



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

**SUSTITUCIÓN PARCIAL DE HARINA DE PESCADO POR
HARINAS DE SUBPRODUCTOS MARINOS EN LA
UTILIZACIÓN DE ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO
DEL JUREL (*Seriola rivoliana*) CULTIVADO EN
CONDICIONES DE LABORATORIO.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

SANDRA PATRICIA LIBERTAD JIMÉNEZ BÁRCENAS

Asesores:

Dr. Roberto Civera Cerecedo
MVZ. Angel García Hernández



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis se lo dedico con mucho amor a mis padres: Elvia Patricia Bárcenas Bautista y José Enrique Jiménez Uribe, porque en cada éxito que he logrado están ustedes también.

A todos los amantes de la medicina veterinaria y zootecnia, que también están interesados en el ámbito científico porque...

Ser veterinario no es solamente cuidar a los animales. Es, sobre todo, amarlos no fijándose solo en los patrones éticos de una ciencia médica. Ser veterinario es acreditar la inmortalidad de la naturaleza y querer preservarla siempre más bella. Ser veterinario es oír los maullidos, mugidos, balidos, relinchos, cacareos y ladridos, y, sobre todo, interpretarlos y entenderlos. Es gustar de la tierra mojada, del campo, del monte, de los espacios abiertos, de las lunas y lluvias. Ser veterinario es no importar si los animales piensan, pero sí, si sufren. Es dedicar parte de su ser al arte de salvar sus vidas. Ser veterinario es aproximarse a los instintos. Es perder los miedos. Es ganar amigos de pelos y plumas, que jamás te van a decepcionar. Ser veterinario es detestar encierros y jaulas. Es perder un tiempo enorme apreciando rebaños, tropillas y vuelos de pájaros. Es descubrirse permanentemente, así mismo, a través de los animales. Ser veterinario es ser capaz de entender ojos tristes, orejas caídas, narices calientes, inquietudes o reposos anormales. Ser veterinario es entender el lenguaje corporal de los animales, pedidos mudos de ayuda, interpretar gestos y actitudes de dolor, y conocer la forma de aliviarlos. Es sentir olor de pelo mojado, de almohada con esencia de gato, de ovejas, de corral, de estiércol. Ser veterinario es tener el coraje de penetrar en un mundo diferente y ser igual. Es tener capacidad de comprender gratitudes mudas, más, sin duda alguna, las únicas verdaderas. Es oler el aliento de un cachorro lactante y recordar la propia niñez. Ser veterinario es convivir lado a lado con enseñanzas profundas sobre amor y vida. Ser veterinario es participar diariamente del milagro de la vida. Es convivir con la muerte, saber que es definitiva, pero no siempre desagradable. Todos podemos estudiar veterinaria, pero no todos seremos veterinarios.

Anónimo.

AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud más sincera a mi mamá, por siempre estar a mi lado en todos los momentos, buenos y malos, por siempre darme esos abrazos y besos que quitan miedos, preocupaciones y fracasos, y ponen alegría, ganas y confianza en mí misma, por ser mi ejemplo de fortaleza y nunca conformarme con poco, por ti soy la mujer que admiras. Te Amo Mucho Mamita.

Con mucho amor te agradezco papá, por que fuiste el primero en involucrarme en el mundo de la veterinaria, desde que me diste a cargar los lechoncitos hiciste que amara cada uno de los animales; gracias por siempre apoyarme en todo, aunque a veces te preocupabas demás, siempre confiaste en mí y gracias por darme el nombre y el significado de Libertad, siempre seré Libertad en todos lados. Te quiero mucho Papá. Gracias a ambos, por su paciencia y amor en cada paso que doy y por apoyarme a cumplir un sueño más.

Gracias a mis hermanitos Alfredo y Quique, por su comprensión cuando necesitaba estudiar. Ustedes son la causa y entre otras cosas de que no me deje rendir tan fácil. Los quiero mucho.

Gracias a mis tías: Yola, Gloria, Aida y Yolis, aunque no todas están conmigo, gracias por sus consejos y tiempo, por ayudarme siempre y por su amor. Gracias a mi Tatita porque siempre estás para escuchar y aconsejar, eres un ejemplo de que todo se puede en esta vida si uno se esfuerza.

Gracias a mi mejor amiga Laura, ambas veterinarias, ambas hermanas, gracias por tu apoyo siempre incondicional.

Gracias Marquitos eres mi mejor amigo, sin ti la mejor etapa de mi vida no hubiera sido igual, gracias Yessica por tu amistad tan sincera y gracias Fernanda Martínez me hubiera encantado

conocerte desde un inicio, tu amistad vale mucho para mí. A mis amigos: Alán e Iván gracias por tantas risas y buenos ratos inolvidables. Gracias Toño por los momentos compartidos y por tu apoyo. Gracias a todos los amigos que en un momento coincidimos en la vida, muchos vienen y van, y pocos se quedan. Gracias a cada uno de ustedes por hacerme los recuerdos más gratos de mi etapa de universidad.

Gracias Julio por ser como eres, por quererme como soy y por estar a mi lado, en esta etapa que fue difícil mas no imposible, por escuchar y tenerme paciencia, por todo lo que has dado y demostrado, por confiar en mí, apoyarme y alentarme siempre, por querer caminar y crecer conmigo. Bien dicen que Dios pone a las personas correctas en el momento correcto, nos pusieron juntos, también creo que cuando las almas se tienen que encontrar, el destino acerca mundos, borra distancia, une caminos y desafía lo imposible. Te amo demasiado.

Gracias a Iveth y Samuel mis nuevos amigos encontrados en La Paz, sé que puedo confiar en ustedes, gracias por los agradables momentos, platicas largas y carnes asadas, los aprecio mucho, es muy grato estar con ustedes.

Gracias al CIBNOR y a todas las personas que conocí y me ayudaron en este lugar: Dolores Rondero Astorga y Sindi Juan Antúnez por los análisis químicos proximales de los alimentos. Juan Carlos Pérez Urbiola, Sandra de La Paz Reyes, Yazmín Sánchez Gutiérrez, Asahel Benítez Hernández, Rodolfo Garza Torres y Bryan Liconá Jain, por sacar adelante la producción de los peces, su mantenimiento previo y durante el experimento, así como en el muestreo final. Dariel Tovar Ramírez por la disección de peces. Carmen Rodríguez Jaramillo y la Sra. Eulalia, por la capacitación para realizar los cortes histológicos y mediciones, también a Daniela por su amistad y

pláticas en el laboratorio de histología. Elena Palacios Mechetnov por su asesoría durante la tesis. A mi asesor de tesis el Dr. Roberto Civera, que le tengo mucho cariño, respeto y admiración, gracias por su tiempo para las correcciones, y por siempre estar al pendiente de mí y preocuparse, por su apoyo, consejos y alentarme más en el ámbito científico, muchas gracias doctor lo considero un papá más, lo estimo mucho.

A la Q.B.P. Ana María Ramírez Ornelas del Laboratorio de Análisis Especiales y Diagnóstico Microbiológico, Productos Regionales, Química por su apoyo en el análisis de las muestras sanguíneas.

A mi asesor de tesis Ángel García, por su apoyo para lograr contactarse al CIBNOR, y su tiempo, por estar al pendiente de mí y mis correcciones. Muchas gracias Médico, sin usted no habría conocido el CIBNOR. A la profesora Guadalupe Ramírez por su tiempo en enseñarme la diferenciación celular en frotis sanguíneo de peces.

A mis demás asesores de tesis por su paciencia, tiempo, dedicación y para que este trabajo sea mejor, Biol. Germán Muñoz, MVZ. Sergio Ángeles Campos, MVZ. Jesús Manuel Cortez y MVZ. Luis Andrés Castro Fuentes.

El presente trabajo se llevó a cabo con financiamiento parcial del proyecto Bonos-CONACYT 208914 Desarrollo y validación a nivel industrial de alimentos nutricionalmente balanceados para el cultivo de peces marinos y crustáceos, incorporando ingredientes no convencionales de origen marino, bajo la responsabilidad del Dr. Roberto Civera.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
CONTENIDO.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE CUADROS.....	XI
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1 INTRODUCCIÓN.....	3
2 ANTECEDENTES.....	6
2.1 El Jurel <i>Seriola rivoliana</i>	6
2.2 Harina de pescado.....	7
2.3 Producción de almeja Catarina, Hacha y Camarón.....	9
2.4 Sustituciones de la harina de pescado.....	11
3 HIPOTESIS.....	18

4	OBJETIVO	19
	4.1 General.....	19
	4.2 Específicos.....	19
5	MATERIAL Y MÉTODOS	21
	5.1 Obtención de materia prima y procesamiento de harinas	
	21	
	5.2 Composición química proximal y de energía.....	22
	5.3 Formulación y fabricación de los alimentos	
	experimentales	25
	5.4 Sistema experimental.....	27
	5.5 Diseño experimental.....	28
	5.5.1 Organismos	28
	5.5.2 Bioensayo de crecimiento	29
	5.6 Parámetros productivos.....	30
	5.7 Análisis hematológicos.....	31
	5.7.1 Bioquímica sanguínea	31
	5.7.2 Biometría hemática	32
	5.7.3 Cuantificación de leucocitos	33
	5.8 Análisis histológicos.....	34

5.8.1	Cuantificación de lípidos en hígado	36
5.8.2	Cuantificación de mucinas ácidas y neutras en intestino.....	38
5.8.3	Medición de enterocitos	39
5.9	Análisis estadísticos.....	40
6	RESULTADOS	42
6.1	Composición química proximal y de energía.....	42
6.1.1	Composición química proximal y de energía de las harinas de subproductos marinos.....	42
6.1.2	Composición química proximal y de energía de los alimentos.....	42
6.2	Parámetros productivos.....	43
6.3	Parámetros bioquímicos.....	46
6.4	Parámetros hematológicos.....	48
6.5	Leucocitos.....	49
6.6	Parámetros histológicos.....	52
6.6.1	Lípidos en hígado	52
6.6.2	Mucinas en intestino	54
6.6.3	Altura del enterocito	57
7	DISCUSIÓN	59

7.1	Parámetros productivos.....	59
7.2	Biometría hemática y bioquímica sanguínea.....	64
7.3	Histología del hígado e intestino.....	70
8	CONCLUSIÓN	80
8.1	Recomendaciones.....	82
9	REFERENCIAS	83
10	ANEXOS	102
10.1	Anexo 1: Tinción de Wright.....	102
10.2	Anexo 2: Formulación de la solución Davidson para un galón stock	102
10.3	Anexo 3: Técnica de inclusión en parafina.....	103
10.4	Anexo 4: Técnica de tinción Hematoxilina eosina (Harris)	104
10.5	Anexo 5: Técnica de tinción azul alciano-Shiff...105	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Jurel <i>Seriola rivoliana</i>	7
Figura 2. Precio de la harina de pescado durante el período enero 1983 a enero 2017.....	8
Figura 3. Ejemplos de ingredientes utilizados para sustituir la harina de pescado.....	11
Figura 4. Lípidos en hígado evaluados con el software Image-Pro Plus.....	37
Figura 5. Mucinas ácidas y neutras en intestino, evaluadas en el software Image-Pro Plus.....	38
Figura 6. Altura de enterocitos en intestino evaluadas en el software SigmaScan-Pro5.....	40
Figura 7. Crecimiento de juveniles de jurel <i>Seriola rivoliana</i>	46
Figura 8. Diferentes células identificadas en frotis sanguíneo de jurel <i>Seriola rivoliana</i>	51
Figura 9. Índice de lípidos en hígado en juveniles de jurel <i>Seriola rivoliana</i>	52
Figura 10. Lípidos en hígado.....	53
Figura 11. Índice de mucinas ácidas en intestino de juveniles de jurel <i>Seriola rivoliana</i>	54
Figura 12. Índice de mucinas neutras en intestino de juveniles de jurel <i>Seriola rivoliana</i>	55
Figura 13. Mucinas en intestino.....	56
Figura 14. Altura de enterocito en juveniles de jurel <i>Seriola rivoliana</i>	57
Figura 15. Efecto de la sustitución de harina de pescado por harinas de subproductos marinos, en juveniles de jurel <i>Seriola rivoliana</i> en la altura de los enterocitos.....	58

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química proximal (g/100g de materia seca, excepto humedad) y de energía bruta de las harinas de vísceras de almeja Catarina, de Hacha y cabezas de camarón azul.....	24
Cuadro 2. Composición química proximal (g/100g de materia seca) y energía bruta de los alimentos experimentales elaborados para el bioensayo de crecimiento con jurel <i>Seriola rivoliana</i>	24
Cuadro 3. Composición en ingredientes (g/100g de materia fresca) de los alimentos experimentales elaborados para el bioensayo de crecimiento con jurel <i>Seriola rivoliana</i>	27
Cuadro 4. Parámetros productivos y de utilización del alimento de juveniles de jurel <i>Seriola rivoliana</i> , después de 60 días de consumir alimentos con harinas de subproductos marinos.....	45
Cuadro 5. Parámetros bioquímicos en plasma sanguíneo de juveniles de jurel <i>Seriola rivoliana</i> , después de 60 días de consumir alimentos con harinas de subproductos marinos.....	47
Cuadro 6. Parámetros hematológicos de juveniles de jurel <i>Seriola rivoliana</i> , después de 60 días de consumir alimentos con harinas de subproductos marinos.....	49
Cuadro 7. Diferentes leucocitos de juveniles de jurel <i>Seriola rivoliana</i> , después de 60 días de consumir alimentos con harinas de subproductos marinos.....	50

RESUMEN

JIMÉNEZ BÁRCENAS SANDRA PATRICIA LIBERTAD. Sustitución parcial de harina de pescado por harinas de subproductos marinos en la utilización de alimentos para el desarrollo del jurel *Seriola rivoliana* cultivado en condiciones de laboratorio (bajo la dirección de: Dr. Roberto Civera Cerecedo y MVZ. Angel García Hernández).

Debido a la problemática existente en torno a la harina de pescado (HP), como costos altos y falta de disponibilidad, entre otros, se están buscando alternativas para sustituirla en alimentos balanceados para organismos acuáticos. En este trabajo se evaluó el efecto de la sustitución parcial (25%) de la HP (sardina) por harinas de cabezas de camarón, vísceras de almeja Catarina y Hacha en alimentos para juveniles de jurel *Seriola rivoliana* sobre parámetros productivos, hematológicos e histológicos de peces. Se realizó un bioensayo de crecimiento durante 60 días bajo condiciones de laboratorio (29.1 °C, 36.0 g/L de salinidad y 5.3 mg/L de oxígeno disuelto) con juveniles de *S. rivoliana* con peso promedio inicial de 48 ± 0.6 g, distribuidos en 15 estanques con capacidad de 600 L, a una densidad de 10 peces/estanque. Se evaluaron cinco alimentos: un alimento Control (50% de proteína) con HP; tres alimentos conteniendo 12.5% de harina de cabezas de camarón, vísceras de almeja Catarina o vísceras de Hacha (sustituyendo el 25% de la HP), y un alimento Triple, que contenía las tres harinas experimentales al 12.5% c/una (sustituyendo el 56% de la HP). Los tratamientos Camarón y Hacha permitieron obtener los mejores parámetros productivos, sin alterar los parámetros hematológicos e histológicos, mismos que fueron similares a los del tratamiento Control. Por el contrario, los tratamientos Catarina y Triple afectaron negativamente la mayoría de los parámetros medidos, siendo estos más bajos que los del Control. Se concluye que las harinas de vísceras de Hacha y cabezas de camarón son ingredientes que permiten reemplazar 25% de la HP en alimentos para juveniles del jurel *S. rivoliana*.

ABSTRACT

Due to the existing problems around of fish meal (FM), like high cost and lack availability, and others, are searching alternatives for replacement in balance feed to aquatics organism. In this work was evaluated the effect of partial replacement (25%) of FM (sardine) for meals of shrimp head, Catarina scallop viscera, and Pen shell viscera in diets for juvenile longfin yellowtail *Seriola rivoliana* on productive parameters, hematologic and histologic of fish. Was realized a growth bioassay during 60 days on laboratory condition (29.1°C, 36.0 g/L of salinity and 5.3 mg/L of dissolved oxygen) with *Seriola rivoliana* juveniles with an initial mean weight of 48 0.6 g, distributed in 15 tanks with 600 L capacity and density of 10 fishes per tank. Was evaluated 5 diets: a Control diet (CD, 50% protein) with FM; three diets contained 12.5% shrimp head meal (SH), Catarina scallop viscera meal (CS) or Pen shell viscera meal (PS, replacement 25% FM), and one last diet Triple, with the mix of three experimental meals at 12.5% each one (replacement 56% FM).

The SH and PS treatment allowed getting the best productive parameters without altering the hematologic and histologic parameters, same as were similar to CD treatment. On the contrary, CS and Triple negative affected the majority measure parameters, being lower than CD. It is concluded that Pen shell viscera and shrimp head meals are ingredients that allow 25% fish meal replacement in diets for juvenile yellowtail *Seriola rivoliana*.

1 INTRODUCCIÓN

La acuicultura es un sector de producción de alimento que a nivel mundial tuvo una tasa media anual de crecimiento del 5.7% en el período de 2003 a 2016.¹ Esta actividad produce casi la mitad del pescado destinado a la alimentación humana. Se prevé que para el 2030 aumente a 62%, y si se practica con responsabilidad, podría generar más beneficios en la seguridad alimentaria mundial y el crecimiento económico.²

De la producción mundial de pescado, ya sea por captura o acuicultura, se destina más del 88% para consumo humano.¹ En México, la producción alcanzó 2 millones de toneladas.³ Con este nivel de productividad, se requieren alternativas que mejoren la alimentación de los organismos en cultivo de forma eficiente, para seguir aumentando la producción a un bajo costo, teniendo en cuenta que la mayoría de los peces con alto valor comercial son carnívoros, por ejemplo, el jurel *Seriola rivoliana*, este pez y junto con otras tres especies del mismo género (*Seriola*) tienen gran importancia comercial especialmente en Japón, debido a que genera una industria de mil millones de dólares.⁴

El jurel *Seriola rivoliana* tiene gran potencial de producción por cultivo en nuestro país, y es buen candidato por su rápida

tasa de crecimiento, alta calidad de carne, adaptabilidad al cautiverio, y por supuesto, un alto valor de mercado.⁵

Los requerimientos nutricionales y fuentes de proteína son los temas más investigados en acuicultura, debido a que los ingredientes proteínicos representan el mayor costo de formulación. El uso de alimentos balanceados en acuicultura es aproximadamente de 20 millones de toneladas.⁶ Además, la harina y aceite de pescado son considerados ingredientes clave en la formulación de alimento balanceado.

Los altos costos de la harina de pescado por la falta de disponibilidad han llevado a elaborar harinas de pescado de mala calidad,⁷⁻¹⁰ lo que impone una presión en la industria a reducir los niveles de harina de pescado en alimentos de acuicultura y desarrolla un camino en la investigación a nivel mundial, en busca de ingredientes alternos o no convencionales que permitan sustituir, ya sea parcial o totalmente la harina de pescado.^{8,9,11,12}

Algunos ingredientes no son útiles en alimentos comerciales, ya sea por su elevado precio o porque algunos presentan agentes antinutricionales o tienen desbalances de nutrientes, como deficiencias en aminoácidos y ácidos grasos poli-insaturados esenciales, o también por una baja o nula disponibilidad en el mercado o porque compiten con el consumo humano.

Los subproductos marinos, son el desperdicio de pescado o marisco después de la elaboración industrial y llegan a alcanzar hasta el 70% del peso del animal y está compuesto de cabezas, colas, espinas y vísceras.¹³ Sin embargo, pueden ser una opción viable para sustituir la harina de pescado.

Considerando la necesidad de encontrar ingredientes alternativos a la harina de pescado en alimentos acuícolas, y la disponibilidad de subproductos pesqueros y acuícolas en nuestro país, en el presente trabajo se planteó hacer una evaluación de calidad nutricional de harinas de subproductos marinos, como harina de cabezas de camarón, harina de víscera de almeja Catarina y harina de vísceras de Hacha, como sustituto parcial de harina de pescado en alimentos para el jurel *Seriola rivoliana* cultivado en condiciones de laboratorio, determinando los parámetros productivos, hematológicos e histológicos de los organismos.

2 ANTECEDENTES

2.1 El Jurel *Seriola rivoliana*.

El jurel *Seriola rivoliana* (**Figura 1**) se encuentra distribuido en todo el Pacífico Indo-Occidental, el Pacífico Oriental, en las regiones del Atlántico Occidental, y ocasionalmente, en el Mar Mediterráneo en aguas subtropicales a mares cálidos y templados.¹⁴ Llegan a medir 1.6 m y pesar de 6 a 14 kg.¹⁵ Se alimentan principalmente de peces pequeños y calamares. Se sabe que las especies del género *Seriola* necesitan niveles altos de proteína (45-55%) en su alimentación para alcanzar su máximo crecimiento, pues son altamente dependientes de proteínas para crecer y obtener energía.¹⁶⁻¹⁸

Actualmente la producción de Jurel es importante en Japón y esta industria se está expandiendo a Nueva Zelanda, Australia y Estados Unidos.⁴

En México, la producción de jurel por captura y acuicultura alcanzó en 2017 los 26,000 t, siendo Baja California Sur el cuarto estado productor con 2,900 t.¹⁹

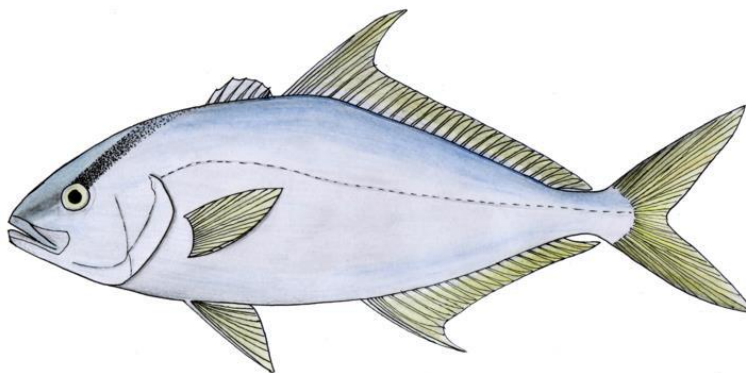


Figura 1. Jurel *Seriola rivoliana*. © Kare Kare / CC-BY-SA-3.

