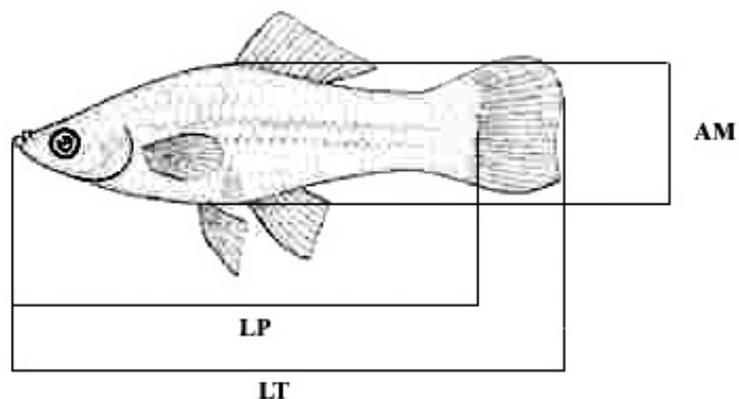


Figura 2. Medidas morfométricas consideradas en el actual estudio. LT: Longitud total, LP: longitud patrón, AM: altura máxima.

VI. 4. Consumo de oxígeno y excreción de nitrógeno

Las pruebas se realizaron mediante cámaras respirométricas, que consistieron de de frascos de 1 L, a manera de cámaras conectadas en serie (inicio). Se colocó un pez por cámara durante una hora (final), con un total de nueve organismos por tratamiento (fig. 3). El consumo se determinó por diferencia entre la concentración de oxígeno inicial y final, en condiciones de alimentación (media hora antes de introducir al pez a la cámara) y después de 48 horas de inanición (Cho *et al*, 1982). La concentración se midió con un oxímetro digital (YSI 85, YSI Incorporated, Ohio, EUA).



Figura 3. Cámaras respirométricas utilizadas.

La excreción de nitrógeno se determinó mediante la técnica modificada de Nessler (Clescerl et al. 1995). La absorbancia de las muestras se midió a 425 nm en un espectrofotómetro Hach DR 2800.

VI. 5. Análisis del esqueleto

Se analizó el esqueleto de *Xiphophorus helleri* mediante la tinción diferencial con azul de alciano y rojo de alizarina “s” y los tejidos se transparentaron con trenes de glicerina (Hollister, 1929; Dingerkus y Uhler, 1977) para observar si los tratamientos aplicados tuvieron algún efecto morfológico en las distintas estructuras óseas.

Al final de la tinción, se realizó el conteo de las vértebras de cada región del cuerpo (fig. 4) así como un examen general de aletas, costillas y cráneo.

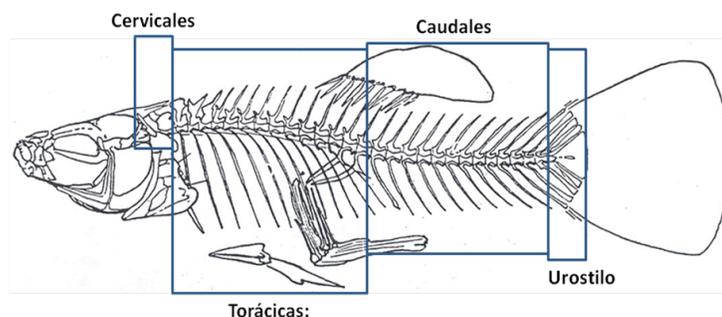


Figura 4. Esqueleto de *X. helleri*, mostrando la división de vértebras que se usó para el conteo.

VI. 6. Contenido de lípidos y proteína

Se determinó el contenido de lípidos en músculos y vísceras por separado con la técnica de Bligh y Dyer (1959) de extracción con cloroformo: metanol.

También se obtuvo el contenido de proteínas en base al peso seco del cuerpo completo del pez mediante el kit para proteínas totales de Micro-Lowry modificada por Peterson (Sigma-Aldrich Co.). Se midió la absorbancia de las muestras a 540 nm en un

espectrofotómetro Hach DR 2800. Los valores de las concentraciones se obtuvieron por extrapolación respecto a una curva de calibración.

VI. 7. Análisis estadístico

Los datos de crecimiento, supervivencia, consumo de oxígeno, producción de amonio y cantidad de lípidos y proteínas obtenidos se analizaron con un ANDEVA de una variable cuando mostraron distribución normal (gráficas box-plot o de bigotes y barras) y homogeneidad de varianza comprobada con el estadístico de Levene (significancia 0.5); las diferencias se evaluaron con la prueba post-hoc Least Significant Difference (LSD) con un error de significancia menor al 5% ($P < 0.05$). Cuando no mostraron distribución normal ni homogeneidad de varianza, se analizaron con la prueba Kruskal-Wallis y las diferencias se analizaron con la prueba post hoc de Bonferroni y Mann-Whitney. También se usó el coeficiente de correlación de Pearson para conocer si la relación entre el peso y la longitud corporal era isométrica o anisométrica. Se consideró la longitud patrón y no la total debido a las variaciones presentes por la maduración de los individuos hacia el final del experimento, como el alargamiento de la aleta caudal en los machos.

VII. Resultados.

VII. 1. Crecimiento

Para este apartado se consideraron los resultados significativos así como los asociados a este de la etapa de determinación de la concentración óptima.

Los valores más altos de PF (fig. 5), GP (fig. 6) y la TEC (fig. 7) se observaron en los peces alimentados con 133,000 UI /L medio. En la GP y la TEC los valores para este grupo fueron significativamente más altos que los observados para el grupo control.

Los valores para las medidas morfométricas mostraron una tendencia similar al crecimiento en peso, un incremento de los valores conforme aumento la concentración de vitA. Los valores significativamente más altos de longitud total (fig. 8) y patrón (fig. 9) se observaron en los peces alimentados con 133,000 UI/L medio con respecto al grupo control. Respecto a la altura del cuerpo (fig. 10), no se observaron diferencias significativas entre las medias.

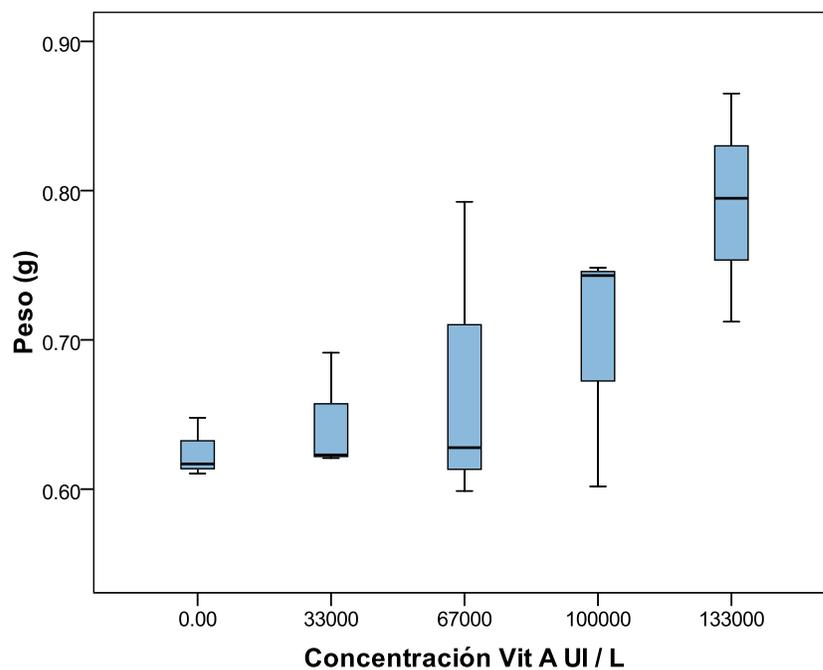


Figura 5. Gráfica de los valores medios de los PF de crías de *X. helleri* de la etapa de concentración óptima. Las barras representan el intervalo central de los pesos, y los bigotes el recorrido. Se observa variabilidad diferente entre los grupos y una asimetría predominantemente hacia valores grandes, lo que ocasiona un aumento en los valores medios. Los valores con la menor asimetría se encuentran en las 133,000 UI/L medio. No se observaron diferencias entre los tratamientos.