2.2 Harina de pescado

La harina de pescado es utilizada en los alimentos por su alto contenido proteico, que oscila de 65 a 72%, y contiene un adecuado balance de aminoácidos, ácidos grasos esenciales, carbohidratos y vitaminas, haciendo un ingrediente por excelencia demandado en acuicultura.²⁰

Tan solo 20 millones de toneladas de la producción mundial por captura se transformó en harina y aceite de pescado en 2016,¹ ocasionando cada vez, una mayor presión en la extracción de especies pelágicas como anchovetas.²¹ Sin embargo, a causa del fenómeno El Niño que sucedió en el sector pesquero de América del Sur, la producción de harina de pescado ha disminuido gradualmente desde 2005, mientras que la demanda global ha aumentado, provocando un incremento en el precio, alcanzando los 25 mil pesos/t (**Figura 2**). Se espera que el precio de la

harina de pescado siga en aumento debido a una demanda sostenida.^{13,22}

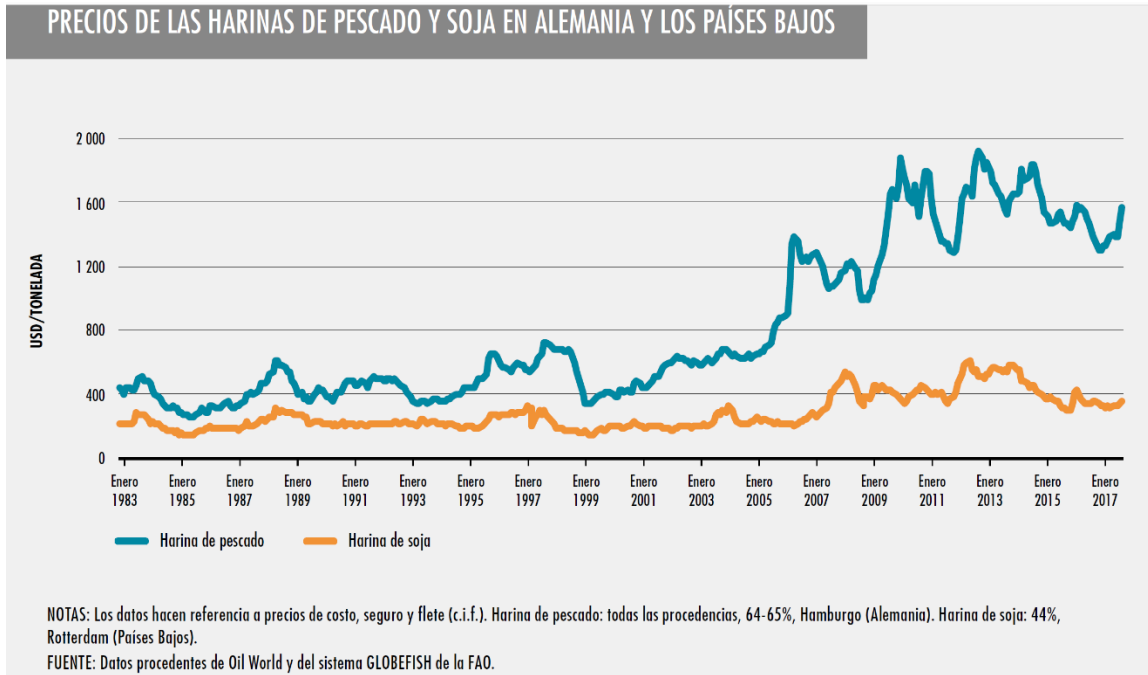


Figura 2. Precio de la harina de pescado durante el período enero 1983 a enero 2017.¹

Por otra parte, los alimentos con un alto contenido de harina de pescado de baja calidad repercuten en la cantidad, composición y calidad de la proteína del alimento generando contaminación, pues al ser de baja digestibilidad y asimilación, produce desechos que contaminan el agua de los estanques y ambiente.⁷⁻¹⁰

2.3 Producción de almeja Catarina, Hacha y Camarón

México ocupa el cuarto lugar en la producción de moluscos bivalvos en América Latina, entre los estados que producen se encuentra Baja California Sur, el cual produce la almeja Catarina *Argopecten ventricosus* y el Hacha *Atrina maura*. Las últimas cifras reportadas oficialmente de producción de Hacha fueron en el 2010 con más de 150 t de callo, pero durante los años de 2004 y 2008 se obtuvo el mayor volumen de captura de Hacha con 280 t,^{23,24} en cuanto a la almeja Catarina el último reporte oficial fue en 2008 con más de 1,500 t de callo, y alcanzó su máximo en 1990 con más de 3,000 t.^{24,25} Estas estadísticas de captura son muy variables en la distribución y abundancia de la especie.²⁴

Por otra parte, la producción de camarón fue de 209,000 t en 2017 de los cuales 8,801 t provienen del estado de Baja California Sur.¹⁹ Es importante mencionar que es la segunda especie más cultivada en el país y que posicionó a México en el séptimo lugar de producción mundial.²⁶

El aprovechamiento de estos subproductos podría generar beneficios importantes al reducir la contaminación ambiental, pues se calcula que todo el desperdicio marino alcanza cifras de más de 32 millones de toneladas al año en todo el mundo.²⁷

Otra ventaja que puede ser de gran importancia en la economía de las poblaciones ribereñas y en la economía nacional, pues se le daría un valor agregado para venderse, cuando actualmente no se les da uso.

Si se elaboran harinas de estos subproductos, pueden ser una opción económicamente recomendable en alimentos formulados para organismos acuáticos en cultivo, ya que ofrecen ventajas como: a) costos bajos para su obtención y transformación a harina, b) no son fuente directa de alimento para el hombre, pueden hidrolizarse para ser utilizados como ingredientes en los alimentos. Además, la harina de camarón tiene un perfil de aminoácidos comparable con la harina de soya o de pescado, contiene una amplia variedad de estimulantes de alimentación o quimio-attractantes y es fuente natural de pigmentos carotenoides y quitina.^{13,28}

Algunos de los usos que tienen los subproductos marinos son la obtención de biodiesel o biogas, productos dietéticos (quitosano), productos farmacéuticos (incluidos los aceites), pigmentos naturales (tras la extracción) y cosméticos (colágeno). También se usan en la alimentación acuícola, ganadera, en animales de compañía, en ensilados y fertilizantes.¹³

2.4 Sustituciones de la harina de pescado

Para sustituir la harina de pescado (HP) en la alimentación de organismos acuáticos, se han evaluado gran cantidad de ingredientes proteicos de diferente origen (**Figura 3**).

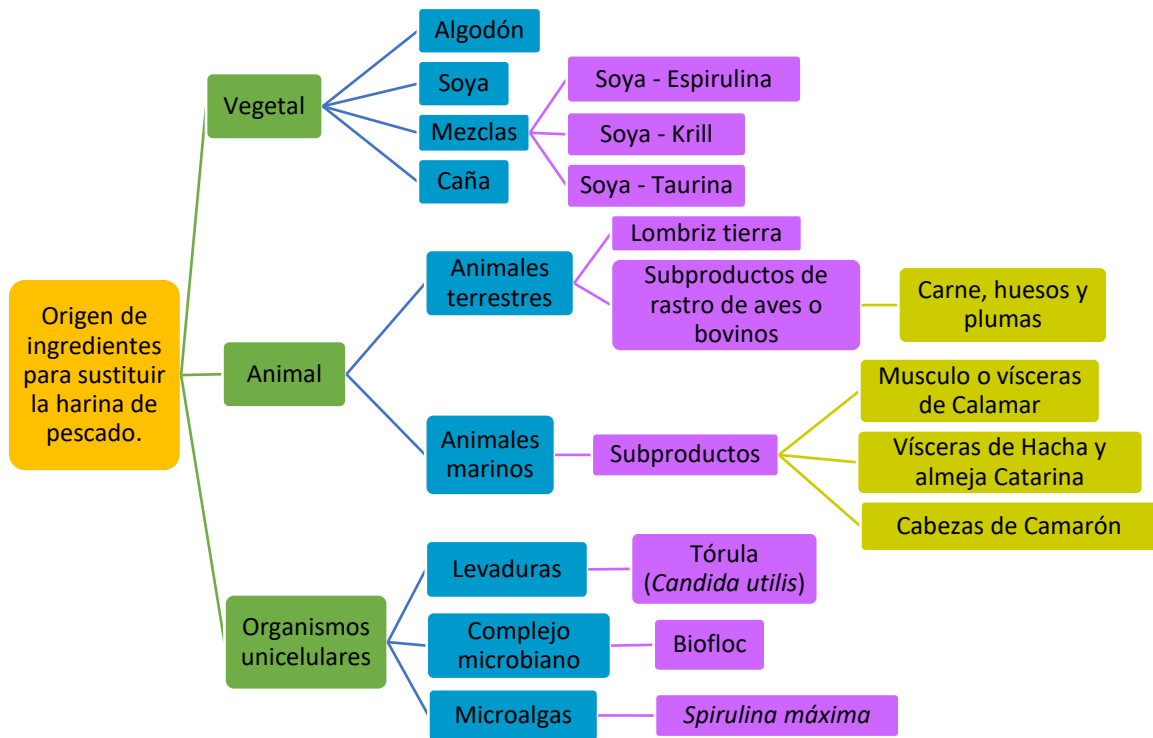


Figura 3. Ejemplos de ingredientes utilizados para sustituir la harina de pescado.

Dentro de los ingredientes de origen vegetal, los más estudiados son los productos a base de soya, Wang *et al.*²⁹ en 2015, evaluó la harina de soya en el pez gato Ussuri *Pseudobagrus ussuriensis*, y no observó un efecto negativo en

el crecimiento al sustituir el 40% de harina de pescado, pero en niveles altos como 60%, sí redujo el desarrollo del pez. Una combinación de krill y soya en una proporción de 1:2.5 fue evaluada en 2013 por Sánchez³⁰ en el pargo *Lutjanus guttatus* sustituyendo 21, 45 y 71% de HP. El crecimiento no se vio afectado, aunque en los resultados de los análisis histológicos en todos los niveles de sustitución, mostraron inflamación en el intestino.

Una combinación de harina de soya con espirulina fue estudiada en Tilapia *Oreochromis mossambicus* y Trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, y aunque se sustituyó el 100% de HP no hubo reducción del crecimiento, ni en los parámetros de respuesta inmune.³¹

Utilizando concentrado proteico de soya suplementado con taurina en alimentos para totoaba *Totoaba macdonaldi* con 30 y 60% de sustitución de HP, no hubo diferencias con respecto a un alimento comercial en términos de crecimiento ponderal; la suplementación de taurina previno una anemia hipocrómica, pero no un proceso inflamatorio.³²

La harina de algodón se ha estudiado en la lubina negra *Centropristis striata* con sustituciones de 50, 75 y 100% de HP, y no se detectaron diferencias significativas en el crecimiento de los organismos. Sin embargo, se observó baja

palatabilidad de los alimentos, presumiblemente debida a la presencia del antinutriente gossipol en la harina de algodón.³³

También la harina de caña se ha evaluado en tilapia roja *Oreochromis* spp., y se puede incluir hasta un 14% en el alimento para no afectar los parámetros productivos.³⁴

El origen del ingrediente proteico puede ser de organismos unicelulares, como las levaduras. Por ejemplo se ha estudiado la tórula *Candida utilis* en tilapia *Oreochromis mossambicus*, pudiendo sustituir hasta máximo un 65% de HP en el alimento para no afectar el crecimiento de los peces.³⁵

Se han evaluado complejos microbianos (biofloc) a un nivel de sustitución del 37% en alimentos para camarón *Litopenaeus vannamei*, y se ha observado que superan al Control en términos de ganancia de peso.³⁶

También se han utilizado microalgas como la *Spirulina máxima* en tilapia *Oreochromis mossambicus* y se ha observado que al 20 y 40% de sustitución de HP, disminuye el crecimiento.³⁵

Otro tipo de ingredientes proteicos son los de origen animal terrestre como la harina de lombriz de tierra *Eisenia foetida*, Torres³⁷ en 2012, la evaluó en trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, con sustituciones de 25, 50 y 75% de HP sin afectar el crecimiento de los peces.

Los ingredientes de origen animal más utilizados en los alimentos son los subproductos de rastro, derivados del procesamiento de carne de aves (carne y hueso, plumas) o carne y hueso de vacas.

Sealey *et al.*³⁸ en 2011, evaluaron la sustitución total de HP con concentrado de pollo, mezcla de proteína de subproductos avícolas y concentrado de pollo y huevo, en alimentos para trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, y no detectaron disminución en el crecimiento, además observaron mejor resistencia a la septicemia por *Flavobacterium psychrophilum*; en cambio, la sustitución del 100% de HP con harinas de subproductos avícolas en alimentos para totoaba *Totoaba macdonaldi* produjo bajo crecimiento e incluso mortandad, debido a un bajo nivel de ácidos grasos esenciales, por lo que se sugiere un máximo de sustitución de 67%.³⁹

Jamil *et al.*⁴⁰ en 2007, evaluaron una mezcla de subproductos de aves y bovinos en el pargo rojo de mangle *Lutjanus argentimaculatus*, donde sustituciones de 50, 75 y 100% mostraron un rendimiento menor de crecimiento comparadas con el tratamiento Control, y solo la sustitución del 23% de HP fue óptima debido a que aumentó el peso de los organismos.

Existen productos y subproductos de origen marino como la harina de músculo o vísceras de Calamar, que han dado óptimos

resultados como fuentes proteicas; Martínez⁴¹ en 1999, sugiere una sustitución máxima de 50% de HP en alimentos para el bagre *Ictalurus punctatus* para evitar mortalidad.

Toyes *et al.*⁴² en 2016, evaluaron la sustitución total de HP con harina de vísceras de Calamar y de Hacha en camarón blanco *Litopenaeus vannamei* obteniendo resultados favorables en cuanto a crecimiento, ingesta de alimento y composición de ácidos grasos altos insaturados en músculo.

También Licona⁴³ en 2015, evaluó la harina de vísceras de Hacha con una sustitución del 100% en la alimentación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* obteniendo resultados superiores en cuanto a los parámetros productivos.

Aparte de la harina de Hacha se ha estudiado la harina de cabezas de camarón café *Farfantepenaeus californiensis* en la alimentación del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en cultivo, como sustitutos totales de HP, obteniendo resultados favorables en cuanto a supervivencia y crecimiento.⁴⁴

También ha sido evaluada en 2015 por Espinosa,²⁸ la harina de cabezas de camarón en la totoaba *Totoaba macdonaldi*, donde la sustitución de 30% de HP mejoró los parámetros productivos.

Se ha utilizado harina de vísceras de almeja Catarina y harina de cabezas de camarón en la alimentación del camarón blanco

Litopenaeus vannamei, con una inclusión del 30%, y los resultados mostraron una alta digestibilidad de proteína que podría ser considerada para la sustitución total de la harina de pescado.⁸ No se han encontrado trabajos de la harina de cabeza de camarón azul *Litopenaeus stylirotris*, en donde sustituyan HP, especie utilizada para efecto de este trabajo.

En cuanto a estudios nutricionales en especies del género *Seriola*, se han evaluado las harinas de concentrado proteico de soya, calamar y alga desgrasada de *Haematococcus pluvialis* en el jurel *Seriola rivoliana*, donde se observó que sustituciones de 20, 40, 60 y 80% de HP en el alimento no afectan de manera significativa el crecimiento, ni alteran la integridad del intestino.⁴⁵

Herrera,⁴⁶ realizó en 2015 un estudio en *Seriola dumerili*, con una sustitución del 66% de la HP utilizando una mezcla vegetal y animal (gluten de trigo, gluten de maíz, krill desengrasado y harina de carne) no afectó el crecimiento, pero sí tuvo efecto negativo en la supervivencia y eficiencia alimentaria. En cambio, Gallardo⁴⁷ en 2015, utilizando las mismas mezclas en la misma especie, con una sustitución del 100%, no tuvo éxito, debido a un perfil aminoacídico subóptimo y una menor digestibilidad, que provocaron mortalidad elevada a largo plazo. Sin embargo, al 66% de sustitución, se obtuvieron

resultados óptimos en el perfil de aminoácidos, así como en crecimiento y supervivencia. También se ha evaluado el uso de pasta de soya (no modificada genéticamente) en sustituciones de 40, 50 y 60% en alimentos para el jurel *Seriola lalandi*, demostrando un mayor rendimiento de los peces sin ocasionar enteritis.¹²

Las harinas de vísceras de almeja Catarina, vísceras de Hacha y cabezas de camarón, han demostrado tener favorablemente una composición química que nutre a organismos acuáticos, y si bien su valor nutricional para camarón ya ha sido evaluado, no se conoce su valor nutricional como sustitutos parciales de la harina de pescado en alimentos para peces marinos, y en particular para el jurel *Seriola rivoliana*, objeto del presente trabajo.

3 HIPOTESIS

La sustitución parcial (25%) de harina de sardina por harinas de cabezas de camarón, vísceras de almeja Catarina y Hacha repercutirá en los parámetros productivos, hematológicos e histológicos de los juveniles de jurel *Seriola rivoliana*.

4 OBJETIVO

4.1 General

Determinar el valor nutrimental de harinas de subproductos marinos (cabezas de camarón azul, vísceras de almeja Catarina y vísceras de Hacha) como sustitutos parciales de harina de sardina en alimento de juveniles de jurel *Seriola rivoliana* cultivados en condiciones de laboratorio.

4.2 Específicos

1. Determinar el efecto de la sustitución parcial de harina de sardina por harinas de subproductos marinos: cabezas de camarón azul *Litopenaeus stylirostris*, vísceras de almeja Catarina *Argopecten ventricosus* y vísceras de Hacha *Atrina maura* en el alimento, sobre parámetros productivos como supervivencia, ganancia de peso, tasa de crecimiento específica (TCE), alimento consumido (AC), factor de conversión alimenticia (FCA) y tasa de eficiencia proteica (PER) en juveniles de jurel *Seriola rivoliana* cultivados en condiciones de laboratorio.

2. Conocer el efecto de la sustitución parcial de harina de sardina por harinas de subproductos marinos en el alimento, sobre biometría hemática y bioquímica sanguínea en jureles juveniles.

3. Conocer el efecto de la sustitución parcial de harina de sardina por harinas de subproductos marinos en el alimento sobre la histología del hígado e intestino de jureles juveniles.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se desarrolló en el laboratorio Húmedo de Nutrición Acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), La Paz, Baja California Sur.

5.1 Obtención de materia prima y procesamiento de harinas

Las vísceras de almeja Catarina *Argopecten ventricosus*, de Hacha *Atrina maura* y cabezas de camarón azul *Litopenaeus stylirostris*, se obtuvieron de pescaderías locales en el Puerto San Carlos y Puerto Cancún en Baja California Sur, México. Las materias primas obtenidas fueron colocadas en bolsas de plástico con hielo para transportarlas al CIBNOR, donde fueron almacenadas en un congelador a -18°C hasta su procesamiento.

Las harinas de subproductos se elaboraron en la Planta de Alimentos del CIBNOR siguiendo el método descrito en 2016 por Toyas *et al.*,⁴² mismo que consistió en descongelar las materias primas a temperatura ambiente durante 12 h. Posteriormente, se hicieron lotes de 2 kg, y se sumergieron en agua hirviendo durante 10 minutos dentro de una olla de acero inoxidable con capacidad de 80 L. Los subproductos cocidos se escurrieron, se dejaron enfriar a temperatura ambiente, y se trituraron en un

molino de carne de $\frac{3}{4}$ HP (TOR-REY®, Monterrey, NL, México), para luego colocarlos (extenderlos) en bandejas de plástico con tapetes de silicón, y secaron a 60°C durante 24 h en un horno con ventilación de flujo horizontal (VWR International®, modelo 1680, Cornelius, Oregón, EUA). Una vez secos los productos, se tritularon en un molino de café (KRUPS® GX10011, Écully, Francia), se tamizaron a 500 µm, y se almacenaron en bolsas de plástico bajo refrigeración (4°C) hasta su utilización.

5.2 Composición química proximal y de energía

Previamente se determinó por triplicado la composición química proximal y de energía en las harinas de las materias primas (**Cuadro 1**) y después en los alimentos ya fabricados (**Cuadro 2**), siguiendo las metodologías de la AOAC.⁴⁸ La humedad (método 925.45) se determinó en una estufa de secado (Terlab®, Zapopan, Jalisco, México) a 70°C durante 24 h. La cuantificación de cenizas o minerales (método 942.05), fue por incineración de las muestras en una mufla (Thermolyne 6000®, Waltham, Massachusetts, EUA) a 550°C durante 6 h. El análisis de proteína cruda se realizó por el método de DUMAS (método 990.03), con un equipo analizador de Nitrógeno/Proteína (Leco FP-528®, St. Joseph, Michigan, EUA). La cuantificación de extracto etéreo (método 2003.05) se realizó usando un sistema

de auto extracción (Soxtec AVANTI 2050®, Foss Tecator, Höganäs, Suiza) usando éter de petróleo como solvente extractor. Para determinar la fibra cruda (método 978.10), se realizó una hidrólisis ácido-básica con ácido sulfúrico e hidróxido de sodio en un digestor (Fiber Tec M6 Tecator, Höganäs, Suiza) equipado con una unidad de extracción caliente (modelo 1020, Foss Tecator, Höganäs, Suiza) y una unidad de extracción fría (modelo 1021, Foss Tecator, Höganäs, Suiza). Se calculó el extracto libre de nitrógeno (ELN) a partir de la diferencia entre 100% y la suma de las determinaciones de cenizas, proteína cruda, extracto etéreo y fibra cruda. La determinación de energía bruta se hizo usando un calorímetro adiabático (PARR1261®, Moline, Illinois, EUA).