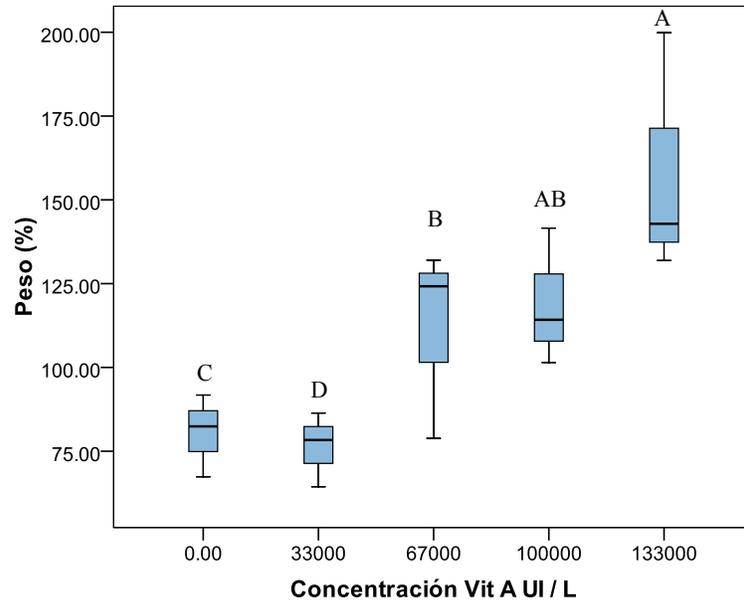


Figura 6. Gráfica de los valores medios de la GP de crías de *X. helleri*. Se obtuvieron diferencias entre los tratamientos. Las letras sobre las columnas indican medias estadísticamente distintas.

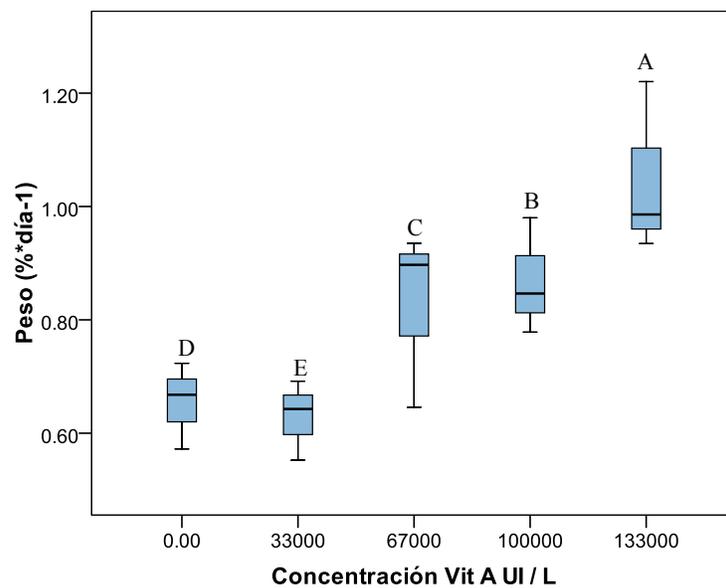


Figura 7. Gráfica de medianas de la TEC de crías de *X. helleri*. Se cumple el criterio de homogeneidad de varianza, y hay diferencia entre las medias de los tratamientos indicadas por las letras distintas sobre las columnas.

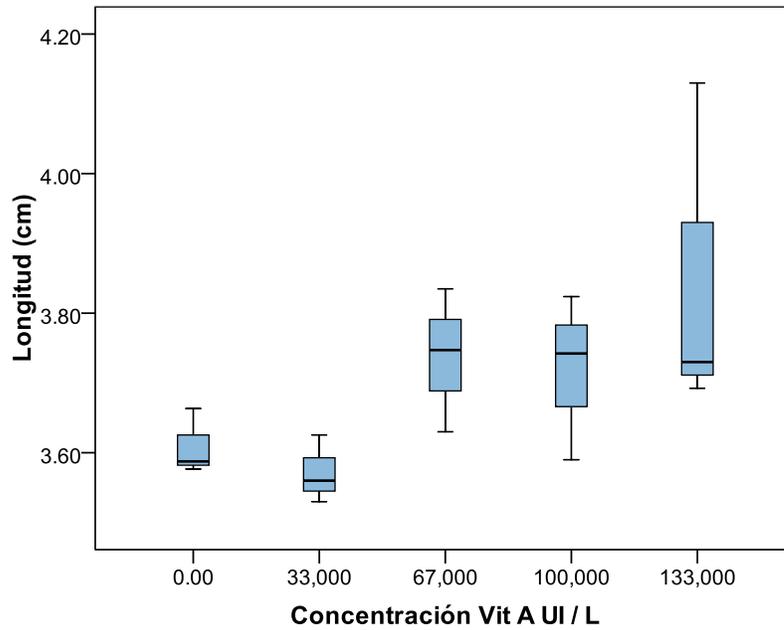


Figura 8. Gráfica de la longitud total para crías de *X. helleri*. No se cumple el criterio de homogeneidad de varianza. No se registraron diferencias entre los tratamientos.

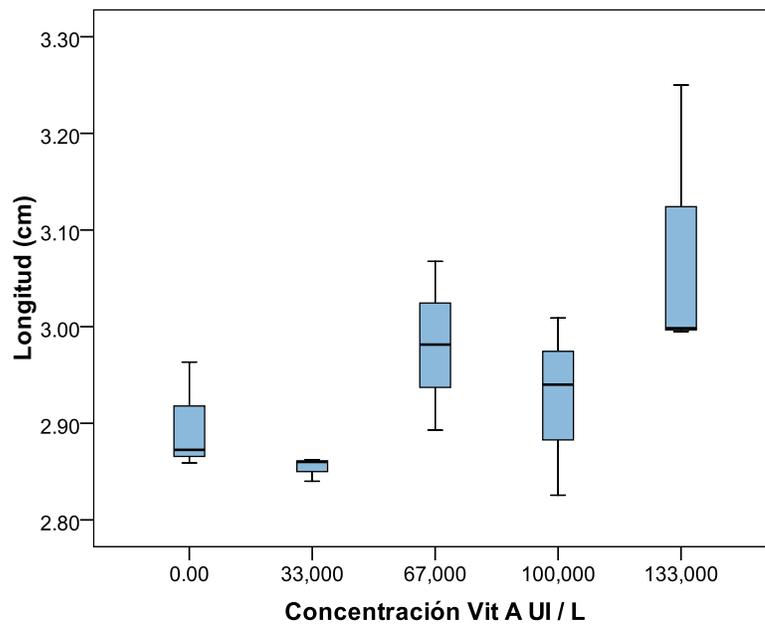


Figura 9. Gráfica de valores medios de la longitud patrón para crías de *X. helleri*. No hay homogeneidad de varianza. No hay diferencias entre los tratamientos.

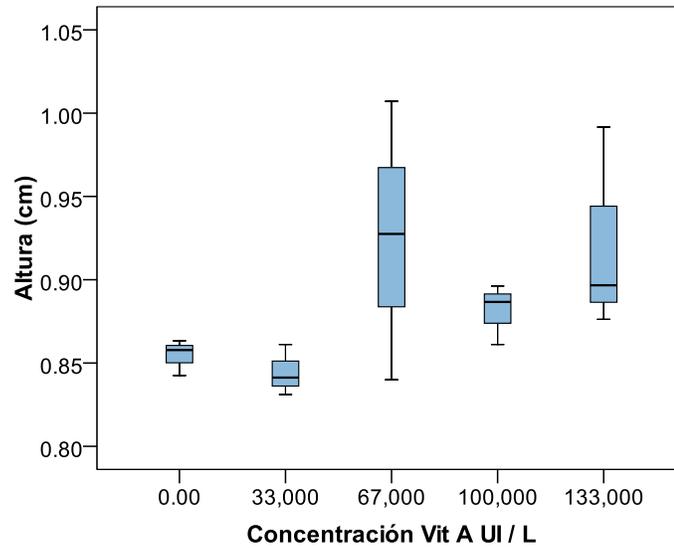


Figura 10. Gráfica de medianas de la altura máxima para crías de *X. helleri*. No hay homogeneidad en las varianzas ni diferencias significativas entre los tratamientos.

Los datos obtenidos a partir del análisis con el peso y la longitud patrón con el índice de Pearson, ambas magnitudes mostraron una fuerte correlación: $r = 0.0853$ a un nivel de significancia de 0.05 (fig. 11).

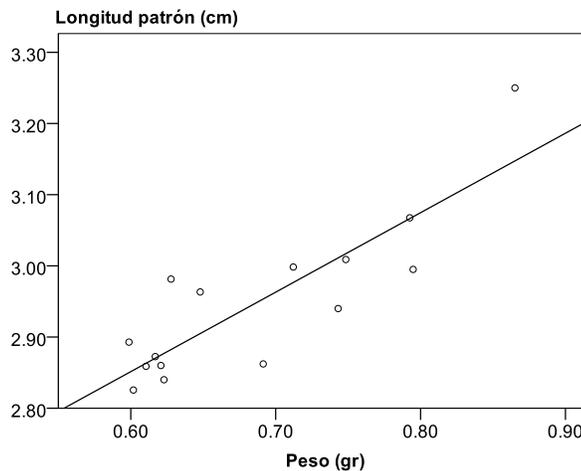


Figura 11. Correlación del PF vs. longitud patrón. Se realizó el análisis de correlación con el índice de Pearson, obteniéndose una $r = 0.0853$ y $m = 0.25912003$ con un nivel de significancia de 0.05.