Cuadro 1. Composición química proximal (g/100g de materia seca, excepto humedad) y de energía bruta de las harinas de vísceras de almeja Catarina, de Hacha y cabezas de camarón azul.

Composición proximal	Harinas					
	Harina de pescado ^a	Concentrado proteico de soja	Harina de trigo	Harina de cabezas de camarón	Harina de vísceras de almeja Catarina	Harina de vísceras de Hacha
Materia seca	93.94 ±0.7	92.27 ±1.3	88.09 ±0.9	92.35 ±1.2	94.72 ±0.3	90.69 ±0.9
Proteína cruda	69.93 ±0.4	58.31 ±0.8	12.93 ±0.1	54.34 ±1.1	57.78 ±1.7	51.96 ±0.9
Extracto etéreo	6.12 ±0.3	1.12 ±0.5	1.06 ±0.4	7.29 ±1.2	14.46 ±1.9	13.81 ±1.4
Fibra cruda	0.22 ±0.5	3.16 ±2.3	0.12 ±0.5	7.54 ±0.6	0.22 ±0.6	1.5 ±0.5
Cenizas	16.17 ±0.2	3.13 ±0.3	0.58 ±0.3	18.65 ±0.9	8.61 ±0.3	7.65 ±0.5
ELN	1.5 ±0.1	26.54 ±1.8	73.4 ±0.9	4.53 ±1.9	13.65 ±2.2	17.12 ±1.6
Energía Cal/g	4,421 ±0.1	4,373 ±0.1	3,704 ±0.1	3,991 ±0.1	5,138 ±0.1	4,708 ±0.1

Valores promedios de tres réplicas por tratamiento ± desviación estándar. ^a Sardina Monterey. Extracto libre de nitrógeno (ELN) = 100% - (%humedad + %proteína cruda + %lípidos + %ceniza + %fibra cruda).

Cuadro 2. Composición química proximal (g/100g de materia seca) y energía bruta de los alimentos experimentales elaborados para el bioensayo de crecimiento con jurel *Seriola rivoliana*.

Composición proximal ¹	Alimentos				
	Control	Cabezas camarón	Vísceras Catarina	Vísceras Hacha	Triple
Materia seca	90.7 ±0.1	94.7 ±0.1	94.4 ±0.2	94.7 ±0.1	93.3 ±0.2
Proteína	49.1 ±0.3	48.9 ±0.2	49.1 ±0.2	49.3 ±0.1	50.5 ±0.1
Extracto etéreo	12.2 ±0.1	12.4 ±0.1	13.6 ±0.2	13.7 ±0.1	12.9 ±0.1
Fibra cruda	1.7 ±0.1	2.5 ±0.1	1.3 ±0.2	1.3 ±0.1	2.3 ±0.1
Cenizas	9.5 ±0.1	10.7 ±0.1	9.3 ±0.1	9.1 ±0.1	10.2 ±0.1
ELN ²	18.2 ±0.1	20.2 ±0.1	21.2 ±0.2	21.3 ±0.1	17.4 ±0.1
Energía (cal/g)	4,609 ±6.3	4,712 ±7.3	4,787 ±8.0	4,833 ±2.2	4,707 ±2.4

¹Valores promedios de tres réplicas por tratamiento ± desviación estándar.

²Extracto libre de nitrógeno = 100% - (% proteína cruda + % extracto etéreo + % fibra cruda + %ceniza).

5.3 Formulación y fabricación de los alimentos experimentales

Los alimentos fueron formulados usando el Programa Nutrion^{MR} (Chapala, Jalisco, México)⁴⁹ basándose en la composición química proximal y energía bruta de los ingredientes experimentales procurando cubrir los requerimientos nutricionales conocidos del jurel.

Los alimentos se elaboraron en la Planta de Alimentos del CIBNOR siguiendo el método propuesto en 1989 por Civera y Guillaume.⁵⁰ Los macro-ingredientes secos (harina de pescado, concentrado proteico de soya y harina de trigo) se molieron en un pulverizador (PULVEX, D.F, México.) y después fueron tamizados a través de una malla de 0.5 mm. Paralelamente, los micro-ingredientes (ácido algínico, premezclas vitamínicas y minerales, fosfato sódico dibásico, cloruro de colina, vitamina C y BHT) se mezclaron inicialmente de forma manual en un recipiente de plástico, y posteriormente en una mezcladora vertical con capacidad de 1.5 L (Kitche-Aid, D.F, México.) durante 5 min, y luego se incorporaron a los macro-ingredientes. Los ingredientes secos se revolvieron durante 10 min en una mezcladora vertical con capacidad de 20 L (Hobart, D.F, México.), y al compuesto obtenido se le añadió lecitina de soya líquida y aceite de pescado. Una vez que la lecitina y

el aceite quedaron homogeneizados, se añadió agua a la mezcla (aproximadamente 40% del peso total del alimento) y se revolvió durante 10 min. La mezcla resultante se pasó dos veces por un molino de carne de 3 HP (TOR-REY®, Monterrey, NL, México) equipado con un dado de 3 mm de diámetro y los espaguetis formados se cortaron con la ayuda de una espátula para obtener pellets de aproximadamente 1 cm de longitud. Los pellets se secaron en el horno con ventilación de flujo horizontal (VWR International®, modelo 1680, Cornelius, Oregón, EUA) a 45°C durante aproximadamente 12 h, hasta que el contenido de humedad fuera de 8-10%, el cual fue medido en una termobalanza (OHAUS®, modelo MB120, Parsippany, Nueva Jersey, EUA) y posteriormente se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Se fabricaron 5 alimentos balanceados experimentales isocalóricos e isoproteicos (**Cuadro 3**): un alimento control (50% de proteína) que incluía harina de pescado; tres alimentos conteniendo 12.5% de harina de cabezas de camarón azul, vísceras de almeja Catarina y vísceras de Hacha, respectivamente (sustituyendo el 25% de la harina de pescado), y un alimento que contenía los tres ingredientes experimentales al 12.5%.

Cuadro 3. Composición en ingredientes (g/100g de materia fresca) de los alimentos experimentales elaborados para el bioensayo de crecimiento con jurel *Seriola rivoliana*.

Ingredientes	Alimentos				
	Control	Cabezas camarón	Visceras Catarina	Visceras Hacha	Triple
Harina Pescado (Ensenada) ¹	50.00	37.50	37.50	37.50	21.98
Harina cabeza de camarón azul ²	-	12.50	-	-	12.50
Harina vísceras de Catarina ²	-	-	12.50	-	12.50
Harina vísceras de Hacha ²	-	-	-	12.50	12.50
Harina Integral de Trigo ³	11.38	11.38	11.38	11.38	4.65
Concentrado proteico de soya ⁴	23.17	23.17	23.17	23.17	23.11
Aceite de hígado de bacalao ⁵	7.86	7.86	7.86	7.86	5.18
Ácido alginico ⁶	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Lecitina de soya ⁷	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Premezcla de vitaminas ⁸	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70
Premezcla de minerales ⁹	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Cloruro de colina ¹⁰	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Vitamina C ¹¹	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Betaina monohidratada ¹²	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
β-Caroteno ¹²	0.080	0.080	0.080	0.080	0.080
Antioxidante BHT ¹³	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005

¹Sardina Monterrey entera, Conservera San Carlos, Puerto San Carlos, B.C.S., México.

²Elaboradas en el Laboratorio de Nutrición Acuicola, CIBNOR. ³Central de Abastos de La Paz, B.C.S., México. ⁴Promotora Industrial Acuasistemas, S.A. de C.V. La Paz, B.C.S., México. ⁵Droguería cosmopolita, S.A. de C.V. México, D.F., México. ⁶Sigma-Aldrich 180947-05031-1, St. Louis, MO, EUA. ⁷Restaurant vegetariano Rey Sol, La Paz, B.C.S., México. ⁸Premezcla de vitaminas (mg o UI/kg alimento): Acetato de vitamina A, 15000 UI; D3, 7500 UI; E, 400 mg; K₃, 20 mg; Tiamina monohidrato, 150 mg; riboflavina, 100 mg; piridoxina HCl, 50 mg; ácido pantoténico, 100 mg; niacina, 300 mg; biotina, 1 mg; inositol, 500 mg; ácido fólico, 20 mg; cianocobalamina, 0.1 mg. ⁹Premezcla de minerales (g/kg alimento): MgSO₄·7H₂O, 0.5; ZnSO₄·7H₂O, 0.09; KCl, 0.5; MnCl₂·4H₂O, 0.0234; CuCl₂·2H₂O, 0.005; KI, 0.5; CoCl₂·6H₂O, 0.0025. ¹⁰62% agente activo, ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH, EUA. ¹¹Stay-C, 35% agente activo, ROCHE, D. F., México. ¹²Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA. ¹³Butil-hidroxi-tolueno, ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH. EUA.

5.4 Sistema experimental

Se utilizaron 15 estanques redondos de fibra de vidrio con capacidad de 600 L c/u, abastecidos de agua de mar depurada a través de filtros de arena (70 µm), de cartucho (10 y 5 µm) y luz ultravioleta. Cada estanque estaba equipado con 2 piedras

difusoras de aire, alimentadas por un soplador de 5 HP, dos calentadores sumergibles de 250 W y malla tipo mosquitero para evitar la fuga de organismos. Durante todo el experimento se mantuvo flujo de agua continuo (5 L/min) y un fotoperiodo de 12 h luz: 12 h oscuridad (fotofase 6:00-18:00 h) el cual se mantuvo, por medio de tubos de neón de 28 W, para una intensidad de ~490 Lux en la superficie del agua de los estanques.

5.5 Diseño experimental

5.5.1 Organismos

Se utilizaron 150 juveniles de jurel *Seriola rivoliana* producidos en el CIBNOR. Los huevos fertilizados se obtuvieron mediante el desove espontáneo de esta especie mantenida bajo condiciones controladas en las instalaciones de la empresa Kampachi Farms, en el campus La Paz del CIBNOR.

Los juveniles con peso promedio inicial de 48 ± 0.6 g fueron distribuidos al azar en 15 estanques a una densidad de siembra de 10 peces/estanque.

5.5.2 Bioensayo de crecimiento

Se realizó un bioensayo de crecimiento para evaluar por triplicado (3 estanques/tratamiento) los cinco alimentos experimentales descritos anteriormente.

La alimentación de los organismos se realizó tres veces al día (08:00, 12:30 y 15:30 h) empleando la técnica de boleo a saciedad aparente.

El bioensayo de crecimiento tuvo una duración de 60 días, durante los cuales, diariamente se sifoneó la materia orgánica del fondo de los estanques y se determinaron, dos veces al día (08:00 y 16:00 h), las variables fisicoquímicas de la calidad de agua como oxígeno disuelto (5.3 ± 1.98 mg/L), temperatura (29.1 ± 1.0 °C) y salinidad (36.0 ± 0.5 g/L), utilizando un medidor multiparamétrico marca YSI modelo 556 MPS (Yellow Springs, Ohio, EUA).

La ingesta de alimento y mortalidad de peces se registró diariamente y se realizó morfometrías quincenalmente para evaluar el crecimiento. Para ello, previamente se anestesiaban los peces con aceite de clavo a dosis de 0.03 mL/L de agua de mar, y posteriormente se eliminaba el exceso de humedad por medio de toallas (Scott® Shop Towels, Roswell, Georgia, EUA). Los peces se pesaban en una balanza analítica con precisión de

±0.1 g (OHAUS Scout® Pro600, Parsippany, Nueva Jersey, EUA) y se medía la longitud total con un ictiómetro (Pentair Aquatic Eco-Systems™, Inc. Apopka, Florida, EUA).

5.6 Parámetros productivos

Se determinaron parámetros productivos como supervivencia, ganancia de peso, tasa de crecimiento específica, alimento consumido, factor de conversión alimenticia, tasa de eficiencia proteica y factor de condición, mismos que se calcularon usando las siguientes fórmulas:

Supervivencia (%)

$$S = \frac{\text{número final de peces}}{\text{número inicial de peces}} \times 100$$

Ganancia de peso:

$$GP = \text{peso promedio final (g)} - \text{peso promedio inicial (g)}$$

Tasa de crecimiento específica (%/día):

$$TCE = \frac{\ln \text{ peso final (g)} - \ln \text{ peso inicial (g)}}{\text{Número de días}} \times 100$$

Alimento Consumido:

$$AC = \frac{\text{Total de alimento consumido (g) / Número de peces}}{\text{Número de días}}$$

Factor de conversión alimenticia:

$$FCA = \text{alimento consumido (g)} / \text{peso ganado (g)}$$

Tasa de eficiencia proteica:

$$EP = \text{incremento en peso (g)} / \text{proteína consumida (g)}$$

Factor de condición (al iniciar y finalizar el experimento)

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

5.7 Análisis hematológicos

5.7.1 Bioquímica sanguínea

Al finalizar el bioensayo se dejó a todos los organismos en ayuno durante 24 h, y se utilizaron dos peces de cada estanque (6/tratamiento) para realizar un muestreo de sangre mediante punción cardiaca para colectar 1 ml de sangre, utilizando jeringas de insulina sin anticoagulante (BD Plastipack®, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México). Cada muestra se dividió en dos, colocando 0.5 ml en un tubo de recolección con gel separador sin anticoagulante (BD Vacutainer®, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México), y se centrifugó por 10 min a 2,500 rpm para separar plasma del suero. El suero se almacenó a 4°C para análisis de proteína total, glucosa, colesterol,

triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad (LMBD), los cuales se realizaron en un laboratorio de análisis clínicos utilizando un sistema analítico Selectra ProS 176 (ELITechGroup, Logan, Utah, EUA.), el cual trabaja mediante espectrofotometría automatizada. La otra mitad de la sangre extraída fue utilizada para realizar biometría hemática.

5.7.2 Biometría hemática

Se utilizaron 0.5 ml de sangre y se colocaron en tubos Eppendorf con K2 EDTA (BD Microtainer, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EUA) para evitar la coagulación. En un laboratorio de análisis clínicos midieron eritrocitos, hematocrito, hemoglobina, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), recuento de plaquetas, volumen plaquetario medio (VPM), plaquetocrito y la anchura de distribución de plaquetas (ADP), mediante un analizador de hematología COULTER® AC • T 5diff (Beckman Coulter Inc., Carlsberg, California, EUA), que trabaja por citoquímica de absorbancia y volumen.

5.7.3 Cuantificación de leucocitos

Para hacer un conteo diferencial de leucocitos se realizaron frotis sanguíneos mediante la técnica de cuña. Esta técnica requiere el uso de dos portaobjetos limpios con bordes biselados: uno como soporte del frotis de sangre y el otro como portaobjetos extensor. En un extremo del portaobjetos se coloca una gota de sangre sin coagular y se debe sostener con firmeza el portaobjetos extensor frente a la gota de sangre en un ángulo de 45° grados sobre el portaobjetos en el que se va a realizar el frotis; el extensor se desliza hacia atrás, en contacto con la gota, manteniendo esa posición hasta que la sangre se esparce por capilaridad en toda la superficie de contacto entre los portaobjetos. Es entonces cuando, el extensor se desliza con rapidez y suavidad hasta el extremo libre del portaobjetos.⁵¹

Se tiñeron los frotis con la tinción de Wright (**Anexo 1**). Se observaron en el microscopio con un objetivo de inmersión (100x). Se prosiguió a realizar un conteo diferencial de 100 células de la línea blanca por cada frotis, en diferentes campos haciendo un recorrido vertical en zig-zag. Conforme a sus características morfológicas se identificarón heterófilos, linfocitos y monocitos, además de trombocitos,

los cuales se contaron solo en 5 campos empleando la siguiente fórmula:⁵²

$$\text{Trombocitos } 10^9/\text{L} = (\text{no. total de trombocitos}/5 \text{ campos}) \times 3.5$$

Donde 3.5 corresponde a 3'500,000 de eritrocitos promedio por μl .⁵²

5.8 Análisis histológicos

Después de coleccionar las muestras de sangre, se prosiguió a eutanasiar a los peces por medio del método de percusión, en base al código sanitario para los animales acuáticos de la Organización Mundial de Sanidad Animal.⁵³ Posteriormente, sobre un bloque de hielo, se hicieron disecciones de hígado e intestino (2 pez/estanque; 6/tratamiento), se colocaron las muestras dentro de cassettes de plástico con su respectiva etiqueta, y se sumergieron en solución Davidson, manteniendo una relación de fijador-muestra 3:1 (**Anexo 2**).

Los tejidos histológicos se llevaron al Laboratorio de Histología e Histoquímica del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), donde se les realizó la técnica de inclusión en parafina (**Anexo 3**), utilizando un sistema de inclusión de parafina (Histo embedder Leica,

Heidelberger, Nussloch, Alemania) creando un bloque por cada tejido de hígado e intestino, obteniendo en total 60 bloques.

Una vez concluida la inclusión, se hicieron en total 90 cortes histológicos (un corte por cada tejido de hígado y dos cortes por cada tejido de intestino, por cada pez) con la ayuda de un micrótopo de rotación a 4 μm (Leica RM 2155, Heidelberger, Nussloch, Alemania) y las muestras se colocaron en portaobjetos. Posteriormente, se aplicaron dos diferentes técnicas de tinción. La primera fue la tinción de hematoxilina eosina de Harris (**Anexo 4**) en 30 cortes de hígado y 30 cortes de intestino por pez, para evaluar la cantidad de lípidos y la altura de los enterocitos respectivamente y la segunda fue la tinción de azul alciano-Schiff (**Anexo 5**) en los 30 cortes restantes de intestino por pez. Este último método de tinción tiñe de color magenta los mucopolisacáridos neutros y de color azul los mucopolisacáridos ácidos.

Las tinciones se hicieron utilizando un teñidor automático (Leica ST5020, Heidelberger, Nussloch, Alemania). Después de teñir todas las laminillas se montaron con un cubreobjetos con resina sintética.

A las 90 laminillas se les observó sus características histológicas en un microscopio compuesto (Olympus BX41, Miami, Florida, EUA), con el objetivo de 40x y se tomaron 5 fotos

distribuidas al azar a lo largo del tejido por cada laminilla, con una cámara digital acoplada (CoolSNAP-Pro, Silver Spring, Maryland, EUA).

5.8.1 Cuantificación de lípidos en hígado

Para evaluar la cantidad de lípidos presentes en el hígado, se evaluó un total de 150 imágenes (30 imágenes por cada tratamiento), con el objetivo de 40x y con ayuda del software analizador de imágenes digitales Image-Pro Plus®⁵⁴ (v.6.0, Rockville, Maryland, EUA) el cual mide el área de cobertura en pixeles por μm^2 , se calculó el área de cobertura de lípidos en el tejido (**Figura 4**).

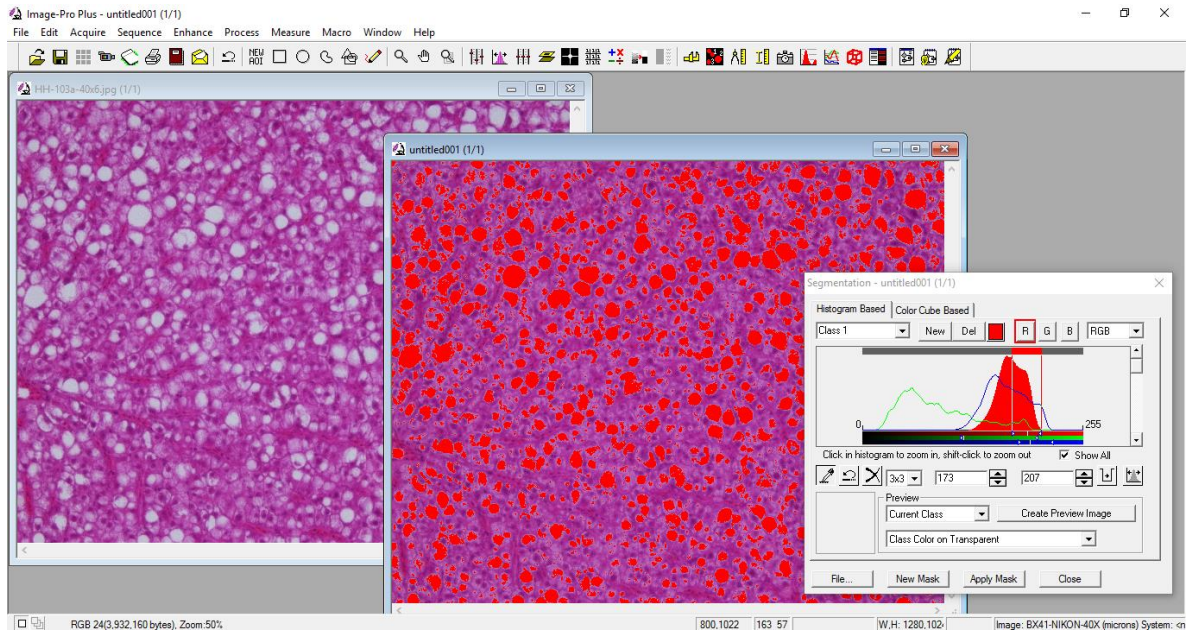


Figura 4. Lípidos en hígado evaluados con el software Image-Pro Plus utilizando corte histológicos de hígado de juveniles de jurel *Seriola rivoliana*, después de 60 días de consumir alimentos con harinas de subproductos marinos.

Para calcular el índice de lípidos en hígado se empleó la siguiente fórmula:

$$IEH = \frac{\text{Área de cobertura de gotas lipídicas}}{\text{Área total de imagen de 40x}} \times 100$$

Donde el área total de imagen con aumento 40x es 71,552.4 μm^2

5.8.2 Cuantificación de mucinas ácidas y neutras en intestino

Para evaluar la cantidad de mucinas ácidas y neutras presentes en el intestino, se evaluó un total de 150 imágenes (30 imágenes por cada tratamiento), con el objetivo de 40x, y con ayuda del software Image-Pro Plus®⁵⁴ (v.6.0, Rockville, Maryland, EUA) se calculó el área de cobertura en pixeles por μm^2 de mucinas ácidas y neutras en el tejido de intestino (**Figura 5**).