La pendiente (m) muestra un crecimiento anisométrico por su alejamiento de la razón:

$$L \propto M^{1/3} (= 0.333)$$

El análisis de correlación demostró que el crecimiento en longitud es mayor que el crecimiento en peso, y este último no determina necesariamente el largo del cuerpo del pez.

VII. 2. Porcentaje de supervivencia

Los valores de supervivencia se muestran en la figura 12. Aunque el grupo de peces alimentados con la concentración más alta de vitA mostraron un porcentaje significativamente menor que el resto de los grupos, no se considera que la mortalidad observada está relacionada con la suplementación de vitA usadas en la dieta.

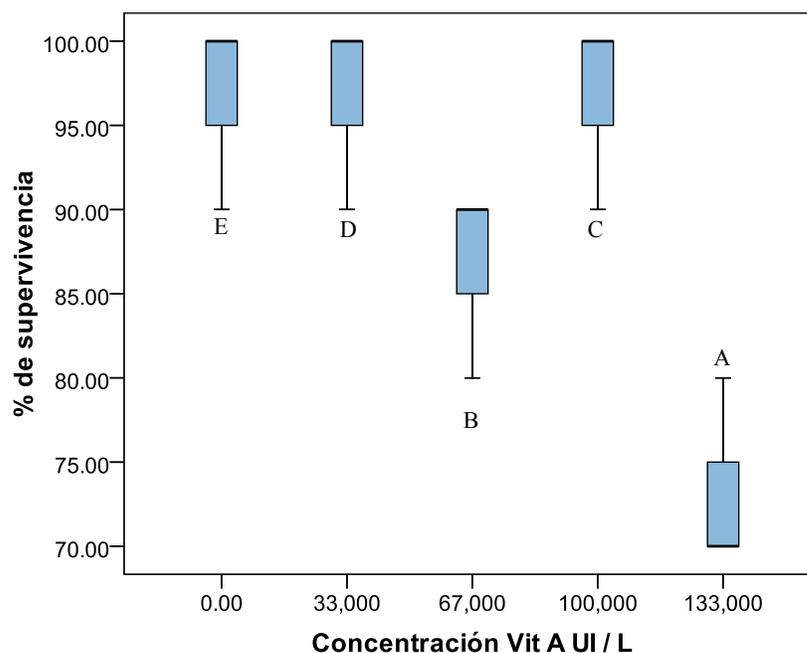


Figura 12. Gráfica de la supervivencia de crías de *X. helleri*. Existe homogeneidad de las varianzas, y las diferencias entre los tratamientos están indicadas con letras distintas para cada columna.

VII. 3. Condiciones óseas anómalas

No se observaron casos de escoliosis, lordosis, deformidades en el cráneo, ni de la región caudal.

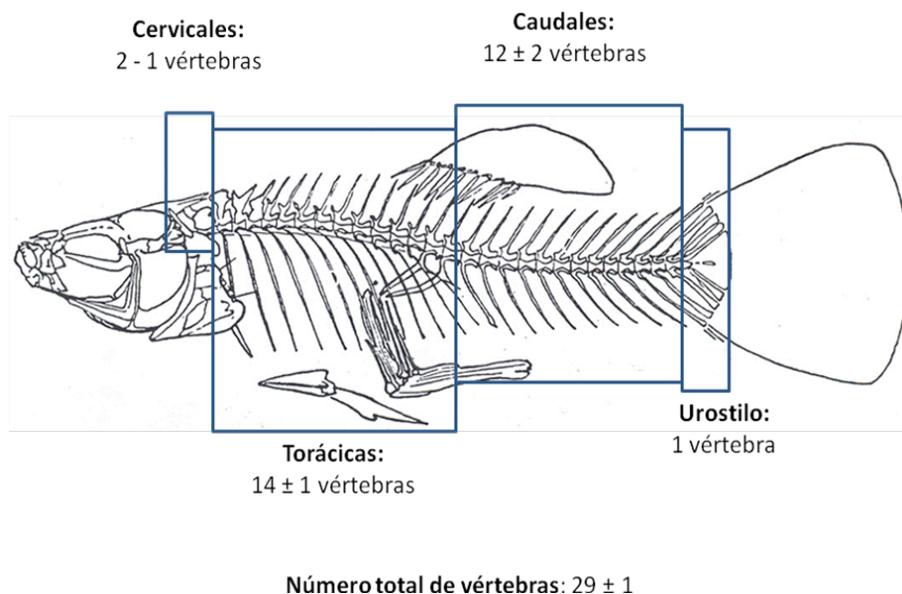


Figura 13. Esquema del conteo de vértebras.

Durante la prueba de alimentación, no se observaron indicios de deformidades reportados para otras especies, ni cambios notables en la apariencia física de los organismos.

Con respecto al número de vértebras, se observaron una o dos cervicales; las torácicas fueron de 13 a 15, las caudales de 10 a 14 y el urostilo siempre estaba presente como elemento único (fig. 13). Las variaciones observadas no pudieron ser atribuidas a efectos de la vitA.

Se observaron condiciones anormales en la zona caudal y en el urostilo (fig. 14). Sin embargo, debido a la frecuencia de aparición y que no se presentaron en una concentración de vitA particular, se considera que no se debieron a los tratamientos.

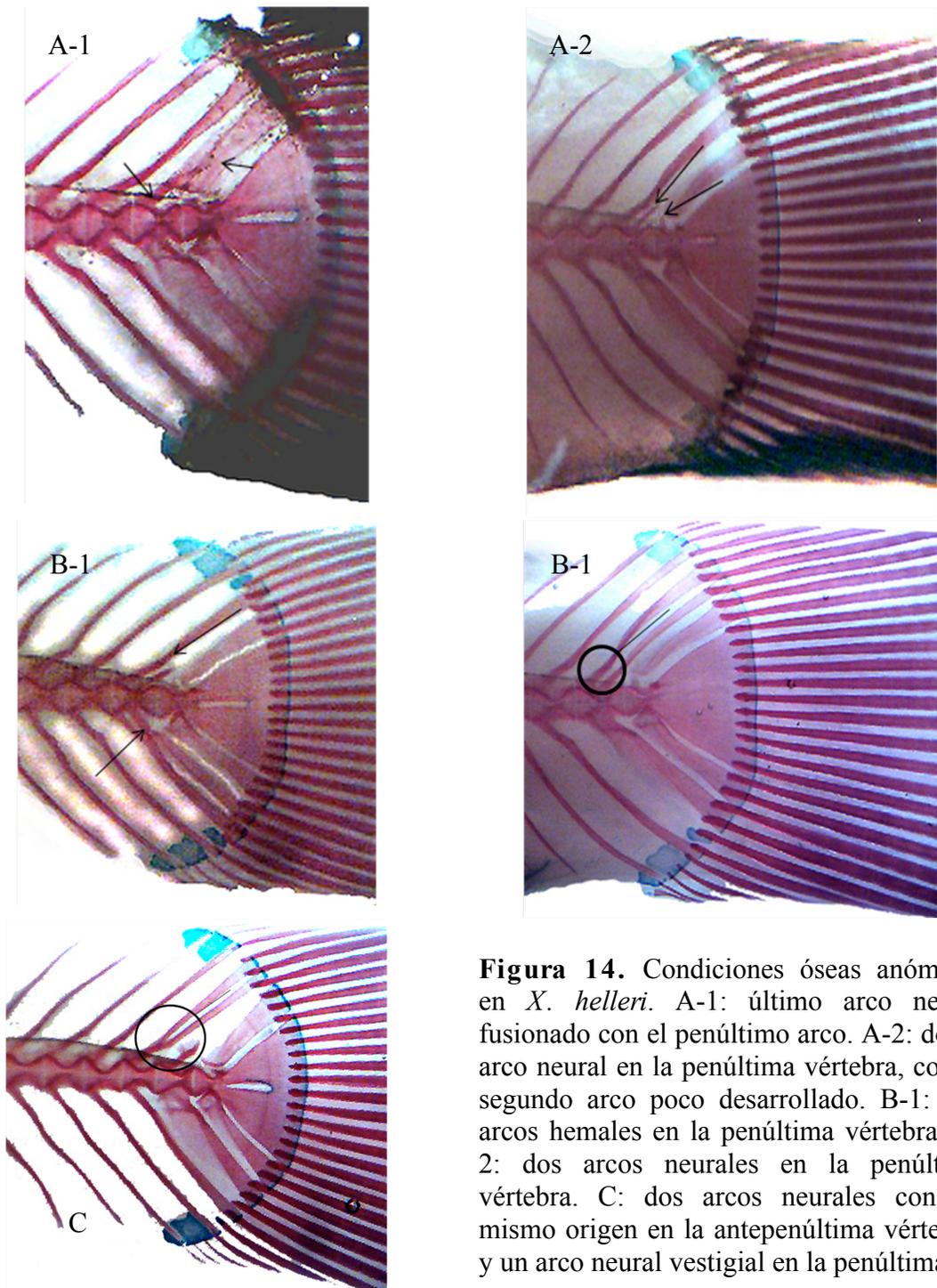


Figura 14. Condiciones óseas anómalas en *X. helleri*. A-1: último arco neural fusionado con el penúltimo arco. A-2: doble arco neural en la penúltima vértebra, con el segundo arco poco desarrollado. B-1: dos arcos hemales en la penúltima vértebra, B-2: dos arcos neurales en la penúltima vértebra. C: dos arcos neurales con un mismo origen en la antepenúltima vértebra, y un arco neural vestigial en la penúltima.

VII. 4. Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno se presenta en la figura 15 y se observó un valor más bajo en los peces alimentados con una suplementación de 100,000 UI/L de medio. Se observa una tendencia a la disminución en el consumo de oxígeno conforme aumenta la concentración de vitA en la dieta ofrecida a los peces.

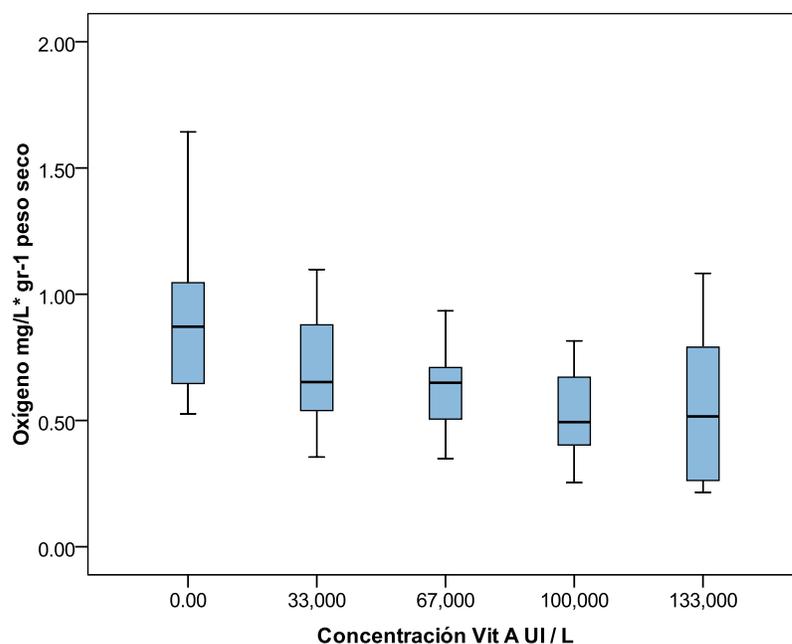


Figura 15. Gráfica del consumo de oxígeno de crías de *X. helleri*. Aunque hay homogeneidad de varianzas, no hubo diferencias entre los tratamientos.

VII. 5. Excreción de amonio

La figura 16 muestra las medias de excreción de amonio. Se encontraron valores medios más altos en los organismos alimentados con 67,000 UI/L que los observados en los del grupo alimentado con 113,000 UI/L medio.

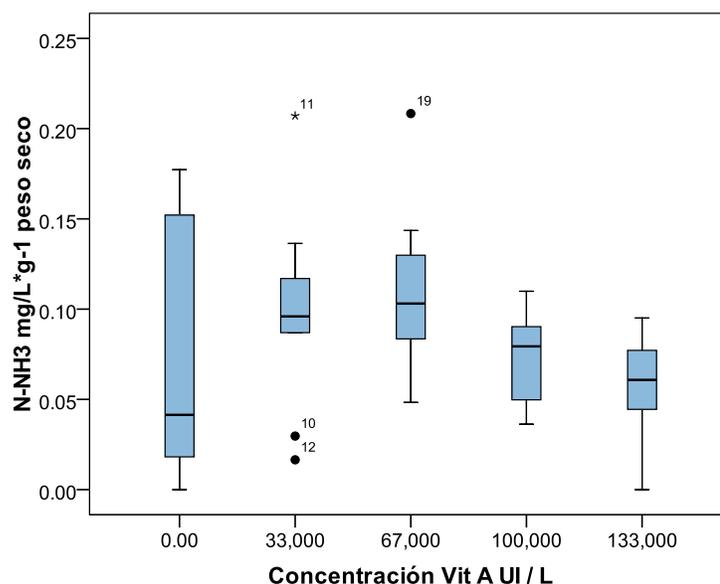


Figura 16. Gráfica de la producción de amonio de crías de *X. helleri*. No se observaron diferencias entre los tratamientos.

VII. 6. Contenido de lípidos

Para este apartado se reportan ambas etapas de tratamientos para una mejor visualización de los resultados obtenidos y de sus tendencias.

En la figura 17 se presentan los contenidos de lípidos totales para músculo y vísceras de la etapa de detección de rangos. No se observaron diferencias significativas entre las medias del contenido de lípidos del músculo, aunque se observó una tendencia de incremento del contenido conforme aumentó la vitA en la dieta. Respecto al contenido en las vísceras, se observó la misma tendencia que en músculo y los peces alimentados con la concentración de 533,000 UI/L medio presentaron un valor significativamente más alto que el grupo control.

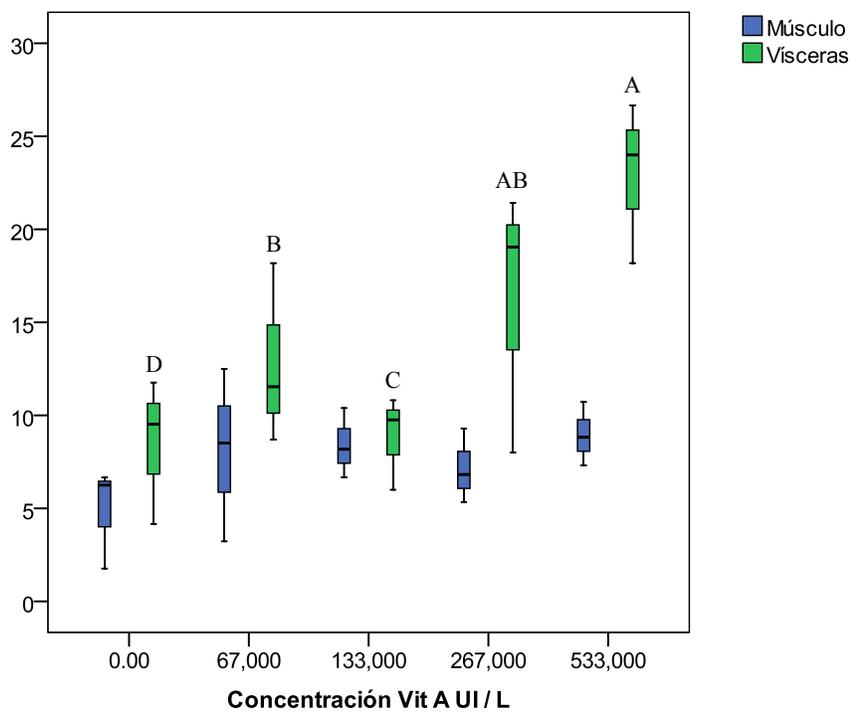


Figura 17. Gráfica de medianas del contenido de lípidos en base al peso seco de crías de *X. helleri*. Los valores para los lípidos en músculo están representados en azul, y los de vísceras en verde. Los valores en músculo no muestran homogeneidad de varianza, pero las vísceras muestran diferencia entre los tratamientos. Las letras sobre las columnas indican diferencias significativas.

El contenido de lípidos para músculo y vísceras de la etapa de concentración óptima se presentan en la figura 18. No se observaron diferencias significativas en los contenidos de ambas partes del cuerpo. Sin embargo, se observó una tendencia de un incremento en el contenido de lípidos conforme aumentó la vitA en la dieta, particularmente en las vísceras.