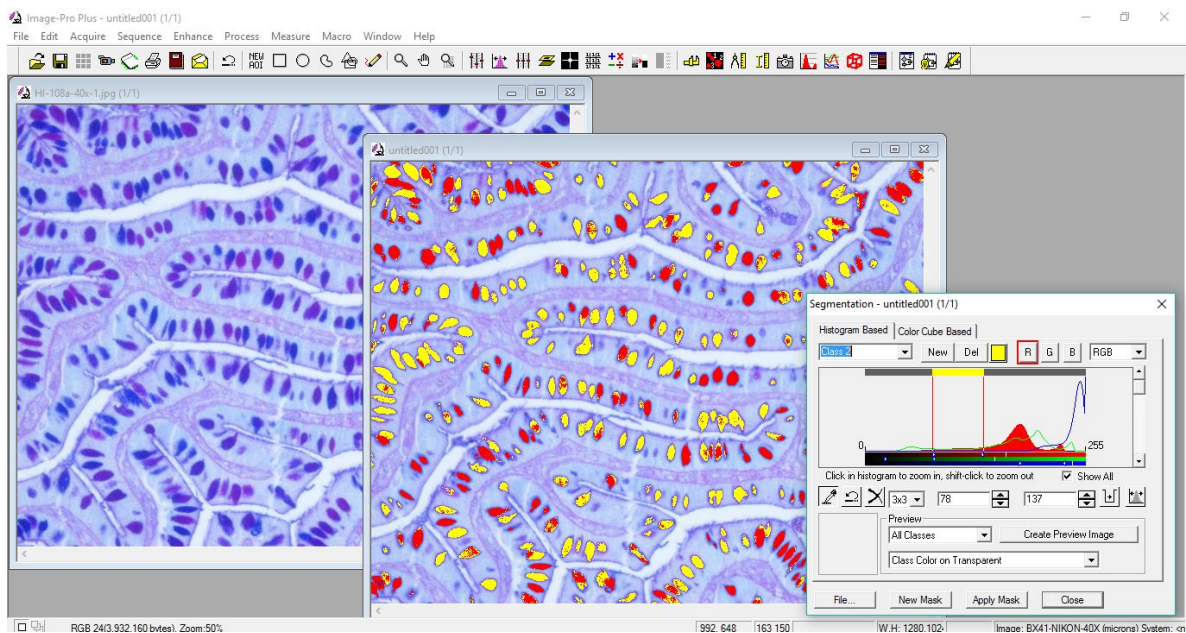


Figura 5. Mucinas ácidas (indicadas en rojo) y neutras (indicadas en amarillo), en intestino, evaluadas en el software Image-Pro Plus, utilizando cortes histológicos de intestino de juveniles de jurel *Seriola rivoliana*, después de 60 días de consumir alimentos con harinas de subproductos marinos.

Para calcular el índice de mucinas ácidas y neutras se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{IMA} = \frac{\text{Área de cobertura de mucinas ácidas}}{\text{Área total de imagen 40x}} \times 100$$

$$\text{IMN} = \frac{\text{Área de cobertura de mucinas neutras}}{\text{Área total de imagen 40x}} \times 100$$

Donde el área total de imagen con aumento de 40x es 71,552.4 μm^2

5.8.3 Medición de enterocitos

Para evaluar la longitud de los enterocitos en el intestino, se evaluó 150 imágenes (30 imágenes por cada tratamiento) con un total de 4,500 mediciones de enterocitos (30 mediciones por cada imagen), con ayuda del software SigmaScan-Pro5®⁵⁵ (San José, California, EUA), que mide la longitud en micras lineales que tiene cada enterocito (**Figura 6**).

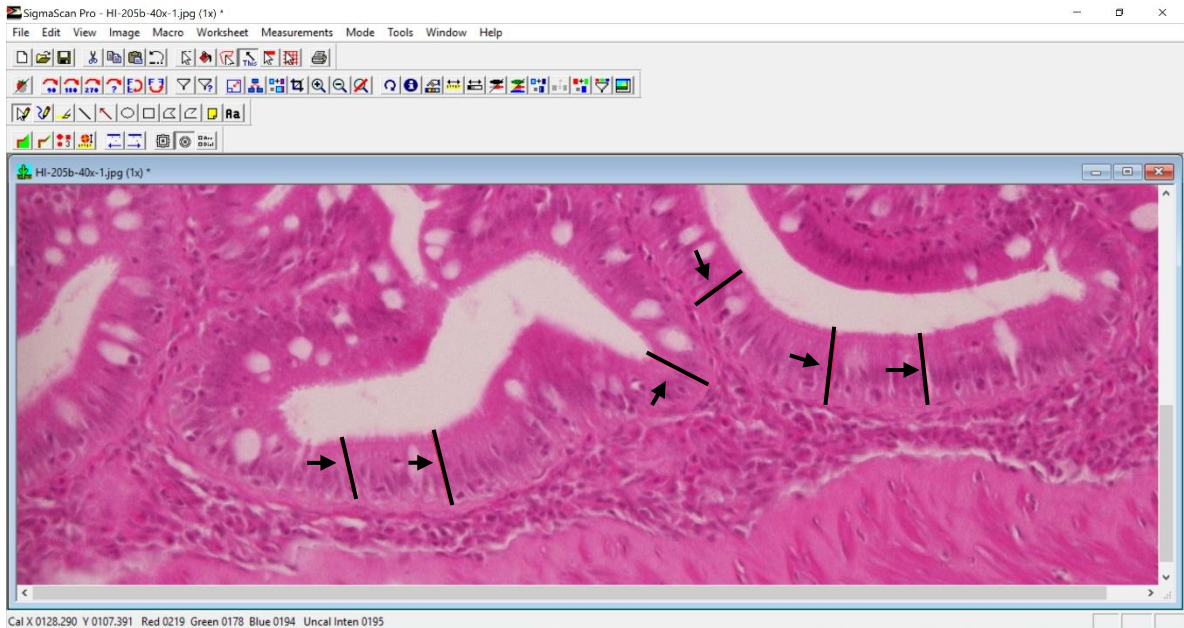


Figura 6. Altura de enterocitos en intestino evaluadas en el software SigmaScan-Pro5, utilizando cortes histológicos de intestino de juveniles de jurel *Seriola rivoliana*, después de 60 días de consumir alimentos con harinas de subproductos marinos.

5.9 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de los datos se realizaron en el software STATISTICA® 8.0⁵⁶ (Stat Soft, Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA.). Las series de datos se analizaron para verificar normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), con el fin de determinar si existían diferencias significativas entre tratamientos y se empleó una prueba de comparación múltiple de medias (Tukey) para determinar los grupos homogéneos. Los datos

que no cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad, se les aplicó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Las variables expresadas en porcentaje como supervivencia, tasa de crecimiento específica (TCE), hematocrito, concentraciones de plaquetas (CP), anchura de distribución de plaquetas (PDW), índice de lípidos en hígado, mucinas ácidas y neutras, fueron transformados al arco-seno antes de efectuar las pruebas estadísticas. Para todas las pruebas, el valor de significancia se estableció en $P < 0.05$.

6 RESULTADOS

6.1 Composición química proximal y de energía

6.1.1 Composición química proximal y de energía de las harinas de subproductos marinos

El contenido de proteína más alto fue el de la harina de pescado (69.93%) y el más bajo el de la harina de subproductos de Hacha (51.96%). El extracto etéreo fue alto en la harina de Catarina (14.46%) y bajo en Hacha (13.81%). El contenido de fibra cruda fue mayor en la harina de cabezas de camarón (7.54%), mientras que en las harinas de subproductos no superaron 2%. El mayor contenido de cenizas se encontró en la harina de cabezas de camarón (18.65%), y el menor en la harina de vísceras de Hacha (7.65%). El extracto libre de nitrógeno de la harina de vísceras de Hacha fue el mayor (17.12%), mientras que el de la harina de cabezas de camarón fue el menor (4.53%).

6.1.2 Composición química proximal y de energía de los alimentos

Los alimentos que se elaboraron presentaron un contenido proteico muy similar de 48.9 a 50.5%. De igual forma en el contenido de energía tuvieron valores muy similares de 4,609 a

4,833 cal/g. El contenido de extracto etéreo fue similar entre los alimentos, con valores de 12.2 a 13.7%.

6.2 Parámetros productivos

En el **Cuadro 4** se muestran los resultados productivos a los 60 días de experimentación. La supervivencia de los juveniles de jurel con los diferentes tratamientos fue de 97-100%, a excepción de los peces del tratamiento Catarina que tuvo una supervivencia promedio de 90%. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos. Los alimentos con Camarón y Hacha hicieron que incrementara de manera significativa el crecimiento de los jureles con respecto a los demás tratamientos, obteniéndose los mayores pesos promedio (328.9 g y 365.1 g), así como longitud total final (26.7 cm y 28.3 cm), mayores ganancias en peso (4.7 g y 5.3 g) y tasas de crecimiento específico (3.2% /d y 3.4% /d) respectivamente, mientras que los alimentos Catarina y Triple produjeron los menores pesos, alcanzando solo 95.2 g y 117.1 g, así como la longitud total final (18.9 cm y 21 cm), menores ganancias en peso (0.8 g y 1.2 g) y tasas de crecimiento específico (1.1% /d y 1.5% /d).

El consumo de alimento fue significativamente mayor con los alimentos Camarón y Hacha (6.8 y 7.0 g/pez/día) que con el

Control 5.1 g/pez/día) y los alimentos Catarina y Triple (1.6 y 2.0 g/pez/día). El factor de conversión alimenticia fue mayor en los peces alimentados con Catarina (2.1), seguido por Triple (1.8), después Camarón (1.5), Control (1.4) y Hacha (1.3). Los FCA de los tratamientos Catarina y Triple no difirieron significativamente entre sí, mientras que el de Catarina fue significativamente mayor al de Hacha, Camarón y Control, sin que estos últimos difirieran del Triple.

Las tasas de eficiencia proteica en los peces alimentados con los tratamientos Hacha (1.5), Control (1.4) y Camarón (1.4), fueron significativamente mayores a los de los tratamientos Triple (1.1) y Catarina (1.0), que no difirieron entre sí. También con el factor de condición final en los peces alimentados con los tratamientos Control (1.82%), Camarón (1.76%) y Hacha (1.65%) fueron significativamente mayores a Catarina y Triple pero no fueron significativamente diferentes al factor de condición inicial (1.58%), pero sí lo fueron para Catarina (1.26%) y Triple (1.25%).

Cuadro 4. Parámetros productivos y de utilización del alimento de juveniles de jurel *Seriola rivoliana*, después de 60 días de consumir alimentos con harinas de subproductos marinos.

Parámetros zootécnicos	Alimentos				
	Control	Camarón	Catarina	Hacha	Triple
PI (g)	48.1 ^a ±0.9	48.2 ^a ±0.6	47.8 ^a ±0.6	48.2 ^a ±0.7	48.1 ^a ±0.5
PF (g)	258.9 ^b ±13.9	328.9 ^a ±18.5	95.2 ^c ±5.2	365.1 ^a ±29.8	117.1 ^c ±5.0
LTI (cm)	14.2 ^a ±0.1	14.2 ^a ±0.1	14.1 ^a ±0.1	14.2 ^a ±0.1	14.2 ^a ±0.1
LTF (cm)	24.7 ^b ±0.4	26.7 ^a ±0.4	18.9 ^d ±1.3	28.3 ^a ±0.7	21.0 ^c ±0.3
S (%)	100.0 ^a ±0.0	96.7 ^a ±5.8	90.0 ^a ±17.3	100.0 ^a ±0.0	100.0 ^a ±0.0
GP (g/día)	3.5 ^b ±0.23	4.7 ^a ±0.32	0.8 ^c ±0.08	5.3 ^a ±0.51	1.2 ^c ±0.08
TCE (%/día)	2.8 ^b ±0.10	3.2 ^a ±0.11	1.1 ^d ±0.07	3.4 ^a ±0.16	1.5 ^c ±0.07
AC (g/pez/día)	5.1 ^b ±0.13	6.8 ^a ±0.47	1.6 ^c ±0.14	7.0 ^a ±0.47	2.0 ^c ±0.09
FCA	1.4 ^b ±0.06	1.5 ^b ±0.04	2.1 ^a ±0.39	1.3 ^b ±0.04	1.8 ^{ab} ±0.06
EP	1.4 ^a ±0.06	1.4 ^a ±0.04	1.0 ^b ±0.17	1.5 ^a ±0.04	1.1 ^b ±0.04
FCI	1.67 ^a ±0.01	1.69 ^a ±0.01	1.69 ^a ±0.01	1.67 ^a ±0.01	1.68 ^a ±0.01
FCF	1.72 ^a ±0.17	1.73 ^a ±0.16	1.41 ^b ±0.11	1.61 ^a ±0.14	1.26 ^b ±0.13

Valores promedio de tres réplicas por tratamiento ± desviación estándar. Medias con diferentes superíndices entre columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

PI, peso inicial; PF, peso final; LTI, longitud total inicial; LTF, longitud total final; S, supervivencia; GP, ganancia de peso; TCE, tasa de crecimiento específica; AC, alimento consumido; FCA, factor de conversión alimenticia; EP, tasa de eficiencia proteica; FCI, factor de condición inicial; FCF, factor de condición final.

En la **Figura 7** se muestran las curvas de crecimiento de los jureles durante los 60 días del bioensayo; en ella se puede observar que en los primeros 15 días el peso promedio era similar entre todos los tratamientos, y a partir del día 30 los peces alimentados con Catarina y Triple dejaron de crecer, mientras que los demás siguieron creciendo hasta el final del bioensayo. Los peces alimentados con Camarón y Hacha fueron

los más grandes, seguidos de los peces Control y, por último, los peces alimentados con Catarina y Triple, que tuvieron pesos significativamente más bajos que los peces Control.

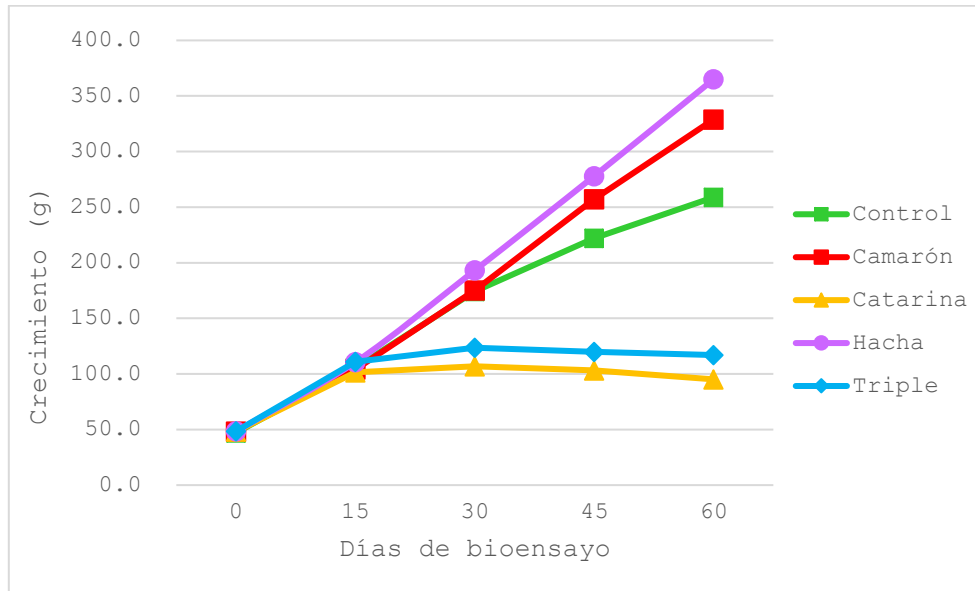


Figura 7. Crecimiento de juveniles de jurel *Seriola rivoliana* durante 60 días de consumir el alimento Control y los alimentos con harinas de subproductos marinos.

6.3 Parámetros bioquímicos

Los parámetros bioquímicos en sangre se muestran en el **Cuadro 5**. La glucosa, no tuvo diferencias entre los tratamientos, en cambio con el colesterol, fue mayor en los peces alimentados con Hacha y Camarón (305 y 298 mg/dL respectivamente) y fueron menores en los peces alimentados con Catarina y Triple (110 y 160 mg/dL respectivamente). Los triglicéridos fueron más altos en los peces alimentados con Camarón (174 mg/dL) seguidos por

Control (119 mg/dL) y Hacha (93 mg/dL), los peces alimentados con Catarina (62 mg/dL) y Triple (58 mg/dL) fueron los más bajos. La proteína total en los peces alimentados con Control y Hacha (5 g/dL) fueron los más altos, seguidos por Camarón (4.5 g/dL) y Catarina (3.4 g/dL), y el más bajo fue el Triple 3.2 g/dL). Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en los peces alimentados con Camarón (35.9 mg/dL) fueron las más altas, después de Control (28.8 mg/dL) y los más bajos fueron en los peces alimentados con Hacha (18.4 mg/dL), Catarina (15.0 mg/dL) y Triple (14.0 mg/dL)

Cuadro 5. Parámetros bioquímicos en plasma sanguíneo de juveniles de jurel *Seriola rivoliana*, después de 60 días de consumir alimentos con harinas de subproductos marinos.

Parámetros bioquímicos	Alimentos				
	Control	Camarón	Catarina	Hacha	Triple
Glucosa (mg/dL)	154.2 ^a ±44.1	145.4 ^a ±81.6	121.0 ^a ±25.3	138.0 ^a ±23.9	97.2 ^a ±12.1
Colesterol (mg/dL)	262.0 ^{ab} ±22.4	298.2 ^a ±28.5	110.0 ^b ±34.3	305.4 ^a ±40.6	160.0 ^b ±34.2
Trig. (mg/dL)	119.4 ^{ab} ±29.9	173.6 ^a ±48.8	61.5 ^b ±27.7	92.8 ^{ab} ±27.3	58.1 ^b ±43.1
PT (g/dL)	4.98 ^a ±0.29	4.53 ^{ab} ±1.02	3.37 ^{bc} ±0.69	4.98 ^a ±0.48	3.17 ^c ±0.36
VLDL (mg/dL)	28.8 ^b ±9.8a	35.9 ^a ±23.4	15.0 ^b ±14.0	18.4 ^b ±5.3	14.0 ^b ±7.4

Valores promedio de tres réplicas por tratamiento ± desviación estándar. Medias con diferentes superíndices entre columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Triglicéridos (Trig.), Proteínas totales (PT), Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).

6.4 Parámetros hematológicos

Los parámetros hematológicos se muestran en el **Cuadro 6**. Los peces que fueron alimentados con Camarón, Hacha y Control tuvieron un hematocrito mayor (más del 60%) en cambio los peces alimentados con Catarina o Triple tuvieron un 53 y 54% respectivamente. La hemoglobina fue más alta en los peces alimentados con Hacha (14.6 g/dL) y la más baja fue con los de Catarina (12.4 g/dL), los demás tratamientos tuvieron valores similares. En cambio, con la hemoglobina corpuscular media, fue mayor en los peces alimentados con Triple (36.1 pg) seguida por Hacha (35.5 pg), Camarón (35.3 pg) y Control (34.6 pg) y significativamente menor en Catarina (34.4 pg). El recuento de plaquetas fue mayor en los peces alimentados con Camarón ($21.83 \times 10^3/\mu\text{L}$) y el más bajo fue con Catarina ($8.7 \times 10^3/\mu\text{L}$), los demás tuvieron valores similares. Con el resto de los parámetros hematológicos no hubo diferencias significativas.

Cuadro 6. Parámetros hematológicos de juveniles de jurel *Seriola rivoliana*, después de 60 días de consumir alimentos con harinas de subproductos marinos.

Parámetros hematológicos	Alimentos				
	Control	Camarón	Catarina	Hacha	Triple
Eritrocitos (x10 ⁶ /μL)	4.06 ^a ±0.28	4.08 ^a ±0.52	3.61 ^a ±0.30	4.11 ^a ±0.23	3.75 ^a ±0.23
Hematocrito (%)	60.7 ^a ±5.0	60.9 ^a ±5.1	53.4 ^b ±4.4	60.8 ^a ±4.0	54.4 ^b ±5.5
Hemoglobina (g/dL)	14.05 ^{ab} ±1.13	14.39 ^{ab} ±1.81	12.40 ^b ±1.05	14.62 ^a ±0.79	13.52 ^{ab} ±0.62
VCM (fL)	149.8 ^a ±8.1	146.4 ^a ±14.0	148.1 ^a ±4.7	148.0 ^a ±11.3	145.0 ^a ±12.3
HCM (pg)	34.6 ^{ab} ±0.7	35.3 ^{ab} ±1.5	34.4 ^b ±0.6	35.5 ^{ab} ±0.9	36.1 ^a ±1.0
CHCM (g/dL)	23.2 ^a ±1.4	24.3 ^a ±1.9	23.2 ^a ±0.7	24.1 ^a ±1.6	25.0 ^a ±2.4
RP (x10 ³ /μL)	12.2 ^{ab} ±5.11	21.83 ^a ±13.5	8.7 ^b ±2.66	19.0 ^{ab} ±14.2	12.0 ^{ab} ±9.4
VPM (fL)	6.83 ^a ±3.44	7.74 ^a ±0.68	6.99 ^a ±3.47	6.32 ^a ±3.13	7.72 ^a ±0.38
CP (%)	0.01 ^a ±0.006	0.02 ^a ±0.010	0.01 ^a ±0.004	0.01 ^a ±0.008	0.01 ^a ±0.004
PDW (%)	17.9 ^a ±10.1	19.2 ^a ±4.43	18.0 ^a ±9.26	15.8 ^a ±8.46	18.5 ^a ±3.38

Valores promedio de tres réplicas por tratamiento ± desviación estándar. Medias con diferentes superíndices entre columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$). volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), recuento de plaquetas (RP), volumen plaquetario medio (VPM), concentraciones de plaquetas (CP) y la anchura de distribución de plaquetas (PDW).

6.5 Leucocitos

Los leucocitos que se identificaron se encuentran en el **Cuadro 7** y en la **Figura 8**. Los peces que fueron alimentados con el alimento Control presentaron más heterófilos ($50 \times 10^9/L$), al contrario que el alimento Catarina donde significativamente presentaron menos ($18.7 \times 10^9/L$), los demás tratamientos tuvieron valores similares. Con los linfocitos los peces que presentaron significativamente altos valores fueron los que consumieron el alimento Catarina ($76.7 \times 10^9/L$), mientras que,

los peces que se alimentaron con el alimento Control presentaron los valores más bajos ($44.7 \times 10^9/L$). Con los monocitos y trombocitos no hubo diferencias significativas.

Cuadro 7. Diferentes leucocitos de juveniles de jurel *Seriola rivoliana*, después de 60 días de consumir alimentos con harinas de subproductos marinos.

Células línea blanca	Alimentos				
	Control	Camarón	Catarina	Hacha	Triple
Heterófilos ($\times 10^9/L$)	50 \pm 18.0 ^a	46 \pm 17.7 ^{ab}	18.7 \pm 14.2 ^b	36.7 \pm 18.7 ^{ab}	33.3 \pm 14.5 ^{ab}
Linfocitos ($\times 10^9/L$)	44.7 \pm 17.8 ^a	49.3 \pm 18.9 ^{ab}	76.7 \pm 15.1 ^b	56 \pm 16.0 ^{ab}	66 \pm 14.5 ^{ab}
Monocitos ($\times 10^9/L$)	5.3 \pm 8.3 ^a	4.7 \pm 7.3 ^a	4.7 \pm 3.9 ^a	4.7 \pm 8.2 ^a	0.7 \pm 1.6 ^a
Trombocitos ($\times 10^9/L$)	4.3 \pm 2.4 ^a	4.3 \pm 3.9 ^a	2.2 \pm 1.6 ^a	3.5 \pm 2.2 ^a	2.9 \pm 2.9 ^a

Valores promedio de tres réplicas por tratamiento \pm desviación estándar.
Medias con diferentes superíndices entre columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

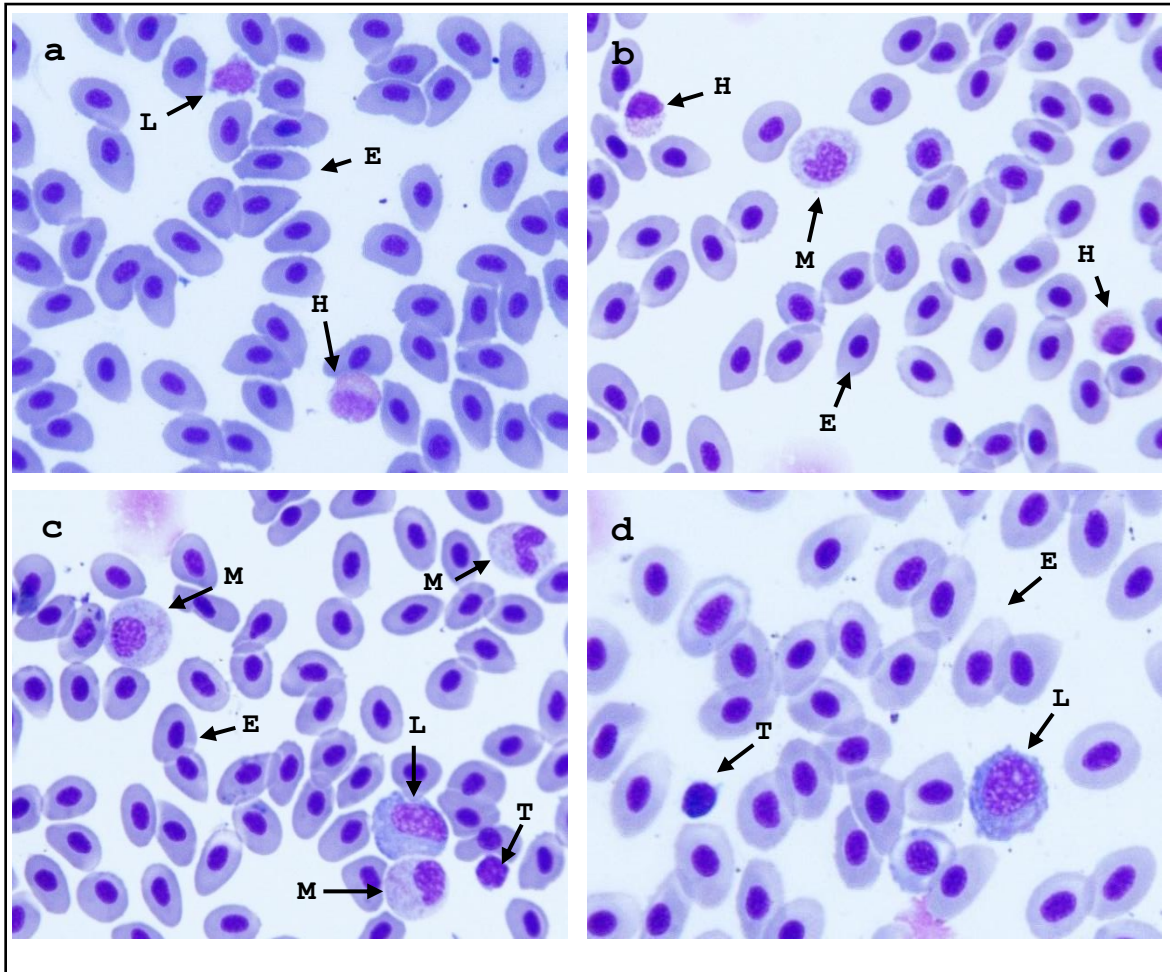


Figura 8. Diferentes células identificadas en frotis sanguíneo de jurel *Seriola rivoliana*, después de 60 días de consumir alimentos con harinas de subproductos marinos. (a) L: linfocitos, E: eritrocitos, H: heterófilos. (b) H: heterófilos, M: monocitos, E: eritrocitos. (d) T: trombocitos, E: eritrocitos, L: linfocitos. (Tinción de Wright, 100x).

6.6 Parámetros histológicos

6.6.1 Lípidos en hígado

Se puede observar en la **Figura 9** los promedios del índice de los lípidos en hígado, en donde los peces alimentados con Camarón y Control tuvieron un índice mayor ($35.8\% \pm 28.76$ y $34.3\% \pm 18.98$ respectivamente) seguido por Hacha ($23.8\% \pm 5.8$) y significativamente menor en Triple y Catarina ($8.7\% \pm 5.9$ y $8.4\% \pm 5.8$ respectivamente). En la **Figura 10** se puede observar las vacuolas lipídicas en el hígado con los diferentes alimentos.

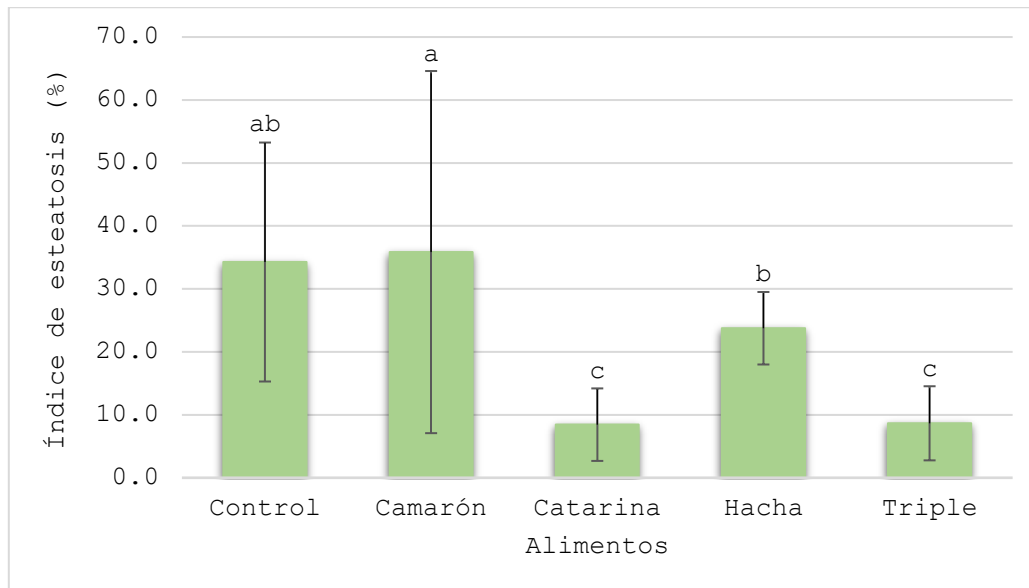


Figura 9. Índice de lípidos en hígado en juveniles de jurel *Seriola rivoliana*, después de 60 días de consumir alimentos con harinas de subproductos marinos. Letras diferentes sobre barras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

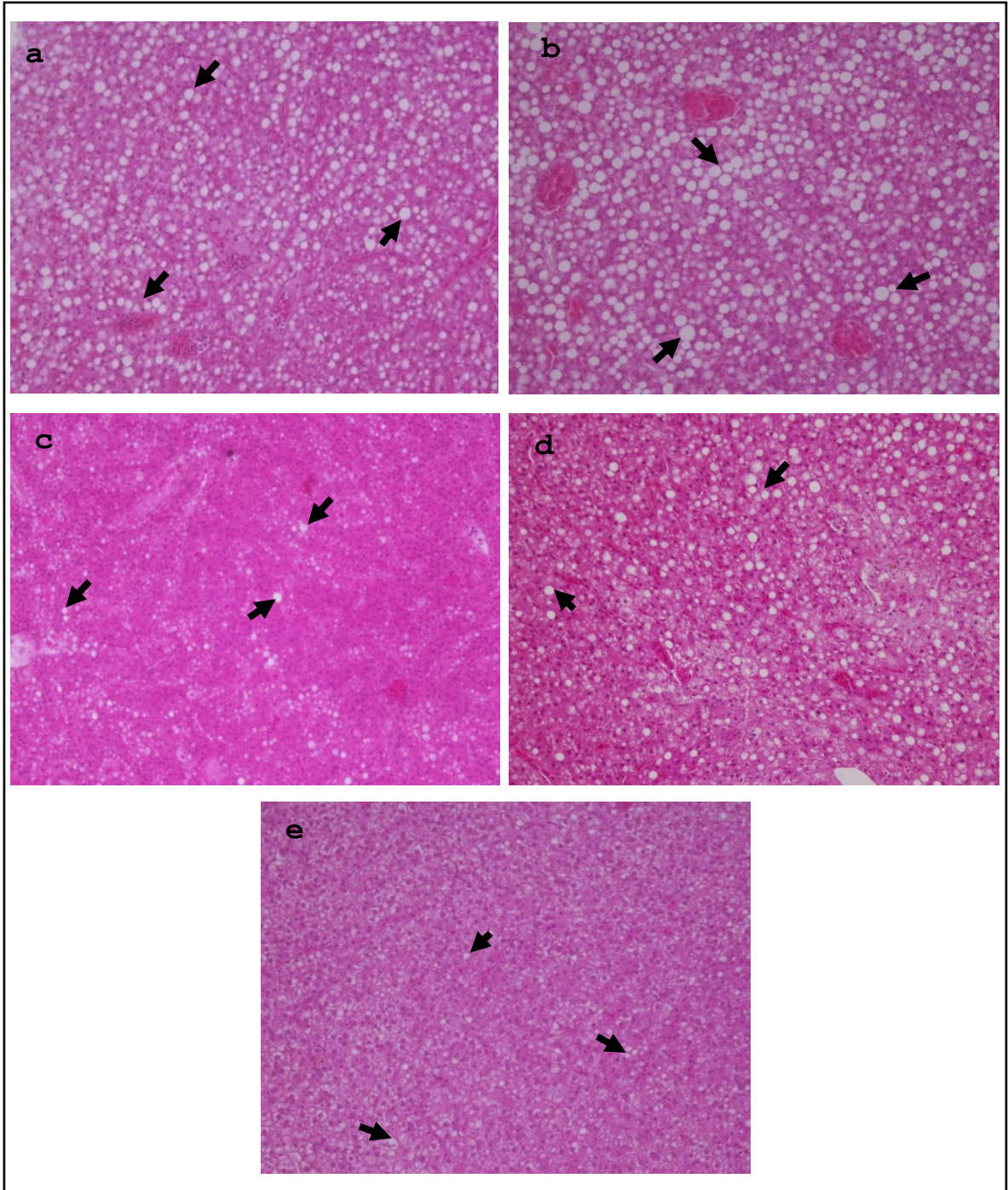


Figura 10. Lípidos en hígado. Cortes histológicos de hígado en juveniles de jurel *Seriola rivoliana*, después de 60 días de consumir alimentos con harinas de subproductos marinos; Control (a), Camarón (b). Catarina (c), Hacha (d) y Triple (e). Las flechas indican las vacuolas lipídicas presentes en el tejido. (Hematoxilina y eosina 40x).

6.6.2 Mucinas en intestino

6.6.2.1 Mucinas ácidas en intestino

En la **Figura 11** se pueden observar los promedios de los índices de mucinas ácidas en el intestino, en donde los peces alimentados con Control ($3.2\% \pm 2.0$) presentaron significativamente mayor cantidad de mucinas ácidas, después de Camarón ($2.1\% \pm 1.4$), y Hacha ($1.5\% \pm 0.9$), sin embargo, en Catarina y Triple fueron significativamente menores ($1.1\% \pm 0.7$ y $1.0\% \pm 0.8$ respectivamente).

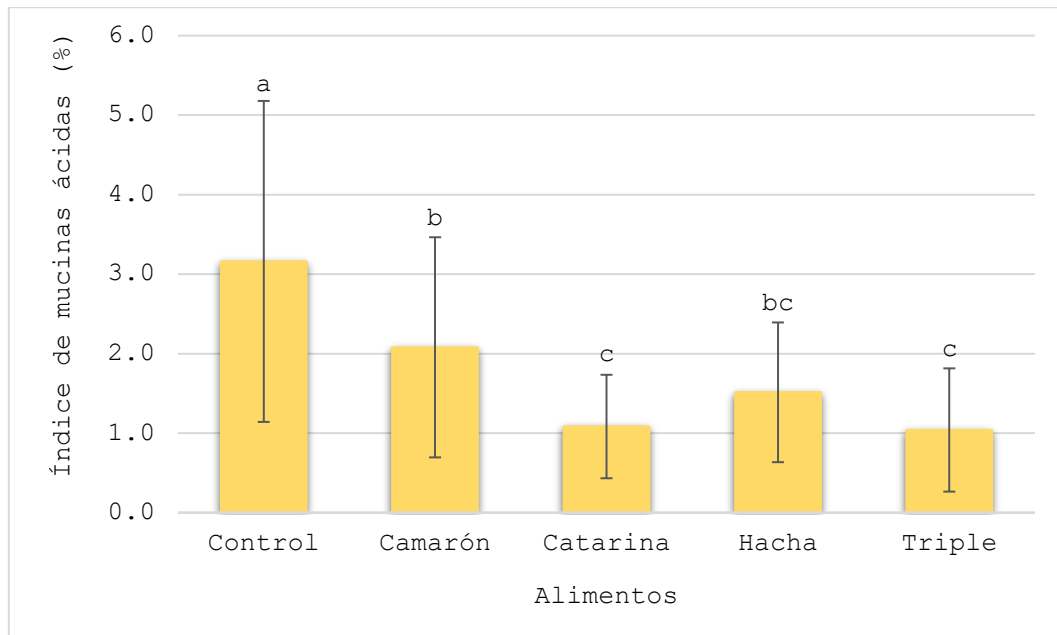


Figura 11. Índice de mucinas ácidas en intestino de juveniles de jurel *Seriola rivoliana*, después de 60 días de consumir alimentos con harinas de subproductos marinos. Letras diferentes sobre barras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

6.6.2.2 Mucinas neutras en intestino

En la **Figura 12** se observan los promedios de los índices de mucinas neutras en el intestino, en donde los peces alimentados con Camarón (5.7% \pm 1.6) fueron los que presentaron significativamente mayor cantidad de mucinas neutras en el intestino que los demás, seguidos por Control (5.5% \pm 2.6), Hacha (4.2% \pm 1.1), Triple (4.0% \pm 1.6) y Catarina (3.7% \pm 1.3).

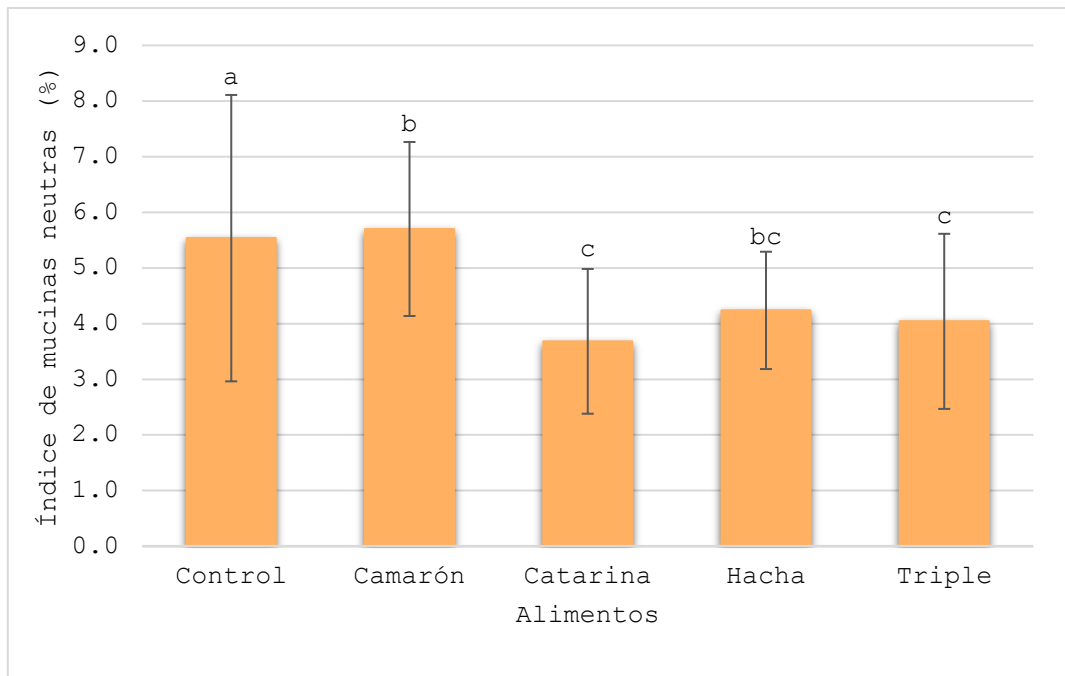


Figura 12. Índice de mucinas neutras en intestino de juveniles de jurel *Seriola rivoliana*, después de 60 días de consumir alimentos con harinas de subproductos marinos. Letras diferentes sobre barras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

En la **Figura 13** se pueden observar las mucinas ácidas y neutras del intestino de los jureles *Seriola rivoliana* después de 60 días de consumir alimentos con harinas de subproductos marinos.

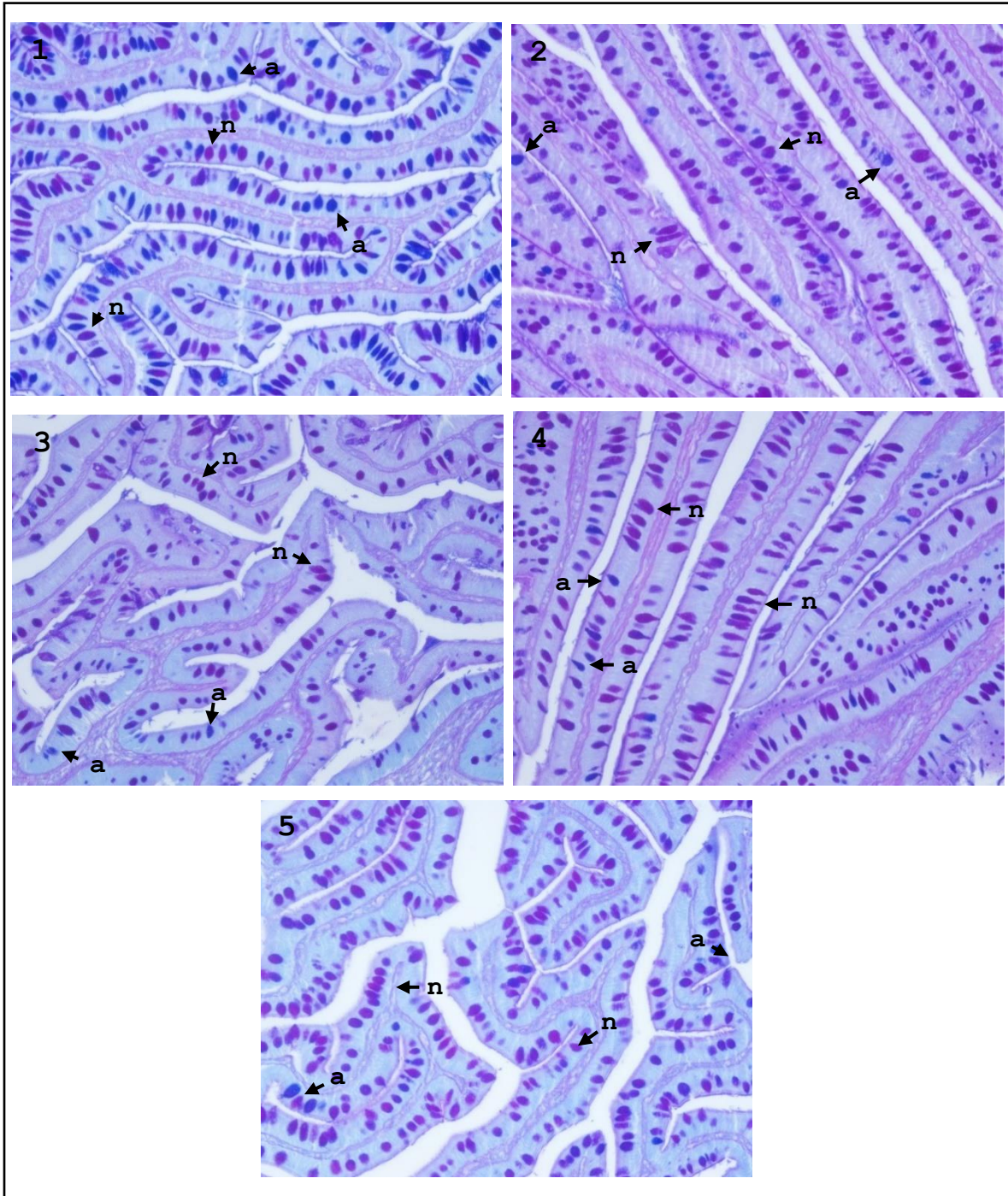


Figura 13. Mucinas en intestino. Cortes histológicos de intestino de juveniles de jurel *Seriola rivoliana*, después de 60 días de consumir alimentos con harinas de subproductos marinos. Control (1), Camarón (2), Catarina (3), Hacha (4) y Triple (5). Las flechas indican las mucinas ácidas (a) de color azul y neutras (n) de color magenta. (Azul alciano-Schiff, 40x).