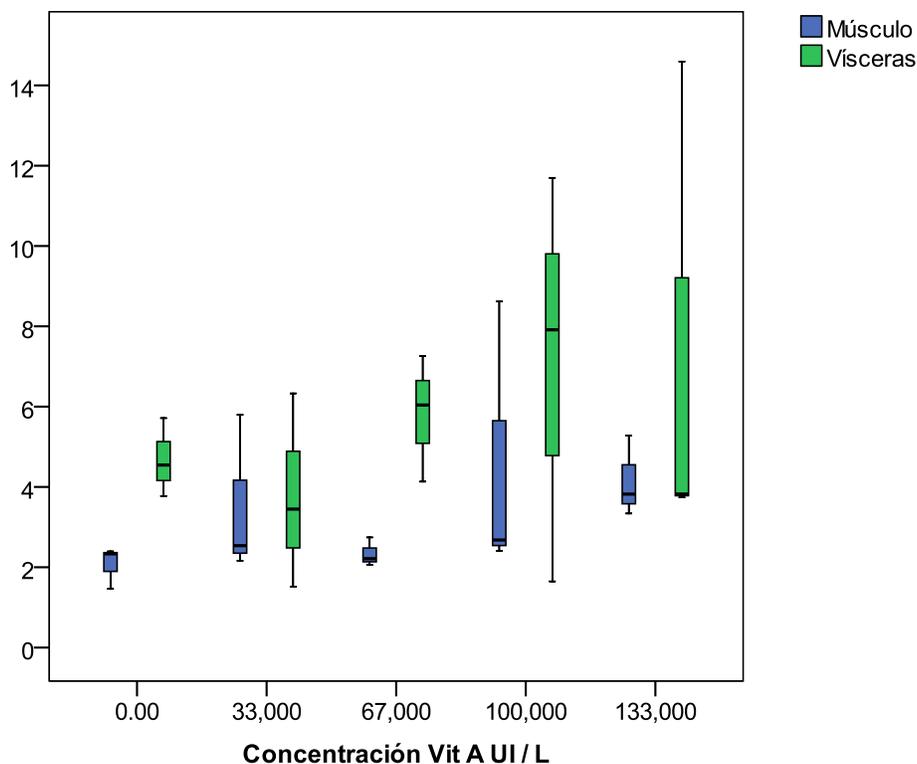


Figura 18. Gráfica del contenido de lípidos en base al peso seco de crías de *X. helleri*. No se cumplió el criterio de homogeneidad de varianza, y no hay diferencias entre los tratamientos. Los valores para los lípidos en músculo están representados en azul, y los de los lípidos en vísceras en verde.

VII. 7. Contenido de proteínas

Como lo muestra la figura 19, los promedios del contenido de proteína en peso seco del pez que resultaron mayores fueron los pertenecientes al tratamiento con 33,000 UI/L de medio, aun cuando estos no son significativamente altos.

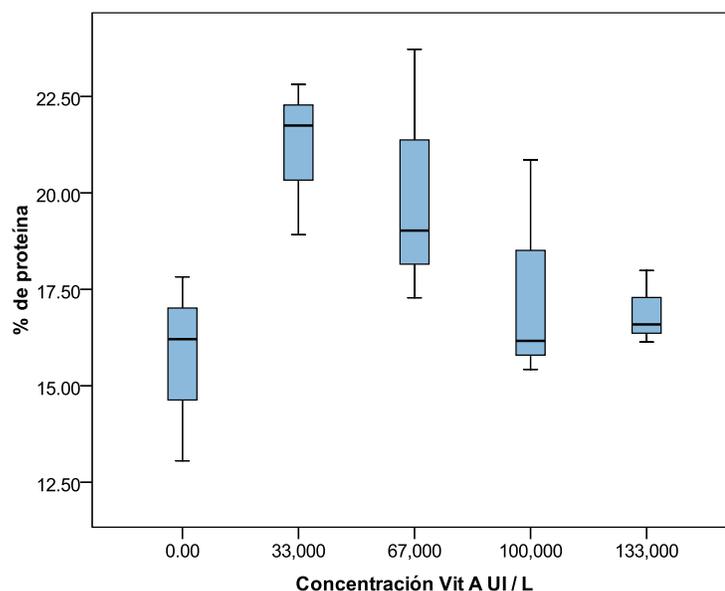


Figura 19. Gráfica del contenido de proteínas en base al peso seco de crías de *X. helleri*. No se observaron diferencias entre los tratamientos.

VIII. Discusión.

El presente estudio demuestra que es necesaria la adición de vitA en la dieta de *X. helleri* para su crecimiento y los datos indican que la suplementación de vitA para el crecimiento óptimo de crías es de 133,000 UI/L medio de enriquecimiento, cuando se utiliza pulga de agua.

Los requerimientos de vitA reportados para crecimiento en peces de importancia comercial van desde 2,000 hasta 20,000 UI/kg de dieta (Kitamura *et al.*, 1967; Shim *et al.*, 1990; Shimeno, 1991; Dedi *et al.*, 1995; Saleh *et al.*, 1995; Sealey *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 2003; Mohamed *et al.*, 2003; Hernández, 2005, 2006; Tarui *et al.*, 2006, y Villeneuve, 2006). Estos requerimientos han sido evaluados con dietas balanceadas, por lo que es difícil hacer una comparación directa con los requerimientos de vitA obtenidos en el presente trabajo. El uso de alimento vivo para determinar los requerimientos de vitA ha sido

previamente reportado para larvas del lenguado japonés *P. olivaceus* (Dedi *et al.*, 1995) y en el que se encontró una concentración óptima de 20 mg vitA/10 L (3,600 UI/L medio) con nauplio de *Artemia*. Esta concentración en el medio es menor a la encontrada en el presente trabajo (66,667 UI/l medio) y de acuerdo con Dedi *et al.* (1997), los estadios larvarios de peces son especialmente sensibles a altas concentraciones de vitA, debido a los cambios morfológicos que se presentan durante la metamorfosis. Los organismos utilizadas durante este trabajo se consideraron como crías, pero debido a que *X. helleri* es una especie vivípara el grado de desarrollo de los peces recién nacidos es mayor al observado en peces que producen huevo. Hernández *et al.* (2004) reporta que mientras mayor sea el grado de desarrollo de los peces, los requerimientos de vitA aumentan; y por su grado de desarrollo las crías de *X. helleri* parecen no ser tan sensibles a concentraciones de vitamina que en otras especies provocan la incidencia de malformaciones.

Durante las dos pruebas de alimentación, no se observó que las crías presentaran modificaciones en el esqueleto por acción de la vitA. Por ello, se recomienda la concentración de 66, 667 UI/L medio cuando se utilizan rotíferos, pulga de agua y/o *Artemia* en la alimentación de crías de *X. helleri*.

No existen reportes sobre el efecto de la vitA con la excreción de amonio y el consumo de oxígeno. Estos dos parámetros son un indicativo de la condición metabólica de los organismos: a menor excreción de amonio y consumo de oxígeno, la condición del organismo es mejor (Cho *et al.*, 1982; Ballestrazzi *et al.*, 1994). La inclusión de vitA en la dieta mejora la condición metabólica de los organismos, debido a que mantiene la integridad de los epitelios y otros tejidos, porque favorece la regeneración de los mismos y un mejor aprovechamiento de los nutrientes.

El aumento del contenido de lípidos en las vísceras conforme a la concentración de vitA en la dieta, ha sido reportado previamente para guppy (Shim y Tan, 1990) y pargo rojo (Ogata y Oku, 2001; Hernández *et al.* 2006). Hernández *et al.* (2005) y Kruk *et al.* (2008)

sugieren que la vitA induce la diferenciación de adipocitos preferentemente en las vísceras que en los músculos. Otro aspecto importante a mencionar es la posibilidad de que la vitA incremente la movilización de lípidos hacia las vísceras (particularmente hacia las gónadas) como una respuesta inicial en la maduración sexual (Ling *et al.*, 2006). De acuerdo con Tamaru *et al.* (2001), *X. helleri* empieza a madurar a partir de los 90 días después del nacimiento y es posible que al término de las pruebas de alimentación los organismos iniciaran la madurez sexual. De hecho, se observó que algunos machos presentaban las características sexuales secundarias de la especie. Se ha propuesto que la vitA tiene un papel importante en la reproducción (Combs, 1998), sin embargo las bases bioquímicas son aún desconocidas. Los datos obtenidos aunque no son concluyentes, debido a que no se realizaron análisis histológicos de las gónadas, indican que dicho aumento de lípidos estaría relacionado con el inicio de la madurez sexual de los organismos.

Partiendo de la caracterización de los requisitos de vitA de las crías de esta especie, el estudio de los efectos en tejidos, del cambio de requerimientos de la misma con respecto a la edad y de la caracterización de los vehículos utilizados (y de otros como pueden ser diferentes especies de pulga de agua, *Artemia* o rotíferos en trabajos posteriores), debiera ser posible optimizar la alimentación de cada etapa de desarrollo, incluyendo adultos y el período perinatal, para obtener los mejores aumentos en talla, así como supervivencias mayores e incluso natalidades elevadas y sin defectos en su desarrollo (Johnson *et al.*, 2009).

IX. Conclusiones

La concentración óptima de vitA para crías de *Xiphophorus helleri* bajo la forma de retinil palmitato se sitúa entre las 67,000-133,000 UI/L medio de enriquecimiento usando pulga de agua *Moina macrocopa*.

El consumo de oxígeno y la excreción de amonio presentan una relación inversa respecto al aumento en la concentración de vitA. Entre las 67,000-133,000 UI/L medio de enriquecimiento se encontraron los valores promedios más reducidos para la producción de amonio. Esta condición podría en trabajos posteriores reducir las emisiones de nitrógeno al ambiente derivadas del ejercicio de la acuicultura (Green *et al.*, 2002).

Hubo un aumento importante en la cantidad de lípidos en vísceras conforme aumentaba la concentración de vitA en la dieta. Los datos indican que este mecanismo ha evolucionado como un sistema para proveer a los ovocitos con una mayor cantidad de vitelo y obtener una mejor cría (Ling *et al.*, 2006).

X. Recomendaciones

Se recomienda determinar la concentración actual de la vitA en el cuerpo de las crías y en la pulga de agua mediante HPLC.

También, se aconseja continuar con el estudio del efecto de la vitA en la deposición diferencial de los lípidos.

Ya que no se observaron modificaciones en el estudio cualitativo de doble tinción y transparentación con las concentraciones usadas, se sugiere realizar un estudio de morfometría geométrica.

XI. Referencias bibliográficas

- Al-Harbi, A. H. 2001. Skeletal Deformities in Cultured Common Carp *Cyprinus carpio* L. Asian Fisheries Science. 14 (247): 247-254. Asian Fisheries Society, Manila, Filipinas.

- Alzota, R. 2001. Curso de histología, embriología y Teratología. Guía de estudio: técnicas histológicas. UNCPBA, Facultad de Ciencias Veterinarias, Departamento de Ciencias Biológicas. Buenos Aires. 15 p.
- Ballestrazzi, R.; Lanarri, D.; Agaro, E. D. y Mion, A. 1994. The effect of dietary protein level and source on growth, body composition, total ammonia and reactive phosphate excretion of growing sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*. 127: 197-206. Elsevier Science B.V.
- Baud, B.; Tibboel, D.; Rambaud, C.; Mercier, J.; Bourdon, J. R.; Dinh-xuan, A. T. y Archer, S. L. 1999. Vitamin A decreases the incidence and severity of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology*. 277: 423-429.
- Cahu, C.; Zambonino Infante J. y Takeuchi T. 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture*. 227(1-4): 254-258.
- Cho, C. J., Slinger, S. J. y Bayley, H. S. 1982. Bioenergetics of salmonid fishes: Energy intake, expenditure and productivity. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B (1): 25-41. Pergamon Press. Gran Bretaña.
- Clescerl, L.S., A.E. Greenberg and A.E. Eaton. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. 17^a ed. America Public Health Association. Washington, D.C., U.S.A.
- Combs, Gerald F. 1998. The vitamins, Fundamental Aspects and Health. 2 ed. Academic Press. E. U. P. 43-153.
- Dedi, J.; Takeuchi, T.; Seikai, T. y Watanabe, T. 1995. Hypervitaminosis and safe levels of vitamin A for larval flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed *Artemia* nauplii. *Aquaculture*. 133: 135-146. Elsevier Science B.V.

- Dingerkus, G. y Uhler L. 1977. Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *Stain technology*. 52(4). The Williams & Wilkins Co. E. U.
- Drummond, J. C.; Zilva, S. S. y Coward, K. H. 1922. The origin of the vitamin A in fish oils and fish liver oils. 518-522.
- Eckert, R. 1990. Fisiología animal mecanismos y adaptaciones. 3ª ed. Interamericana-McGraw-Hill. España. 683 págs.
- Ezhil, J.; Jeyanthi, C. y Narayanan, M. 2008. Marigold as a Carotenoid Source on Pigmentation and Growth of Red Swordtail, *Xiphophorus helleri*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 8: 99-102.
- Esparza, S. 2006. Efecto de dietas enriquecidas con vitaminas A, D y E en alevines de *Poecilia reticulata* (Guppy). Tesis, licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México, D. F., p. 15-29.
- Fernandez, I.; Hontoria, F.; Ortiz-Delgado, J. B.; Kotzamanis, Y.; Estévez, A.; Zambonino-Infante, J. L. y Gisbert, E. 2008. Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of Vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture*. 283: 102–115. Elsevier B.V.
- Fierro, C. 1990. Desempeño de tres dietas balanceadas suministradas a juveniles del langostino *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann, 1836) en condiciones de laboratorio. Tesis, licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Superiores Iztacala. México, D. F., p.4-15.
- Gersenowies, J. R. 2007. Alometría. *Lecturas de anatomía animal* No. 2. UNAM, FES Iztacala. 142 págs.
- Green, J. A.; Hardy, R. W. y Brannon, E. L. 2002. Effects of dietary phosphorus and lipid levels on utilization and excretion of phosphorus and nitrogen by rainbow

trout (*Oncorhynchus mykiss*). 1. Laboratory-scale study. *Aquaculture Nutrition*. 8: 279-290. Blackwell Science Ltd.

- Haga, Y.; Takeushi, T. y Seikai, T. 2002. Influence of all-*trans* retinoic acid on pigmentation and skeletal formation in larval Japanese flounder. *Fisheries Science*. 68: 560-570.
- Haga, Y.; Tarui, F.; Ohta, K.; Shima, Y. y Takeuchi, T. 2006. Effect of light irradiation on dynamics of vitamin A compounds in rotifers and *Artemia*. *Fisheries Science*. 72: 1020-1026.
- Hernández-H., L. H.; Teshima, S.; Ishikawa, M. y Koshio, S. 2004. Effects of Dietary Vitamin A on Juvenile Red Sea Bream *Chrysophrys major*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 35 (4): 436-444.
- Hernández-H., L. H.; Teshima, S.; Ishikawa, M.; Alam, M. S.; Koshio, S. y Tanaka, Y. 2005. Dietary vitamin A requirements of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture Nutrition*. 11: 3-9. Blackwell Publishing Ltd.
- Hernández-H., L. H.; Teshima, S.; Ishikawa, M.; Gallardo-Cigarroa, F. J. y Alam, M. S. 2006. Efectos del Palmitato de vitamina A, el β -caroteno y el ácido retinoico en el crecimiento e incidencia de deformidades en crías de pargo rojo *Chrysophrys major*. *Ciencias Marinas*. 32: 1B.
- Hernández-H., L. H.; Teshima, S.; Koshio, S.; Ishikawa, M.; Tanaka, Y. y Alam, M. S. 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.
- Hollister, G. 1929. Clearing and Dyeing fish for bone studies. *Zoologica*. XII, (10). N. Y. Zoological society.

- Hornby, S. J.; Ward, S. J. y Gilbert, C. E. 2007. Eye birth defects in humans may be caused by a recessively-inherited genetic predisposition to the effects of maternal vitamin A deficiency during pregnancy. *Medical Scientific Monitor*. 9 (74): 23-26.
- Johnson, R. B.; Cook, M. A.; Nicklason, P. M. y Rust, M. B. 2009. Determination of apparent protein digestibility of live *Artemia* and a microparticulate diet in 8-week-old Atlantic cod *Gadus morhua* larvae. *Aquaculture*. 288: 290–298.
- Kitamura, S.; Suwa, T.; Ohara, S. y Nakagawa, K. 1967. Studies on vitamin requirements of rainbow trout-III. Requirement for vitamin A and deficiency symptoms. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 33:1126–1131.
- Kosian, P. A.; Makynen, E. A.; Ankley, G. T. y Degitz, S. J. 2003. Uptake and Metabolism of All-*trans* Retinoic Acid by Three Native North American Ranids. *Toxicological sciences*. 74: 147–156.
- Kruk, Z. A.; Bottema, C. D. K.; Davis, J. J.; Siebert, B. D.; Harper, G. S.; Di, J. y Pitchford, W. S. 2008. Effects of vitamin A on growth performance and carcass quality in steers. *Livestock Science*. 119: 12–21. Elsevier B.V.
- Kumar, M. V.; Sunvold, G. D. y Scarpace, P. J. 1999. Dietary vitamin A supplementation in rats: suppression of leptin and induction of UCP1 mRNA. *Journal of Lipid Research*. 40: 824-829.
- Langdon, C.; Nordgreen, A.; Hawkyard, M. y Hamre, K. 2008. Evaluation of wax spray beads for delivery of low-molecular weight, water-soluble nutrients and antibiotics to *Artemia*. *Aquaculture*. 284: 151–158. Elsevier B.V.
- Ling, S.; Meng-Kiat, K.; Sifzizul, T.; Muhammad, T.; Kolkovski, S. y Chong, A. 2006. Effect of dietary HUFA on reproductive performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNAs in female swordtail *Xiphophorus helleri*. *Aquaculture*. 261: 204–214. Elsevier B.V.