6.6.3 Altura del enterocito

La **Figura 14** muestra los promedios de la altura del enterocito y se puede observar como los peces alimentados con Hacha fueron los que presentaron mayor altura del enterocito ($13.4 \mu\text{m} \pm 1.0$), después de Control y Camarón (12.1 ± 1.7 y $11.6 \pm 1.0 \mu\text{m}$ respectivamente), luego Triple ($10.4 \pm 1.5 \mu\text{m}$) y por último Catarina ($9.3 \pm 1.2 \mu\text{m}$). En la **Figura 15** se pueden observar la altura de los enterocitos de los juveniles de jurel *Seriola rivoliana* después de 60 días de consumir alimentos con harinas de subproductos marinos.

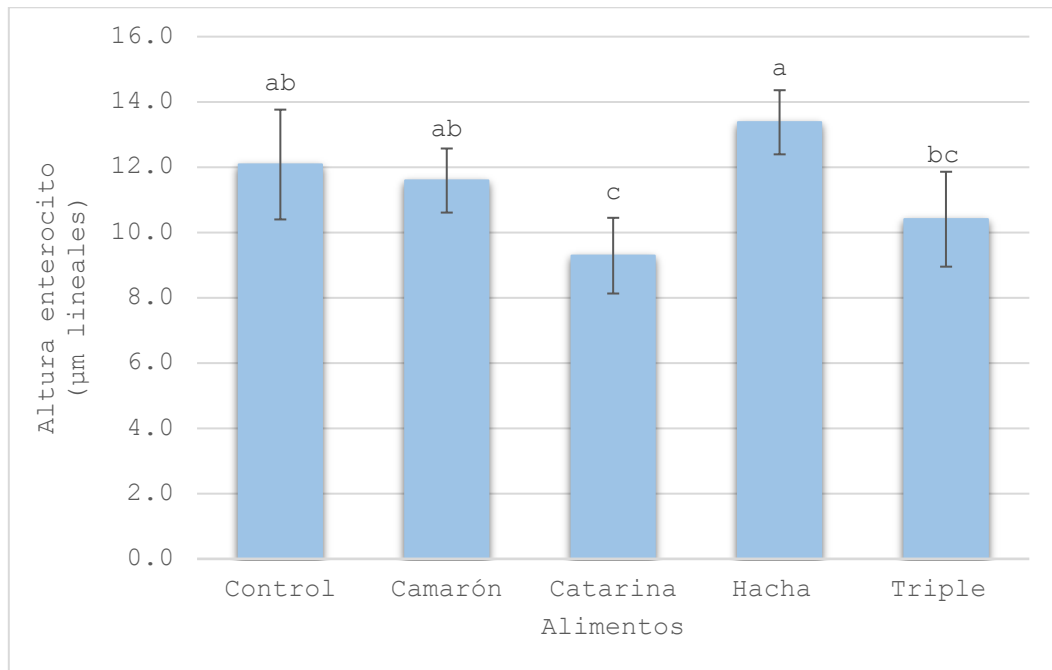


Figura 14. Altura de enterocito en juveniles de jurel *Seriola rivoliana*, después de 60 días de consumir alimentos con harinas de subproductos marinos. Letras diferentes sobre barras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

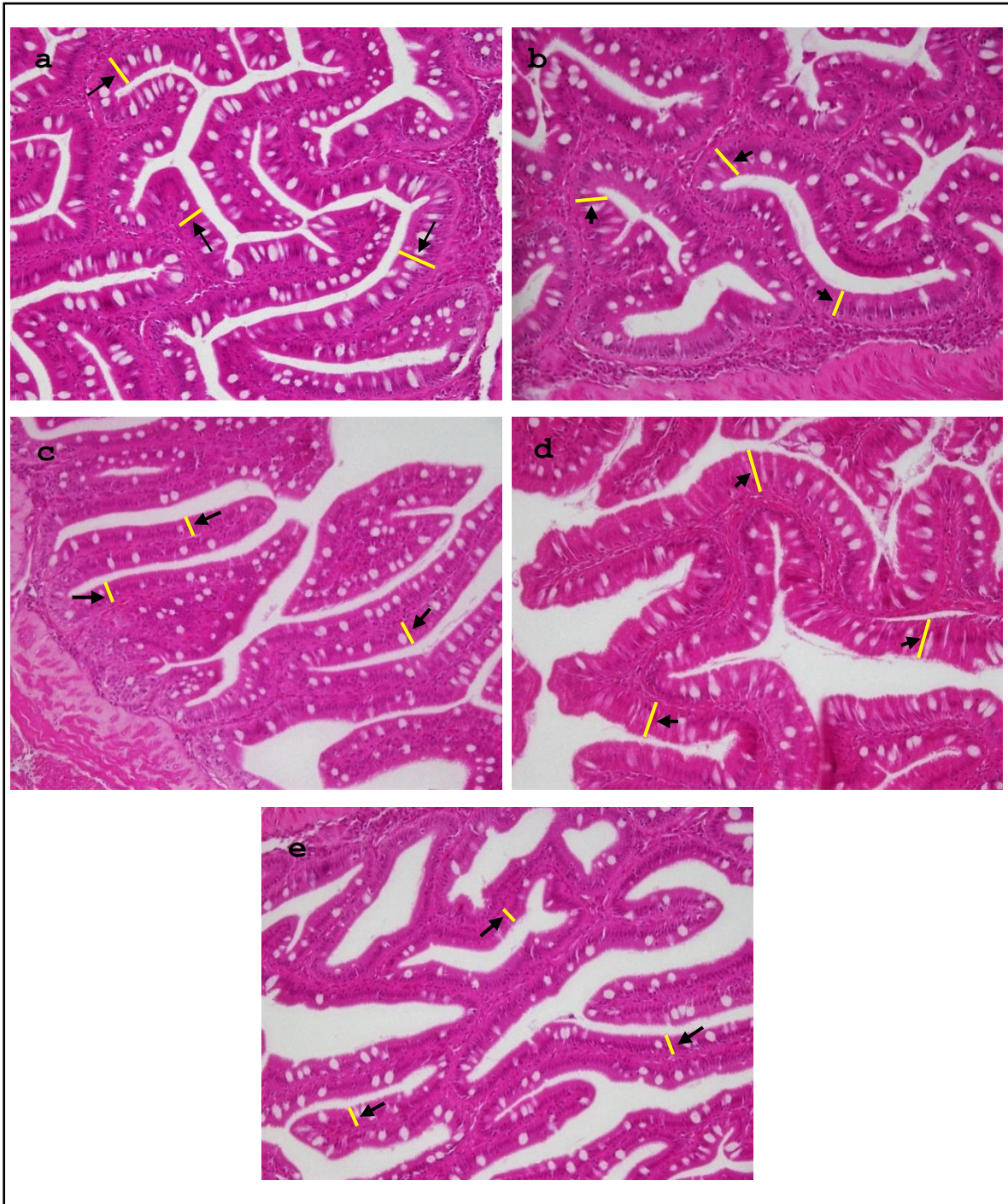


Figura 15. Efecto de la sustitución de harina de pescado por harinas de subproductos marinos, después de 60 días en juveniles de jurel *Seriola rivoliana* en la altura de los enterocitos. Control (a), Camarón (b), Catarina (c), Hacha (d) y Triple (e). Las flechas indican la altura del enterocito. (Hematoxilina y eosina, 40x).

7 DISCUSIÓN

7.1 Sustitución parcial de harina de pescado por harinas de subproductos marinos.

Toyes *et al.* en el 2016⁴² y Licona en el 2015⁴³ trabajaron con harina de Hacha en camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, Espinosa en el 2015²⁸ utilizó harina de cabezas de camarón en la totoaba *Totoaba macdonaldi* y Terrazas en el 2010⁸ utilizó también harina de cabezas de camarón y harina de vísceras de Catarina en camarón blanco, en todos los trabajos se obtuvieron resultados altos en los parámetros productivos sugiriendo una opción para la sustitución de la HP, sin embargo solo se probaron éstas harinas en camarón blanco y en totoaba, nunca en el jurel *Seriola rivoliana*.

En el presente trabajo se encontró que utilizar subproductos marinos como cabezas de camarón y vísceras de Hacha son una alternativa nutricional viable para sustituir la harina de sardina al 25% en los alimentos para juveniles del jurel *Seriola rivoliana*.

7.2 Parámetros productivos.

Las harinas de subproductos marinos (cabezas de camarón y vísceras de Hacha) mostraron que son una opción para sustituir

la harina de sardina al 25% en los alimentos del jurel, pues no se detectaron efectos negativos en los parámetros productivos, incluso la longitud y el factor de condición muestran el crecimiento y el estado nutricional y por ello su condición, bienestar o estado de salud del pez, pues a mayor peso y longitud, supone un mejor estado de salud.^{57,58} Con excepción de los peces de los tratamientos Catarina y Triple, se obtuvieron tasas de crecimiento muy elevadas, lo que pone en evidencia que el jurel *Seriola rivoliana* es una especie con gran potencial para la acuicultura de nuestro país, aunque siempre perfectibles, las harinas de cabezas de camarón y vísceras de Hacha fueron adecuadas para el crecimiento y salud de la especie.

Hasta donde se sabe, el presente estudio es el primero donde se reporta el uso de la harina de vísceras de Hacha en la alimentación de peces carnívoros como jurel, y los resultados fueron favorables, similares a los trabajos hechos en camarón, donde la supervivencia y crecimiento no se ven afectados, e incluso mejora el crecimiento con respecto a un alimento Control con harina de pescado.^{8,43,44}

Sin embargo, con el alimento de vísceras de almeja Catarina y el alimento Triple (mezcla de las tres harinas experimentales) se obtuvo un resultado desfavorable en cuanto a parámetros

productivos como ganancia de peso, longitud total final, tasa de crecimiento específica, alimento consumido, factor de conversión alimenticia, eficiencia proteica, factor de condición, e incluso estuvieron por debajo de los obtenidos con el alimento Control en la mayoría de los parámetros. El bajo consumo de estos alimentos repercutió en los parámetros productivos, a pesar de que durante los primeros días del bioensayo, se registró que todos los peces de los diferentes tratamientos consumían cantidades similares, mientras que después de los primeros 15 días, los peces alimentados con Catarina y Triple bajaron notablemente su consumo.

Se observó que los peces ya no ingerían completamente la ración del alimento; sólo mordían pequeñas cantidades y las escupían, dejando que los pellets se hundieran al fondo del estanque. Aunque la supervivencia fue similar y no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos, algunos peces alimentados con Catarina murieron cerca del final del bioensayo. Se puede descartar la idea de que hubiera alguna variación en la composición química de macronutrientes de los diferentes alimentos, pues los valores obtenidos en los análisis proximales son muy similares entre sí. Sin embargo, no se descarta que algunos de los alimentos tengan factores antinutricionales, los cuales se han definido como sustancias que por sí mismas, o a través de sus productos metabólicos que

surgen de los sistemas vivos, interfieren con la utilización de los alimentos, y afectan la salud y la producción de los animales.⁵⁹ De manera *a posteriori* al presente estudio, se hizo un análisis toxicológico de las harinas, lográndose detectar una toxina marina, el ácido okadaico (*com. pers. Civera, 2017*). Se sabe que el ácido okadaico es responsable de la intoxicación diarreica por mariscos (*DSP*, por sus siglas en inglés), un fenómeno tóxico en humanos por el consumo de mariscos contaminados. Esta toxina es generada por dos especies de dinoflagelados marinos del género *Dinophysis* y *Prorocentrum* los cuales son los causantes de los florecimientos algales nocivos o mareas rojas, de modo que llegan a perjudicar a diferentes organismos, siendo los moluscos bivalvos como ostiones, mejillones y almejas los más vulnerables por tener una alimentación por medio de filtración de microalgas, dinoflagelados y material particulado, que los lleva eventualmente a acumular altas concentraciones de toxinas en sus tejidos.⁶⁰

Las partes que se utilizaron para hacer la harina de almeja Catarina fueron las vísceras que quedan después de extraer el músculo, y se sabe que la mayor concentración de las toxinas como el ácido okadaico se encuentra en la glándula digestiva (76%) después de la gónada (12%), branquias y manto (<12%).⁶⁰⁻⁶³

Se ha investigado al ácido okadaico en bivalvos, y no se han reportado alteraciones físicas que se puedan detectar como olor, sabor, color, tamaño, forma o movimiento por lo cual su presencia pasa desapercibida.⁶⁴ Además, la eliminación de la toxina es muy lenta; puede ir de días a meses,⁶³ e incluso la cocción tampoco altera la toxicidad de los mariscos contaminados,^{65,66} a menos que sea una ebullición estricta a 100°C por 163 minutos, donde la toxina sí se desnaturaliza.^{66,67}

Es plausible pensar que la almeja Catarina utilizada en este estudio haya estado en contacto con una marea roja, y que haya concentrado el ácido okadaico en sus tejidos, lo cual podría ser una explicación del por qué los tratamientos de Catarina y Triple produjeron los pobres resultados obtenidos. En el caso del Hacha, aunque los especímenes fueron obtenidos de la misma zona que los de almeja Catarina, su captura no fue en el mismo período de tiempo, y muy probablemente no hayan estado en contacto con alguna floración de algas nocivas al momento de su captura, por lo que la harina de Hacha no solo no tuvo un efecto nocivo, sino que permitió obtener un crecimiento muy elevado en los peces de ese tratamiento.

7.3 Bioquímica sanguínea y biometría hemática.

Ahora bien, presumiblemente, el ácido okadaico contenido en la harina de vísceras de Catarina alteró la composición sanguínea en los peces alimentados con Catarina y Triple. Al reducir la ingesta de estos alimentos, probablemente se vio limitada la digestión y provocó una mala absorción de nutrientes, lo que pudo repercutir en la bioquímica sanguínea. Se sabe que la mayoría de los teleósteos utilizan principalmente el hígado o el músculo esquelético para almacenar triglicéridos y ser una reserva de energía,⁶⁸ pero en los peces de los tratamientos Catarina y Triple se presentó hipotrigliceridemia, en comparación con los peces del tratamiento de Camarón, donde los peces presentaron hipertrigliceridemia. Del mismo modo sucedió con el nivel de colesterol en plasma sanguíneo, y existe información en donde valores altos de colesterol en los teleósteos, como en el caso de los tratamientos de Camarón y Hacha, son normales fisiológicamente y no están asociados con condiciones patológicas como en el hombre y algunos mamíferos.⁶⁸

Los tratamientos de Catarina y Triple presentaron una hipocolesterolemia e hipoproteïnemia. Maita *et al.*^{69,70} menciona que cuando un alimento para peces no contiene harina de pescado, presentan hipocolesterolemia y anemia, pero no

concuenda totalmente con lo obtenido en este trabajo, ya que tan solo se hizo una sustitución del 25% de HP, y los tratamientos de Camarón y Hacha mostraron niveles superiores de colesterol, y en cuanto a la proteína los tratamientos de Hacha y Control fueron los de mayor concentración.

Wedemeyer y McLeay⁷¹ mencionan que cuando hay una hipoproteïnemia, puede ser consecuencia de daño hepático, una mala absorción de nutrientes, deficiencia nutricional, inanición o enfermedades infecciosas. De igual forma esto se ve reflejado en la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), ya que al no tener la cantidad suficiente de colesterol, triglicéridos y proteína se reduce su síntesis, que probablemente pasó con los tratamientos Catarina y Triple, y por lo tanto se vio afectado su funcionamiento, que es el de llevar los ácidos grasos fuera del hígado a otros sitios para su almacenamiento.⁷² Por el contrario, el tratamiento de Camarón fue el más alto en VLDL y es porque esta lipoproteína es rica en triglicéridos, los cuales también poseían en mayor cantidad. Por otra parte, el conjunto de estas afectaciones en los tratamientos de Catarina y Triple resulta importante enfatizar en el mecanismo de acción del ácido okadaico, para entender cómo afecta al organismo. Se ha demostrado que el ácido okadaico es un potente inhibidor de serin-treonin protein

fosfatasa tipo 1 y 2A (PP1 y PP2A), las cuales intervienen en diversos procesos celulares. Por ejemplo, la PP1 juega un rol en la regulación del metabolismo del glucógeno, en la contracción del músculo liso, la división celular y la síntesis de proteína, y el PP2A participa en el control de la mayoría de las principales vías metabólicas como la glucólisis, el metabolismo de lípidos, apoptosis, crecimiento, división celular, transcripción y síntesis de proteínas.⁷³

Si se consideran estos aspectos se pueden explicar los resultados obtenidos en los tratamientos de Catarina y Triple, ya que no solo perjudicó los parámetros productivos y la bioquímica sanguínea, sino también hubo afectaciones en los demás parámetros hematológicos y órganos estudiados.

La evaluación del hemograma es muy útil para conocer el estado de salud y la condición fisiológica de los peces, pero se deben tener en cuenta los factores intrínsecos y extrínsecos que pueden influir en los valores obtenidos.^{11,74} Además, es muy complicado establecer que parámetros son de referencia, a pesar de que se han hecho estudios sobre la hematología de los peces, pues los valores normales o rangos de referencias son bastante variables.⁷⁵ En el presente estudio se tomaron como valores de referencia los resultados obtenidos con el tratamiento Control.

En cuanto a los valores de hematocrito, si se relacionan con los valores de las proteínas totales se obtienen ciertas interpretaciones que pueden orientar al diagnóstico de la enfermedad que podrían tener los animales.

Si se toma como referencia el tratamiento Control, los valores de Camarón y Hacha se encuentran con un hematocrito en rango y una normoproteinemia o proteína en rango, por lo tanto, se consideran normales. En cambio, los valores obtenidos en los peces de los tratamientos Catarina y Triple indican una anemia (disminución en el hematocrito) con una hipoproteinemia, característica de alguna úlcera o lesión en el organismo.⁷⁶

Una anemia se define como la reducción de la capacidad de la sangre para transportar oxígeno y se caracteriza por una disminución del hematocrito, principalmente, hemoglobina y eritrocitos, generalmente es considerada como un signo clínico de enfermedad.^{76,77}

La anemia se clasifica de acuerdo con los índices eritrocitarios (clasificación morfológica) en donde se utilizan los valores del volumen medio corpuscular o volumen globular medio (VCM o VGM) el cual indica el tamaño promedio de los eritrocitos. También se utilizan los valores de la concentración media de hemoglobina corpuscular o concentración media de hemoglobina globular (CHCM o CMHG) la cual está

relacionada con el color, que es dado por la hemoglobina;⁷⁶ en ambos casos, no hubo diferencias significativas entre tratamientos lo que demuestra que los tratamientos de Catarina y Triple tienen valores semejantes a los del tratamiento Control, los cuales se consideran normales o en rango, es decir, que con el VCM los eritrocitos de los peces de estos tratamientos son de tamaño normal y se les conoce como normocitos y con el CHCM los eritrocitos tienen color normal, lo cual se conoce como normocromasia, entonces se clasificó como una anemia normocítica normocrómica que a su vez corresponde a una anemia de tipo no regenerativa.⁷⁶

A pesar de que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos para los valores de eritrocitos, sí las hubo en hemoglobina, hemoglobina corpuscular media (MCH) y en plaquetas, siendo el tratamiento de Catarina el más bajo de los cinco después del Triple.

Este tipo de anemia no regenerativa puede ser a causa de una producción celular deteriorada (glóbulos rojos) y puede estar relacionada con trastornos nutricionales (deficiencias), toxinas o enfermedades orgánicas, incluso procesos inflamatorios.^{74,76,77}

Estos resultados pueden ser consecuencia de los efectos del ácido okadaico, que de igual manera repercutió en el sistema

inmunológico incrementando los linfocitos de los peces del tratamiento Catarina, si se toma como referencia los valores del tratamiento Control, ya que los peces del tratamiento Catarina muestran una linfocitosis (incremento en los valores absolutos en relación con los valores de referencia de la especie).^{74,76}

Los linfocitos desempeñan un papel importante en la respuesta inmune, ya que, a mayor cantidad, mayor es la capacidad del animal para combatir infecciones y toxinas.^{74,76,78}

Además de los linfocitos, también se vieron afectados los heterófilos que son el equivalente a los neutrófilos en mamíferos,⁷⁹ siendo el granulocito más común en los teleósteos.⁷⁴ Se hizo aparente una neutropenia (disminución en los valores absolutos en relación con los valores de referencia del grupo control), que indica una inflamación severa, destrucción excesiva inmunomediada o extravasación de neutrófilos en un sitio focal de daño significativo.^{74,76} Esto coincide con las causas de la anemia normocítica normocrómica no regenerativa que se diagnosticó en el hemograma de los peces, sin embargo, la principal función de los heterófilos es fagocitar, engullir y destruir a los microorganismos.⁸⁰

Por otra parte, con los tratamientos de Camarón y Hacha los heterófilos y linfocitos se mantuvieron en rango junto con los del Control.