- Martins, C. I.; Hillen, B.; Schrama, J. W. y Verreth, J. A. 2008. A brief note on the relationship between residual feed intake and aggression behaviour in juveniles of African catfish *Clarias gariepinus*. *Applied Animal Behaviour Science*. 111: 408–413, Elsevier B.V.
- Martty, A. y D. Couto, 1976. *Espadas y Platys (Xiphophorus)*. Albatros. Buenos Aires. 107 p.
- Mello, T.; Nakatsuka, A.; Fears, S.; Davis, W.; Tsukamoto, H.; Bosron, W. F. y Sanghani, S. P. 2008. Expression of carboxylesterase and lipase genes in rat liver cell-types. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 374: 460–464. Elsevier Inc.
- Mohamed, J. S.; Sivaram, V.; Roy, T. S. C.; Mariam, S. P.; Murudagass, S. y Hussain, M. R. 2003. Dietary vitamin A requirements of juvenile greasy grouper (*Epinephelus tauvina*). *Aquaculture* 219:693–701.
- Ogata, H. Y.; Oku, H.; Murai, T. 2002. Growth, feed efficiency and feed intake of offspring from selected and wild Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*. 211: 183-193. Elsevier Science B.V.
- Ohlberger, J.; Staaks, G. y Hölker, F. 2007. Estimating the Active Metabolic Rate (AMR) in Fish Based on Tail Beat Frequency (TBF) and Body Mass. *Journal of Experimental Zoology*. 307A: 296–300. Wiley-Liss, Inc.
- Poston, H. A. y Livingston, D. L. 1971. The influence of dietary levels of protein and vitamin A on the liver vitamin A, lipid metabolism, and growth of the brook trout. *Fish Res. Bulletin*. 34: 27–34.
- Raja, J. y Kunchitham, S. 2004. Effect of feed type on growth and fertility in ornamental fish, *Xiphophorus helleri*. *The Israeli Journal of Aquaculture*. 56(4): 264-273

- Saleh, G.; Eleraky, W. y Gropp, J. M. 1995. A short note on the effects of vitamin A hypervitaminosis and hypovitaminosis on health and growth of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Ichthyology*. 11:382–385.
- Sales, J. y Janssens, G. P. J. 2003. Nutrient requirements of ornamental fish. *Aquatic Living Resources*. 16: 533–540.
- Sealy, W. M.; Davis, J. T. y Gadin, D. M. 1997. Refinement of Vitamin Supplementation in Diets for Pond-raised Channel Catfish. SRAC Publication. No. 188.
- Shim, K. F. y Tan, C. H. 1990. The dietary requirement of vitamin A in guppy (*Poecilia reticulata* Peters). Págs. 133-140 en M. Takeda and T Watanabe, editores. The current status of fish nutrition in aquaculture, Proceedings of Third International Symposium on Feeding and Nutrition of Fish, Toba, Japan, August 28- September 1. Japan Translation Center, Ltd., Tokio, Japón.
- Shimeno, S. 1991. Yellowtail, *Seriola quinqueadiata*. Handbook of nutrient requirements of finfish. Págs. 181–191 en R.P. Wilson, editor. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, EU.
- Sink, T. D. y Lochmann, R. T. 2008. Effects of dietary lipid source and concentration on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) egg biochemical composition, egg and fry production, and egg and fry quality. *Aquaculture*. 283: 68–76. Elsevier B.V.
- Sims, D. W. 1996. The effect of body size on the standard metabolic rate of the lesser spotted dogfish. *Journal of Fish Biology*. 48 (3): 542–544.
- Tamaru, C. S.; Cole, B.; Bailey, R.; Brown, C.; y Ako, H. 2001. A Manual for Commercial Production of the Swordtail, *Xiphophorus helleri*. University of Hawaii Sea Grant Extension Service, School of Ocean Earth Science and Technology. Honolulu, Hawaii. No. 128, CTSA Publication.

- Tarui, F.; Haga, Y.; Ohta, K.; Shima, Y. y Takeuchi, T. 2006. Effect of *Artemia* nauplii enriched with vitamin A palmitate on hypermelanosis on the blind side in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*. 72: 256–262.
- Turner, C. L. Traducción por Manuel Zapater Galve. 1933. Viviparismo impuesto sobre el ovoviviparismo en los goodeidos, una familia de peces teleósteos de la meseta mexicana. *Journal of morphology*. Locy Zoological Laboratory, Northwestern University. 5(2).
- Verhaegen, Y.; Adriaens, D.; De Wolf, T.; Dhert, P. y Sorgeloos, P. 2007. Deformities in larval gilthead sea bream (*Sparus aurata*): A qualitative and quantitative analysis using geometric morphometrics. *Aquaculture*. 268: 156–168. Elsevier B.V. Bélgica.
- Villeneuve, L. A.; Gisbert, E.; Moriceau, J.; Cahul, C. L. y Zambombino, J. L. 2006. Intake of high levels of vitamin A and polyunsaturated fatty acids during different developmental periods modifies the expression of morphogenesis genes in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *British Journal of Nutrition*. 95 (4): 677-687. CABI Publishing.

- <http://www.expasy.ch/>

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=4506755>

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=63146929>

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/clust.cgi?ORG=Omy&CID=23930>

- <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1BY4>

Anexos.

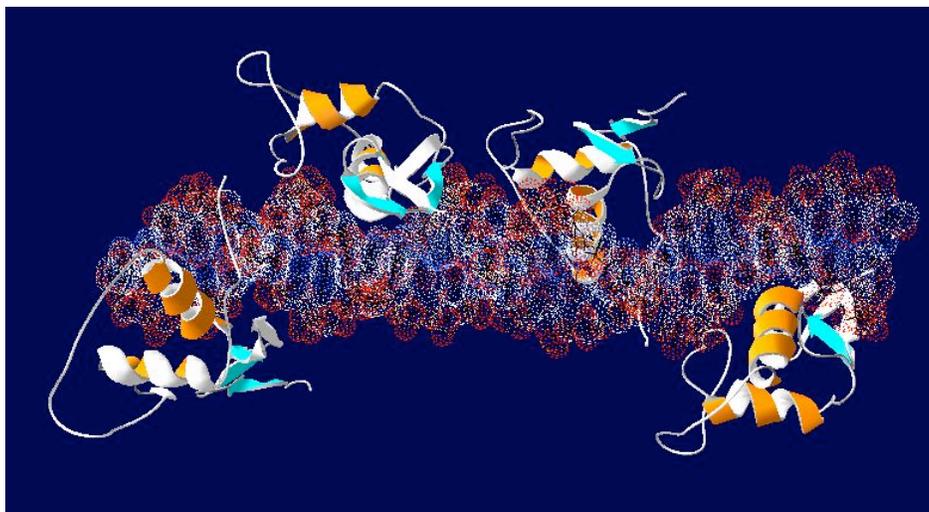


Figura 1. Imagen del heterodímero constituido por las cadenas A, B, C y D del receptor RXR alfa de *Homo sapiens*, en unión con el DNA.

Tabla 1. Efectos de la concentración de vitA sobre los peces.

Deficiencia	Normal	Hipervitaminosis
Pérdida de la integridad epitelio	Mantenimiento y reparación de tejidos corporales (daño y bajas temperaturas)	-
-	Desarrollo del sistema nervioso	-
Crecimiento deficiente	Crecimiento óseo	Disminución del crecimiento Malformaciones óseas: escoliosis, lordosis, pérdida o adición de radios, opérculo fusionado y malformaciones mandibulares
Ceguera	Pigmentos fotorreceptores	-
Susceptibilidad a infecciones	Protección contra enfermedades	Susceptibilidad a enfermedades
Susceptibilidad al estrés	Resistencia al estrés	Susceptibilidad al estrés

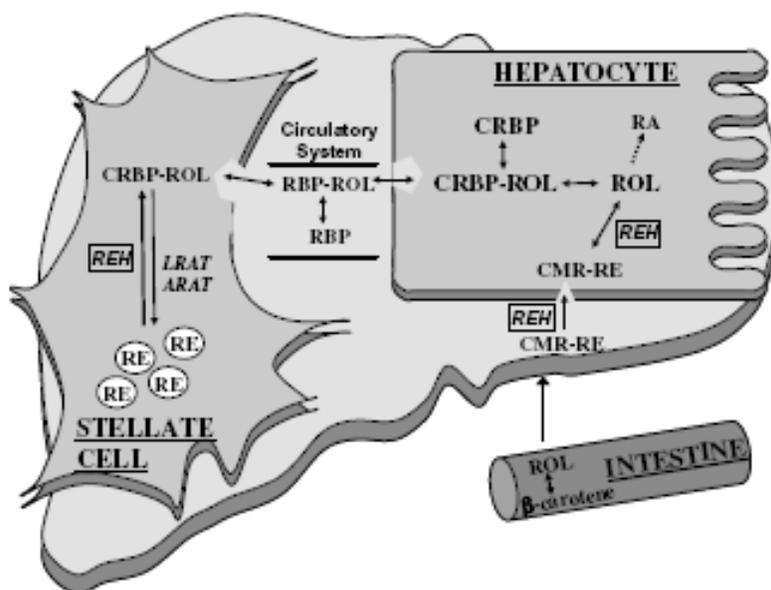


Figura 2. Los quilomicrones que contienen retinil-ésteres (CMR-RE) son captados por los hepatocitos después de la absorción intestinal. Los retinil-ésteres se hidrolizan por la acción de la retinil-éster hidrolasa (REH) para formar retinol (ROL). El Retinol puede o ser oxidado para formar ácido retinoico (RA) o ligarse a las proteínas celulares de unión a retinol (CRBP). Las CBRP unidas a retinol pueden ser secretadas hacia la circulación formando complejos con las proteínas de unión a retinol (RBP) para suplir los requerimientos de retinol del cuerpo. El excedente de retinol es recogido por las células esteladas y convertido a retinil-ésteres (RE) por la lecitin-retinol aciltransferasa (LRAT) o por la coenzima A retinol aciltransferasa (ARAT) para almacenarse por largos períodos como micelas lipídicas. Estos retinil-ésteres pueden ser reconvertidos a retinol cuando es necesario por la acción de la retinil-éster hidrolasa (extraído de Mello *et al.*, 2008).