Ahora bien, si se comparan los valores de linfocitos y heterófilos con otras especies de peces, por ejemplo, en *Tilapia Oreochromis niloticus* los valores son muy bajos (31.4 y 16.3 $\times 10^9/L$), en cambio en el Rubio *Salminus affinis* son altos (68.8 y 28.4 $\times 10^9/L$) y no necesariamente se trata de alguna anomalía.⁸¹

A pesar de que no hubo diferencias significativas en cuanto a los monocitos y trombocitos, la variabilidad observada puede atribuirse a procesos patológicos en un leucograma; para una bioquímica sanguínea y un hemograma los resultados obtenidos y los reportados en la literatura siempre puede haber variaciones y están sujetas a las características interespecíficas de cada individuo, lo que hace difícil su interpretación.⁸¹

7.4 Histología del hígado e intestino.

En el sistema inmunológico del intestino de los teleósteos se sabe que carecen de placas de Peyer en los tejidos linfoides asociados al intestino,^{82,83} pero tienen tres tipos de barreras: la inmunológica donde hay moléculas y células como macrófagos, heterófilos, células plasmáticas y linfocitos, la segunda es

la intrínseca, en donde hay células epiteliales y uniones celulares como los enterocitos, y la última barrera es la extrínseca, que está formada principalmente por moco, siendo la primera línea de defensa contra patógenos, enzimas destructivas, productos químicos corrosivos, toxinas y están distribuidos a lo largo de la lámina propia del intestino.^{78,84,85}

Puesto que el intestino es muy delicado y siempre está expuesto a bacterias, parásitos, virus y toxinas, las células de Goblet o caliciformes producen una capa de moco que son glicoproteínas de alto peso molecular o también llamadas mucinas, que forman una capa insoluble en agua, tienen un alto contenido de oligosacáridos, que intervienen en la adhesión de patógenos microbianos,⁸⁵ reduciendo la colonización y favoreciendo su eliminación.⁸⁶ Estas mucinas tienen diferentes cantidades de glicoproteínas neutras, ácidas y sulfatadas que se identifican después de la tinción azul alciano-Schiff.⁸⁷

En esta investigación la histología resalta su importancia para conocer los cambios a nivel intestinal; en cuanto a la cantidad de mucinas ácidas y neutras, los tratamientos de Catarina y Triple fueron los más bajos en comparación con los del tratamiento Control, y se debe a que las mucinas ácidas y sulfatadas inhiben la adhesión bacteriana y la degradación de glicoproteínas por las proteasas,⁸⁷ pero en este estudio se

obtuvieron resultados con una menor cantidad de mucinas ácidas que neutras, por lo que aparentemente no son suficientes las mucinas ácidas para inhibir las bacterias. Además, se han reportado casos en donde algunas bacterias han evolucionado produciendo compuestos específicos para degradar las mucinas del intestino, lo que da como consecuencia una infección, como se ha reportado en *C. carpio*.⁸⁸

Las células de Goblet se dividen en tres tipos, dependiendo del tiempo de desarrollo. Las de tipo I tienen mucinas neutras, las de tipo II tienen mucinas ácidas, consideradas células inmaduras, y las de tipo III tienen mucinas neutras y ácidas, consideradas maduras.⁸⁹

El espesor, composición y la disminución de la síntesis de mucinas afectan esta barrera mucosa, haciendo susceptible el intestino a inflamaciones, alterando la absorción de nutrientes y ocasionando enfermedad,⁹⁰ y que probablemente ocurrió en este estudio, y coincide con lo reportado en *Seriola lalandi*, donde una disminución de mucinas ácidas está relacionado con una infección.⁹⁰ Aunado a esto, es importante saber que la distribución y cantidad de las células de Goblet varían según la especie.⁹¹

Con el tratamiento de Camarón fue mayor la cantidad de células de Goblet con mucinas neutras en comparación con el tratamiento

Control. Se sabe que el aumento de estas células puede indicar la presencia de una inflamación, ya que las células producen mucosa de más al haber una mayor irritación, para lubricar y proteger el intestino,⁹² incluso se ha señalado como la primera etapa de la enteritis subaguda.⁹³

Se sabe que la quitina, que es el mayor componente del exoesqueleto de crustáceos, tiene un efecto inmunoestimulante, por lo tanto explicaría, el aumento de las células Goblet.^{94,95} Aun así, se requiere de futuras investigaciones acerca del tema.

Además de las células de Goblet, el intestino de los peces está revestido por células epiteliales cilíndricas simples⁹⁶ y la altura de estas células o enterocitos se ha utilizado como índice de diagnóstico para evaluar el estado nutricional de los peces,^{97,98} En este caso se obtuvieron diferencias significativas entre todos los tratamientos.

Durante la observación en el microscopio se notó que los peces del tratamiento de Catarina y Triple presentaron desintegración del epitelio, falta de vellosidades y ensanchamiento de la lámina propia con infiltración leucocitaria, y además fueron los dos tratamientos con menor altura de enterocitos, lo que indica una enteritis muy marcada de acuerdo con Merrifield *et al.*⁹⁹

Se han descrito casos, en el salmón del Atlántico *Salmo salar*, donde la harina de pescado fue parcialmente remplazada al 30% con harina de soya provocando inflamación, y se debió a los factores antinutricionales presentes en la soya,¹⁰⁰ incluso se ha considerado que podría ser el género *Seriola* susceptible a enteritis inducida por el alimento,¹⁰¹ sin embargo, en este trabajo se utilizó concentrado proteico de soya la cual pierde los factores antinutricionales durante su procesamiento,^{102,103} y puede corroborarse en los otros tratamientos, ya que si hubiera afectado, se verían comprometidos los tratamientos de Control, Hacha y Camarón.

También la enteritis puede estar relacionada con diferentes factores como temperatura fría, alimentos con contenido graso, presencia de altos niveles de ingredientes vegetales y proteínas, no obstante durante todo el bioensayo se mantuvo controlada la temperatura y los cinco alimentos fueron isoproteicos e isocalóricos.

Otros factores relacionados con la enteritis son las bacterias oportunistas y el bajo consumo de alimento, y fue claramente observado en los peces de los tratamientos Catarina y Triple. Estos factores pueden llegar a causar además de inflamación (enteritis), una ulceración y necrosis, ocasionando desequilibrio electrolítico, baja absorción de nutrientes y

muerte.^{101,104-106} De hecho, el hambre o la restricción del alimento, pueden cambiar la integridad o forma de las células del intestino de los peces.⁹⁸

Considerando el antecedente de que el género *Seriola* es propenso a enteritis y que hubo al menos un factor antinutricional como el ácido okadaico en los alimentos que contenían harina de vísceras de almeja Catarina, estos elementos podrían ser una explicación al daño generado a la mucosa, reduciendo las células Goblet, y con ello la cantidad de mucinas ácidas y neutras, y probablemente rompiendo la barrera de protección y quizá bacterias oportunistas se infiltraron en el epitelio.

En conjunto con lo que ocasiona el ácido okadaico, se sabe que los enterocitos se desprenden de la membrana basal¹⁰⁷ y se ha visto en ratones que hay destrucción epitelial,¹⁰⁸ generando una enteritis y hasta una necrosis, lesiones que explican los datos obtenidos en el hemograma, en especial con las causas de la anemia normocítica normocrómica no regenerativa.

Además, esta enteritis probablemente redujo drásticamente la digestión, absorción y metabolismo de nutrientes, provocando un crecimiento deficiente, lo que también coincide con la disminución de los datos obtenidos en la bioquímica sanguínea

y los parámetros productivos, así como la probable infiltración de bacterias al epitelio.

El ácido okadaico induce una inmuno-estimulación e inmunotoxicidad sistémica, ocasionando un proceso inflamatorio,¹⁰⁹ lo que explica la linfocitosis y la neutropenia marcada en el leucograma.

Otro punto importante es que la integridad de la mucosa intestinal está relacionada con la intensidad de la renovación de las células epiteliales (enterocitos y células de Goblet),¹¹⁰ si esta se ve afectada compromete la función de intestino. Por ejemplo, se ha reportado que el ácido okadaico induce alteraciones en el ciclo celular, principalmente el arresto mitótico y la condensación cromosómica prematura en diferentes tipos de células, incluyendo células de leucemia, células intestinales, linfocitos, fibroblastos y células neuronales.¹⁰⁹ Esto puede explicar los resultados obtenidos en los tratamientos de Catarina y Triple.

Por otra parte, los peces de los tratamientos Hacha, Control y Camarón presentaron altura de enterocitos similares entre sí, aunque los de Hacha fueron significativamente superiores a los de peces de los tratamientos Catarina y Triple, lo que indica que el estado general del intestino de los peces de los tratamientos Hacha, Control y Camarón fue mayor que el de los

peces de los otros dos tratamientos, sin sufrir ningún daño aparente que comprometiera su salud.

Por último, con los resultados obtenidos en cuanto a la evaluación del hígado, en el tratamiento de Camarón se observó mayor cantidad de vacuolas lipídicas que en el tratamiento Hacha. Algunos autores lo consideran como una adaptación fisiológica al alimento^{111,112} y otros una patología,¹¹³ pues se ha descrito en peces de agua dulce, especialmente en la familia de los salmónidos como trucha y salmón, donde su frecuencia es muy común,^{114,115} ya que están en sistemas intensivos durante meses, así también se han reportado en carpa y tilapia,¹¹⁶⁻¹¹⁸ acompañados de bajas tasas de crecimiento, debido a problemas metabólicos por exceso de lípidos en el alimento por una inclusión alta del aceite de pescado del 9 al 13%, estos resultados no coinciden con este trabajo porque el porcentaje de inclusión fue del 7% en los alimentos y el tiempo del bioensayo duro 60 días.

Otros autores mencionan que es frecuente encontrar mayor cantidad de lípidos en hígado relacionados con alimentos artificiales y ricos en lípidos,¹¹⁹⁻¹²¹ así también en una sustitución mayor al 60% de harina de pescado;¹²² pero en este trabajo se sustituyó el 25%, lo que influyó en los tratamientos de Control, Hacha y Camarón, pues contenían una cantidad alta

de ácidos grasos similares.¹²³ También es importante mencionar que la quitina no es tóxica para el hígado.^{94,124} Además, está relacionada con la hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia encontrada en la bioquímica sanguínea del tratamiento de Camarón y de Hacha esto solo confirma que el intestino tuvo mucha capacidad de absorción de nutrientes y su funcionalidad fue mayor, incluso que el tratamiento Control.

Sin embargo, con los tratamientos de Catarina y Triple fue lo opuesto, mostraron una cantidad significativamente menor de lípidos en hígado, esto se debe a los efectos del ácido okadaico, lo más probable fue que dio entrada a los agentes infecciosos y toxinas del intestino, y por medio de la circulación sanguínea llegaron al hígado comprometiendo su función a la desintoxicación y degradación de sustancias tóxicas.^{78,125} Los efectos del ácido okadaico en hígado coinciden con lo reportado por la FAO⁶⁶ y por Van Apeldoorn¹⁰⁷ en donde se encontraron pequeñas gotas lipídicas en los lóbulos de los hepatocitos, además al ser afectado el intestino, perjudicó el paso de los nutrientes del intestino al hígado, pues una de tantas funciones del hígado son la síntesis de proteínas y grasas, y estas también se vieron afectadas en la bioquímica sanguínea.⁷²

El hígado es un órgano que se considera factor clave para medir el estado nutricional, debido al metabolismo de los productos del sistema digestivo, además es el principal órgano de almacenamiento de energía y es uno de los tejidos más sensibles al hambre, por lo cual los peces de los tratamientos de Catarina y Triple, al no ingerir suficiente alimento, ocasionaron la reducción de las vacuolas lipídicas en el hígado, lo cual indica una desnutrición severa y confirma las causas de la anemia normocítica normocrómica no regenerativa; también van en ese mismo sentido los resultados de la bioquímica sanguínea como la hipotrigliceridemia, hipocolesterolemia, hipoproteinemia, disminución de VLDL y la enteritis. De hecho, también coincide con lo reportado por Chen *et al.*⁹⁸ en donde se observó que al retrasar y privar de alimento a larvas y juveniles del jurel *Seriola lalandi*, perjudicaron el sistema digestivo disminuyendo la capacidad digestiva de los peces, en donde también la altura de los enterocitos y el depósito de lípidos en los hepatocitos se redujeron.

En términos generales, los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que subproductos marinos como las harinas de cabezas de camarón y de vísceras de Hacha son una alternativa para sustituir parcialmente la harina de pescado en los alimentos para juveniles del jurel *Seriola rivoliana*.

8 CONCLUSIÓN

- La utilización de harinas de subproductos marinos como sustitutos parciales de la harina de pescado en el alimento tuvo efectos nutrimentales diferentes que repercutieron sobre los parámetros productivos, hematológicos e histológicos de los juveniles de jurel *Seriola rivoliana*, en función del tipo de harina empleada.
- La sustitución del 25% de la harina de sardina por harina de cabezas de camarón y vísceras de Hacha incrementó de manera significativa el crecimiento y otros parámetros productivos, así como en la mayoría de los parámetros hematológicos e histológicos de los juveniles de jurel, por lo que pueden considerarse como ingredientes útiles para la formulación de alimentos para esta especie y reducir el uso de la harina de pescado.
- La sustitución del 25% de la harina de sardina por harina de vísceras de almeja Catarina, y la sustitución del 56% en el alimento Triple, que contenía los tres ingredientes experimentales (harina de cabezas de camarón, vísceras de almeja Catarina y vísceras de Hacha), tuvo resultados

disminuidos muy marcados en los parámetros productivos, hematológicos e histológicos de los juveniles de jurel, debido a que se descubrió, *a posteriori*, que la harina de vísceras de almeja Catarina contenía una toxina marina, identificada como ácido okadaico, que repercutió en la salud de los organismos.

8.1 Recomendaciones.

- Serán necesario realizar más estudios para determinar el valor nutricional de la harina de vísceras de almeja Catarina, libre de toxinas, y en combinación con las otras harinas experimentales, para saber si puede sustituir la harina de sardina en el alimento para jurel.
- Se recomienda hacer análisis toxicológicos y microbiológicos a las materias primas antes de la fabricación de las harinas con el fin de que no haya alguna interferencia que comprometa la efectividad del alimento y ponga en riesgo la salud de los organismos en cultivo.

9 REFERENCIAS

1. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. En: El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma, Italia; 2018.
2. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Oportunidades y desafíos. En: El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma, Italia; 2014.
3. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural P y A. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. [Internet]. 2017. Disponible en: <https://www.gob.mx/conapesca/documentos/estadistica-pesquera-y-acuicola-de-mexico>
4. Nakada M. Capture-based aquaculture of yellowtail. Capture-Based Aquac Glob Overview FAO Fish Tech Pap. 2008;No. 508:199-215.
5. Kolkovski S, Sakakura Y. Yellowtail kingfish, from larvae to mature fish-problems and oportunities. En: Cruz Suarez LE, D. Ricque Marie MG, Nieto Lopez D, Villarreal US and MG, editores. Advances in aquaculture nutrition. Hermosillo, Sonora, México: Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.; 2004.
6. Tacon AGJ, Hasan MR, Subasinghe RP. Use of fishery resources as feed inputs for aquaculture development: trends and policy implications. FAO Fisheries Circular. Roma, Italia; 2006.
7. Primavera J. Quest for Sustainability. Glob Voices Sci. 2005;310:57-9.

8. Terrazas-Fierro MM. Digestibilidad aparente in vivo de materia seca, proteína y aminoácidos de ingredientes de origen marino y terrestre. y su aplicación para el estudio de requerimientos nutricionales en juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. [tesis de doctorado]. La Paz, B.C.S. (México) Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.; 2010.
9. Civera-Cerecedo R, Goytortúa-Bores E, Rocha-Meza S, Nolasco-Soria H, Vega-Villasante F, Balart EF, et al. Uso de la Langostilla Roja *Pleuroncodes planipes* en la Nutrición de Organismos Acuáticos. Av en Nutr Acuícola IV. 2000;69:349-65.
10. Uyan O, Koshio S, Teshima S ichi, Ishikawa M, Thu M, Alam MS, et al. Growth and phosphorus loading by partially replacing fishmeal with tuna muscle by-product powder in the diet of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture. 2006;257(1-4):437-45.
11. Ilham I, Siddik MAB, Fotedar R. Effects of Organic Selenium Supplementation on Growth, Accumulation, Haematology and Histopathology of Juvenile Barramundi (*Lates calcarifer*) Fed High Soybean Meal Diets. Biol Trace Elem Res. 2016;174(2):436-47.
12. Buentello A, Jirsa D, Barrows FT, Drawbridge M. Minimizing fishmeal use in juvenile California yellowtail, *Seriola lalandi*, diets using non-GM soybeans selectively bred for aquafeeds. Aquaculture. 2015;435:403-11.
13. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. En: El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Roma, Italia; 2016.

14. Roo J, Fernández-Palacios H, Hernández-Cruz CM, Mesa-Rodríguez A, Schuchardt D, Izquierdo M. First results of spawning and larval rearing of longfin yellowtail *Seriola rivoliana* as a fast-growing candidate for European marine finfish aquaculture diversification. *Aquac Res* [Internet]. marzo de 2014;45(4):689-700. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/are.12007>
15. Nakada M koto. Yellowtail Culture Development and Solutions for the Future. *Rev Fish Sci*. 2002;10(3-4):559-75.
16. Takakuwa F, Fukada H, Hosokawa H, Masumoto T. Optimum digestible protein and energy levels and ratio for greater amberjack *Seriola dumerili* (Risso) fingerling. *Aquac Res*. 2006;37(15):1532-9.
17. Vidal AT, De la Gándara García F, Gómez AG, Cerdá MJ. Effect of the protein/energy ratio on the growth of Mediterranean yellowtail (*Seriola dumerili*). *Aquac Res*. 2008;39(11):1141-8.
18. Jover M, García-Gómez A, Tomás A, De la Gándara F, Pérez L. Growth of mediterranean yellowtail (*Seriola dumerilii*) fed extruded diets containing different levels of protein and lipid. *Aquaculture*. 1999;179(1-4):25-33.
19. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Producción de Pesca y Acuicultura [Internet]. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-pesquera>
20. Hertrampf JW, Piedad-Pascual F. Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2000. Disponible en:

<http://link.springer.com/10.1007/978-94-011-4018-8>

21. Cruz-Castellón CA. Sustitución del aceite de pescado en piensos para *Seriola dumerili* (Pisces: Carangidae): Efectos en el crecimiento, parámetros nutritivos, composición corporal y calidad del filete. [tesis de maestría]. Valencia (España): Universidad Politecnica de Valencia; 2015.
22. Paz S. Alimento para animales a partir de desechos marinos: Elena Palacios Mechetnov. Agencia informativa CONACYT [Internet]. 2015; Disponible en: <http://www.conacytprensa.mx/index.php/centros-conacyt/1910-producen-alimento-animal-a-partir-de-desechos-marinos>
23. Escamilla-Montes R, Diarte-Plata G, Luna-González A, Fierro-Coronado JA, Esparza-Leal HM, Granados-Alcantar S, et al. Ecology, Fishery and Aquaculture in Gulf of California, Mexico: Pen Shell *Atrina maura* (Sowerby, 1835). En: Organismal and Molecular Malacology [Internet]. InTech; 2017. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/organismal-and-molecular-malacology/ecology-fishery-and-aquaculture-in-gulf-of-california-mexico-pen-shell-atrina-maura-sowerby-1835->
24. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural P y A. Acuerdo por el que se da a conocer la Actualización de la Carta Nacional Pesquera. Diario Oficial de la Federación. el 24 de agosto de 2012;38-85.
25. Soria G, Lavín MF, Martínez-Tovar I, Macías-Duarte A. Recruitment of catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) larvae on artificial collectors off the NE coast of the

- Gulf of California. *Aquac Res.* 2013;44(9):1383-98.
26. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural P y A. Boletín Pesquero y Acuícola de Mayo 2017 [Internet]. Conapescacomunica. 2017. Disponible en: https://issuu.com/conapescacomunica/docs/mayo_2017
27. Arvanitoyannis IS, Kassaveti A. Fish industry waste: Treatments, environmental impacts, current and potential uses. *Int J Food Sci Technol.* 2008;43(4):726-45.
28. Espinosa-Chaurand LD., Silva-Loera A, García-Esquivel Z, López-Acuña LM. Uso de harina de cabeza de camarón como reemplazo proteico de harina de pescado en dietas balanceadas para juveniles de *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890). *Lat Am J Aquat Res.* 2015;43(3):457-65.
29. Wang Y, Yu S, Wang Y, Che J, Zhao L, Bu X, et al. Effect of replacing fish meal with soybean meal on growth, feed utilization and nitrogen and phosphorus excretion of juvenile *Pseudobagrus ussuriensis*. *Aquac Res.* 2015;47(10):3145-55.
30. Sánchez-Rodríguez JE. Efecto de la sustitución parcial de la harina de pescado por una mezcla de krill-soya en la dieta de juveniles de pargo *Lutjanus guttatus* (Steindacher, 1869). [tesis de maestría]. D.F. (México): Universidad Nacional Autónoma de México; 2013.
31. Hernández-Flores G. Efectos de la sustitución total de harina de pescado con harina de soya (*Glycine maxima*) y polvo de *Spirulina* en juveniles de especies acuícolas de importancia comercial. Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.
32. López, Lus M. Flores-Ibarra, Maricela. Bañuelos-Vargas,

- Isaura. Galaviz, Mario A. True CD. Effect of fishmeal replacement by soy protein concentrate with taurine supplementation on growth performance, hematological and biochemical status, and liver histology of totoaba juveniles (*Totoaba macdonaldi*). *Fish Physiol Biochem.* 2015;41(4):921-36.
33. Anderson AD, Alam MS, Watanabe WO, Carroll PM, Wedegaertner TC, Dowd MK. Full replacement of menhaden fish meal protein by low-gossypol cottonseed flour protein in the diet of juvenile black sea bass *Centropristis striata*. *Aquaculture* [Internet]. 2016;464:618-28. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.006>
34. Botello-León A, Viana MT, Téllez-Girón E, Pullés-Ariza E, Cisneros-López M, Solano-Silveira G, et al. Sustitución de la harina de pescado por harina de caña proteínica para la engorda de tilapia roja. *Agrociencia.* 2011;45(1):23-31.
35. Olvera-Novoa MA, Martínez-Palacios CA, Olivera-Castillo L. Utilization of torula yeast (*Candida utilis*) as a protein source in diets for tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) fry. *Aquac Nutr.* 2002;8(4):257-64.
36. Kuhn DD, Boardman GD, Lawrence AL, Marsh L, Flick GJ. Microbial floc meal as a replacement ingredient for fish meal and soybean protein in shrimp feed. *Aquaculture.* 2009;296(1-2):51-7.
37. Torres-Ocampo SY. Sustitución de harina de pescado con harina de lombriz de tierra (*Eisenia foetida*) en dietas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). [tesis de licenciatura]. Estado de México (México): Universidad

Nacional Autónoma de México; 2012.