Figura 3. Cultivo de *Chlorella vulgaris*.

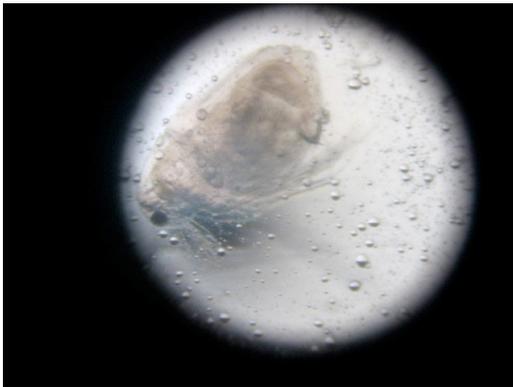


Figura 4. *Moina macrocopa*.



Figura 5. *M. macrocopa* en captación.

Figuras 4 y 5. En estas imágenes, se puede apreciar la captación de las microcápsulas por parte de estos cladóceros. En la figura 4 se aprecia *M. macrocopa* sin estar expuesta a las microcápsulas (control), y en la figura 5 una vez que ha estado en contacto y captado las microcápsulas.

Tabla 2. Concentraciones de vitA para la etapa de detección de rangos.

Solución total	UI/ml	Solución 2 ml	Por tratamiento (3 repeticiones)	Por pecera
Control	0	0	0	0
10,000 UI/150 ml sol	66.67	133.33 UI/ml	15.2 UI/5,000 org.	5.06 UI/pecera
20,000 UI/150 ml sol	133.33	266.6 UI/ml	30.4 UI/5,000 org.	10.13 UI/pecera
40,000 UI/150 ml sol	266.67	533.33 UI/ml	60.8 UI/5,000 org.	20.26 UI/pecera
80,000 UI/150 ml sol	533.33	1066.6 UI/ml	121.6 UI/5,000 org.	40.53 UI/pecera

Tabla 3. Concentraciones de vitA para la concentración óptima.

Solución total	UI/ml	Solución 2 ml	Por tratamiento (3 repeticiones)	Por pecera
Control	0	0	0	0
5,000 UI/150 ml sol	33.33	66.66 UI/ml	7.6 UI/5,000 org.	2.53 UI/pecera
10,000 UI/150 ml sol	66.67	133.33 UI/ml	15.2 UI/5,000 org.	5.06 UI/pecera
15,000 UI/150 ml sol	100	199.96 UI/ml	22.8 UI/5,000 org.	7.6 UI/pecera
20,000 UI/150 ml sol	133.33	266.6 UI/ml	30.4 UI/5,000 org.	10.13 UI/pecera

Tabla 4. Crecimiento de crías de *X. helleri* alimentados durante 85 días a las diferentes concentraciones de vitA durante la etapa de detección de rangos. PF, GP = [(peso final - peso inicial)/peso inicial]*100 y TEC = [(ln PF- ln PI)/85]*100.

Tratamiento (IU/L medio)	PF (g)	GP (%)	% Tasa específica de crecimiento (TEC)	Supervivencia (%)
0	0.43 ± 0.01	172 ± 5	1.18 ± 0.02	100
67,000	0.55 ± 0.06	256 ± 40	1.50 ± 0.13	77
133,000	0.47 ± 0.02	199 ± 12	1.29 ± 0.05	84
267,000	0.51 ± 0.01	229 ± 9	1.40 ± 0.03	80
533,000	0.53 ± 0.05	238 ± 20	1.44 ± 0.07	80

Tabla 5. Crecimiento de crías de *X. helleri* alimentados durante 90 días a las diferentes concentraciones de vitA durante la etapa de concentración óptima. PF, GP = [(peso final - peso inicial)/peso inicial]*100 y TEC = [(ln PF- ln PI)/85]*100.

Tratamiento (UI/L medio)	PF	GP (%)	TEC (%)	Supervivencia (%)
0	0.59 ± 0.02	72.40 ± 4.76	0.68 ± 0.03	96.67
33,000	0.62 ± 0.02	69.09 ± 7.17	0.65 ± 0.05	96.67
67,000	0.64 ± 0.04	101.18 ± 10.20	0.87 ± 0.06	86.67
100,000	0.65 ± 0.05	104.56 ± 12.26	0.89 ± 0.07	96.67
133,000	0.76 ± 0.06	148.97 ± 25.06	1.13 ± 0.12	73.33

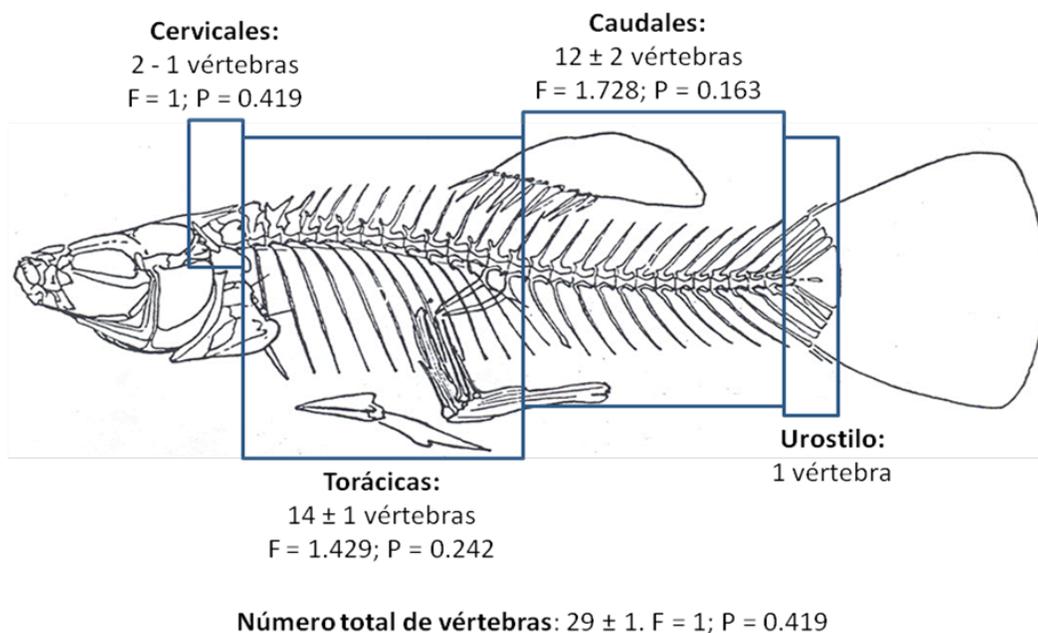


Figura 6. Esquema del conteo de vértebras. Se muestran los valores de F y las significancias.

Tabla 6. Resultados de las pruebas de ANDEVA de las diferentes variables. Se indica la variable y los valores obtenidos a un $\alpha= 0.05$.

Variable	F	Significancia
Etapa de detección de rangos		
PF	2.364	0.123
GP	2.365	0.123
TEC	2.893	0.79
Supervivencia	1.203	0.368
Longitud total	1.724	0.221
Longitud patrón	1.713	0.223
Altura máxima	1.493	0.276
Consumo de oxígeno	0.620	0.658
Producción de amonio	1.756	0.157
Contenido de lípidos		
Músculos	0.968	0.466
Vísceras	4.641	0.22
% Proteínas	0.155	0.956
Concentración óptima		
PF	2.429	0.116
GP	5.795	0.011
TEC	6.312	0.008
Supervivencia	9.500	0.002
Longitud total	2.092	0.157
Longitud patrón	2.802	0.085
Altura máxima	1.801	0.205
Consumo de oxígeno	2.552	0.054
Producción de amonio	1.874	0.134
Contenido de lípidos		
Músculos	1.017	0.444
Vísceras	0.484	0.747
% Proteínas	2.506	0.109