38. Sealey WM, Hardy RW, Barrows FT, Pan Q, Stone DAJ. Evaluation of 100% Fish Meal Substitution with Chicken Concentrate, Protein Poultry By-Product Blend, and Chicken and Egg Concentrate on Growth and Disease Resistance of Juvenile Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J World Aquac Soc.* 2011;42(1):46-55.
39. Zapata DB, Lazo JP, Herzka SZ, Viana MT. The effect of substituting fishmeal with poultry by-product meal in diets for *Totoaba macdonaldi* juveniles. *Aquac Res.* 2014;47(6):1778-89.
40. Jamil K, Abbas G, Akhtar R, Lin H, Li Z. Effects of replacing fishmeal with animal by-products meal supplementation in diets on the growth and nutrient utilization of mangrove red snapper. *J Ocean Univ China.* 2007;6(3):292-8.
41. Martínez-Contreras TM. Evaluación del crecimiento de juveniles del bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) alimentado con desechos del procesado del calamar. [tesis de maestría]. Manzanillo, Colima. (México): Universidad de Colima; 1999.
42. Toyas-Vargas E, Calderón-de la Barca AM, Duran-Encinas Y, Palacios E, Civera-Cerecedo R. Marine co-product meals as a substitute of fishmeal in diets for white shrimp *Litopenaeus vannamei* improve growth, feed intake and muscle HUFA composition. *Aquac Res.* 2016;48(7):3782-800.
43. Licona-Jain AB. Respuesta al estrés y calidad bioquímica post-mortem del camarón en relación a la inclusión de subproductos pesqueros en el alimento. [tesis de

- maestría]. La Paz, B.C.S. (México): Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.; 2015.
44. Toyés-Vargas EA. Aprovechamiento de subproductos marinos para la alimentación de camarón de cultivo y gallinas ponedoras. [tesis de doctorado]. La Paz, B.C.S. (México): Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.; 2016.
45. Kissinger KR, García-Ortega A, Trushenski JT. Partial fish meal replacement by soy protein concentrate, squid and algal meals in low fish-oil diets containing *Schizochytrium limacinum* for longfin yellowtail *Seriola rivoliana*. *Aquaculture* [Internet]. 2016;452:37-44. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.022>
46. Herrera-Castillo NM. Efecto de la sustitución de la harina de pescado por una mezcla vegetal y animal en piensos, en el crecimiento y composición nutricional de *Seriola dumerili*. [tesis de maestría]. Valencia (España): Universidad Politécnica de Valencia; 2015.
47. Gallardo-Álvarez FJ. Partial and total replacement of fishmeal by a blend of animal and plant proteins in diets for *Seriola dumerili*: Effects on performance and nutrient efficiency [Internet]. [tesis de maestría]. Valencia (España): Universidad Politécnica de Valencia; 2015. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/anu.12655>
48. Horwitz W, Latimer GW, editores. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18a ed. GAITHERSBURG, MARYLAND, USA: AOAC International; 2005.
49. Nutrion software. Chapala, Jalisco, México;

50. Civera R, Guillaume J. Effect of sodium phytate on growth and tissue mineralization of *Penaeus japonicus* and *Penaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture*. 1989;77(2-3):145-56.
51. Rodak BF, Carr JH. Atlas de Hematología Clínica [Internet]. 4a ed. Editorial Médica Panamericana, editor. Atlas de Hematología Clínica. 2014. 1-10 p. Disponible en: <http://www.herrerobooks.com/pdf/PAN/9786079356156.pdf>
52. Pierson F. Laboratory techniques for avian hematology. En: Feldman, B.F., Zinkle, J.G., Jain NC, editor. Schalm's veterinary hematology. 5a ed. Baltimore, Maryland, USA.: Lippincott Williams and Wilkins; 2000. p. 1145-6.
53. OIE. Aspectos relativos al bienestar en el aturdimiento y la matanza de peces de cultivo para consumo humano. En: OIE, editor. Código sanitario para los animales acuáticos. 20a ed. 2017. p. 1-4.
54. Media Cybernetics I. Image Pro Plus. Rockville,MD,USA;
55. Systat Software I. SigmaScan-Pro5. San Jose, California,USA;
56. Stat Soft I. Statistica 8.0. Tulsa, Oklahoma, EUA;
57. Cifuentes Roberto, González Jorge, Montoya Germán, Jara Alfonso, Ortíz Néstor, Piedra Priscila HE. Relación longitud-peso y factor de condición de los peces nativos del río San Pedro (cuenca del río Valdivia , Chile). *Gayana Espec*. 2012;101-10.
58. Froese BR. Cube law , condition factor and weight - length relationships: history , meta-analysis and recommendations. *J Appl Ichthyol*. 2006;22:241-53.
59. Makkar HPS. Antinutritional factors in foods for

- livestock. Occasional. Gill M, Owen E, Pollot GE, Lawrence TLJ, editores. Animal Production in Developing Countries. British Society of Animal Production; 1993. 69-85 p.
60. Romero-Geraldo R de J. Estudio de la expresión diferencial de genes en el ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), como respuesta a la exposición a un dinoflagelado productor de toxinas marinas de tipo diarreico. [tesis de doctorado]. La Paz, B.C.S. (México): Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.; 2013.
61. Bardouil M, Bohec M, Cormerais M, Bougrier S, Lassus P. Experimental study of the effects of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *J Shellfish Res.* 1993;12(January):417-22.
62. Bauder AG, Cembella A. Viability of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* following ingestion and gut passage in the bay scallop *Argopecten irradians*. Vol. 19, *Journal of Shellfish Research.* 2000. 321-324 p.
63. Bauder AG, Cembella AD, Bricelj VM, Quilliam MA. Uptake and fate of diarrhetic shellfish poisoning toxins from the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the bay scallop *Argopecten irradians*. *Mar Ecol Prog Ser.* 2001;213(May 2014):39-52.
64. Shumway SE, Cucci TL. The effects of the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* on the feeding and behaviour of bivalve molluscs. *Aquat Toxicol.* 1987;10(1):9-27.
65. Viviani R. Eutrophication, marine biotoxins, human health. En: *Marine Coastal Eutrophication.* Bologna, Italy:

- Elsevier; 1992. p. 631-62.
66. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Biotoxinas marinas. Vol. 2, Food Science and Technology International. Roma, Italia; 2005.
 67. Scoging AC. Illnes asociated with seafood. Londres England; 1991.
 68. Larsson Å, Fänge R. Cholesterol and free fatty acids (FFA) in the blood of marine fish. Comp Biochem Physiol -- Part B Biochem. 1977;57(3):191-6.
 69. Maita M, Aoki H, Yamagata Y, Satoh S, Okamoto N, Watanabe T. Plasma Biochemistry and Disease Resistance in Yellowtail Fed a Non-Fish Meal Diet. Fish Pathol. 1998;33(2):59-63.
 70. Maita M, Maekawa J, Satoh KI, Futami K, Satoh S. Disease resistance and hypocholesterolemia in yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed a non-fishmeal diet. Fish Sci. 2006;72(3):513-9.
 71. Wedemeyer GA, McLeay D. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. G.A. Wedemeyer DM, editor. Academic Press; 1981.
 72. Cunningham JG, Klein BG. Fisiología Veterinaria. 4a ed. España: Elsevier; 2009.
 73. Fernandez J, Candenas M, Souto M, Trujillo M, Norte M. Okadaic Acid, Useful Tool for Studying Cellular Processes. Curr Med Chem [Internet]. el 1 de enero de 2002;9(2):229-62. Disponible en: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&iissn=0929-8673&volume=9&issue=2&spage=229>

74. Clauss TM, Dove ADM, Arnold JE. Hematologic Disorders of Fish. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* [Internet]. septiembre de 2008;11(3):445-62. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1094919408000212>
75. Hlavová V. Reference values of the haematological indices in grayling (*Thymallus thymallus linnaeus*). *Comp Biochem Physiol -- Part A Physiol*. 1993;105(3):525-32.
76. Núñez-Ochoa L, Bouda J. *Patología clínica veterinaria*. México, D.F.: UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2007.
77. Trejo-Escamilla I, Galaviz MA, Flores-Ibarra M, Álvarez González CA, López LM. Replacement of fishmeal by soya protein concentrate in the diets of *Totoaba macdonaldi* (Gilbert, 1890) juveniles: effect on the growth performance, in vitro digestibility, digestive enzymes and the haematological and biochemistry parameters. *Aquac Res*. 2017;48(8):4038-57.
78. Falaye AE, Emikpe BO, Ogundipe ET, Oyebanji VO. Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus Plantarum* on survival, hematological profile and histopathology of selected organs of *Clarias gariepinus* fingerlings. *Comp Clin Path* [Internet]. 2017;26(1):61-9. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00580-016-2346-6>
79. Campbell TW. Hematology of fish. En: DB T, editor. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. 2a ed. Baltimore; 2004. p. 277.
80. Ainsworth AJ. Fish granulocytes: Morphology, distribution, and function. *Annu Rev Fish Dis* [Internet]. enero de

- 1992;2:123-48. Disponible en:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/095980309290060B>
81. Atencio-García V, Genes López F, en Acuícultura P, Madariaga Mendoza D, Pardo Carrasco S. Hematology and Blood Chemistry of Juveniles Rubio (*Salminus affinis* Pisces: Characidae) Captured in the River Sinú. *Acta biol Colomb.* 2007;12:27-40.
82. Hörmannspenger G, Haller D. Molecular crosstalk of probiotic bacteria with the intestinal immune system: Clinical relevance in the context of inflammatory bowel disease. *Int J Med Microbiol.* 2010;300(1):63-73.
83. Austin B. The Bacterial Microflora of Fish, Revised. *Sci World J* [Internet]. 2006;6:931-45. Disponible en:
<http://www.hindawi.com/journals/tswj/2006/325830/abs/>
84. Johansson ME V, Sjövall H, Hansson GC. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nat Rev Gastroenterol & Hepatol* [Internet]. el 12 de marzo de 2013;10:352. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2013.35>
85. Van der Marel M, Pröpsting MJ, Battermann F, Jung-Schroers V, Hübner A, Rombout JHWM, et al. Differences between intestinal segments and soybean meal-induced changes in intestinal mucus composition of common carp *Cyprinus carpio* L. *Aquac Nutr.* 2014;20(1):12-24.
86. Pullan RD, Thomas GA, Rhodes M, Newcombe RG, Williams GT, Allen A, et al. Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut* [Internet]. el 1 de marzo de 1994;35(3):353 LP-359.

Disponibile en:
<http://gut.bmj.com/content/35/3/353.abstract>

87. Bosi G, Shinn AP, Giari L, Simoni E, Pironi F, Dezfuli BS. Changes in the neuromodulators of the diffuse endocrine system of the alimentary canal of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), naturally infected with *Eubothrium crassum* (Cestoda). *J Fish Dis.* 2005;28(12):703-11.
88. Van Der Marel M, Schroers V, Neuhaus H, Steinhagen D. Chemotaxis towards, adhesion to, and growth in carp gut mucus of two *Aeromonas hydrophila* strains with different pathogenicity for common carp, *Cyprinus carpio* L. *J Fish Dis.* 2008;31(5):321-30.
89. Zhang J, Yang R, Yang X, Fan Q, Wei K, Wang W. Ontogeny of the digestive tract in mud loach *Misgurnus anguillicaudatus* larvae. *Aquac Res.* 2016;47(4):1180-90.
90. Bansemer MS, Forder REA, Howarth GS, Suitor GM, Bowyer J, Stone DAJ. The effect of dietary soybean meal and soy protein concentrate on the intestinal mucus layer and development of subacute enteritis in Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*) at suboptimal water temperature. *Aquac Nutr.* 2015;21(3):300-10.
91. Hamlin HJ, Von Herbing IH, Kling LJ. Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. *J Fish Biol.* 2000;57(3):716-32.
92. Marchetti L, Capacchietti M, Sabbieti MG, Accili D, Materazzi G, Menghi G. Histology and carbohydrate histochemistry of the alimentary canal in the rainbow

- trout *Oncorhynchus mykiss*. *J Fish Biol.* 2006;68(6):1808-21.
93. Urán PA, Schrama JW, Rombout JHWM, Taverne-Thiele JJ, Obach A, Koppe W, et al. Time-related changes of the intestinal morphology of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., at two different soybean meal inclusion levels. *J Fish Dis.* 2009;32(9):733-44.
94. Chen Y, Zhu X, Yang Y, Han D, Jin J, Xie S. Effect of dietary chitosan on growth performance, haematology, immune response, intestine morphology, intestine microbiota and disease resistance in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Aquac Nutr.* 2014;20(5):532-46.
95. Yan, J., Guo, C., Dawood, M.A.O., Gao J. Effects of dietary chitosan on growth , lipid metabolism , immune response and antioxidant-related gene expression in *Misgurnus anguillicaudatus*. *Benef Microbes.* 2017;8(3):439-49.
96. Reifel CW, Travill AA. Structure and carbohydrate histochemistry of the intestine in ten teleostean species. *J Morphol* [Internet]. 1979;162(3):343-59. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/jmor.1051620305>
97. Theilacker GH, Watanabe Y. Midgut Cell Height Defines Nutritional Status of Laboratory Raised Larval Northern Anchovy , *Engraulis mordax*. *Fish Bull.* 1989;87:457-69.
98. Chen BN, Qin JG, Carragher JF, Clarke SM, Kumar MS, Hutchinson WG. Deleterious effects of food restrictions in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* during early development. *Aquaculture.* 2007;271(1-4):326-35.
99. Merrifield DL, Dimitroglou A, Bradley G, Baker RTM, Davies SJ. Soybean meal alters autochthonous microbial

- populations, microvilli morphology and compromises intestinal enterocyte integrity of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis.* 2009;32(9):755-66.
100. Van den Ingh TSGAM, Krogdahl Å, Olli JJ, Hendriks HGCJM, Koninkx JGJF. Effects of soybean-containing diets on the proximal and distal intestine in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a morphological study. *Aquaculture.* 1991;94(4):297-305.
101. Sheppard M. *A Photographic Guide to Diseases of Yellowtail (Seriola) Fish.* Nanaimo, British Columbia, Canada: Quadra Printers Ltd; 2004.
102. Altschul AM, Wilcke HL. New Protein Food. En: Campbell MF, Kraut CW, Yackel WC, Yang SH, editores. *Food Science and Technology.* Volume 5. Orlando, Florida: Academic Press; 1985. p. 302-4.
103. Francis G, Makkar HPS, Becker K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture.* 2001;199:197-227.
104. Gallardo MÁ, Sala-Rabanal M, Ibarz A, Padrós F, Blasco J, Fernández-Borràs J, et al. Functional alterations associated with "winter syndrome" in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture.* 2003;223(1):15-27.
105. Sala-Rabanal M, Sanchez J, Ibarz A, Fernandez-Borras J, Blasco J, Gallardo MA. Effects of low temperatures and fasting on hematology and plasma composition of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol Biochem.* 2003;29(2):105-15.
106. Bowyer JN, Qin JG, Adams LR, Thomson MJS, Stone DAJ. The

- response of digestive enzyme activities and gut histology in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) to dietary fish oil substitution at different temperatures. *Aquaculture*. 2012;368-369:19-28.
107. Van Apeldoorn ME. Diarrhoeic shellfish poisoning. Agosto; 1998.
108. Núñez-Vázquez EJ, Cordero-Tapia A, Ochoa JL, Bustillos J. Histopatología por exposición aguda a las biotoxinas marinas de importancia en la salud pública en México. En: Congreso Nacional de Patología Veterinaria. Veracruz; 2008.
109. Valdiglesias V, Prego-Faraldo MV, Paáaro E, Méndez J, Laffon B. Okadaic Acid: More than a diarrheic toxin. *Mar Drugs*. 2013;11(11):4328-49.
110. Mello H de., Moraes JRE, Garcia-Niza I, de Moraes FR, Ozório ROA, Tie Shimada M, et al. Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. *Pesq Vet Bras* [Internet]. 2013;33(6):724-30. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2013000600006>.
111. Segner, H., Witt U. Weaning experiments with turbot (*Scophthalmus maximus*): Electron microscopic study of liver. *Mar Biol*. 1990;05(3):353-61.
112. Caballero M.J., Lopez-Calero G. S, J., Roo F.J. IMS and AJ, Fernandez. Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*. 1999;179:277-90.
113. Mosconi-bac N. Reversibility of artificial feed-induced hepatocyte disturbances in cultured juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*): an ultrastructural study.

- Aquaculture. 1990;88:363-70.
114. Ferguson H. Systemic pathology of fish. 2a ed. Scotian, editor. Canada; 2006. 278 p.
 115. Rosenthal N. Sandra, Sandoval C. Nieves, C.Gavidia C, Tabacchi N. L. Frecuencia de lipidosis hepática en Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de fase juvenil en una piscigranja de la Sierra Central de Perú. Rev Inv Vet Perú. 2013;24(1):118-24.
 116. Genc, Ercument. Yilmaz, Erdal. Akyurt I. Effects of dietary fish oil, soy-acid oil, and yellow grease on growth and hepatic lipidosis of hybrid Tilapia fry. Isr J Aquac. 2005;53(2):90-6.
 117. Erdal Y EG. Effects of alternative dietary lipid sources (Soyacid oil and yellow grease) on growth and hepatic lipidosis of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerling: A preliminary study. Turkish J Fish Aquat Sci. 2006;6:32-42.
 118. Triana-García PA, Gutierrez-Espinosa, Mariana C. PRE-M. Rendimiento productivo e hígado graso en tilapia híbrida (*Oreochromis spp*): Influencia de dos fuentes de lípidos Productive performance and fatty liver in hybrids of red tilapia (*Oreochromis spp*): Effects of two dietary lipid sources Desempenho produt. Orinoquia. 2013;17(2):183-96.
 119. Spisni E, Tugnoli M, Ponticelli A, Mordenti T, Tomasi V. Hepatic steatosis in artificially fed marine teleosts. J Fish Dis. 1998;21(3):177-84.
 120. Caballero MJ, Socorro J, Roo FJ, Izquierdo MS, Fernandez AJ. Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*).

- Aquaculture. 1999;179:277-90.
121. Rodríguez-Barreto D, Jerez S, Cejas JR, Martin M V., Acosta NG, Bolaños A, et al. Comparative study of lipid and fatty acid composition in different tissues of wild and cultured female broodstock of greater amberjack (*Seriola dumerili*). Aquaculture. 2012;360-361:1-9.
 122. Hu L, Yun B, Xue M, Wang J, Wu X, Zheng Y, et al. Effects of fish meal quality and fish meal substitution by animal protein blend on growth performance, flesh quality and liver histology of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). Aquaculture. 2013;372-375:52-61.
 123. Hernández AB. Valor Nutritional de subproductos de origen marino en alimentos para juveniles de Jurel (*Seriola rivoliana*). [tesis de doctorado]. La Paz, B.C.S. (México): Centro de Investigaciones Biológica del Noroeste, S.C.; 2018.
 124. Siwicki AK, Anderson DP, Rumsey GL. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Vet Immunol Immunopathol. 1994;41(1-2):125-39.
 125. Serrano E, Storebakken T, Borquez A, Penn M, Shearer KD, Dantagnan P, et al. Histology and growth performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to increasing dietary concentration of sparteine, a common alkaloid in lupins. Aquac Nutr. 2012;18(3):313-20.

10 ANEXOS

10.1 Anexo 1: Tinción de Wright

Tinción Wright	
1.	Agregar colorante Wright (HYCEL®, Guadalajara, México) dejar actuar 8 minutos
2.	Agregar sustancia amortiguadora (fosfato disódico y fosfato monopotásico) (HYCEL®, Guadalajara, México) para homogenizar dejar actuar 8 minutos
3.	Enjuagar con agua corriente
4.	Secar con un algodón el frotis

10.2 Anexo 2: Formulación de la solución Davidson para un galón stock

REACTIVO	CANTIDAD ml
Glicerina	400 ml
Formaldehído al 37-40%	800 ml
Alcohol etílico 96%	1200 ml
*Agua de mar filtrada	1200 ml

10.3 Anexo 3: Técnica de inclusión en parafina

<p style="text-align: center;">FIJACION</p> <p>Tiempo de preparación de fijadores: 2 h.</p>	<p>1. Solución Davidson para organismos marinos, durante 48h.</p>
<p style="text-align: center;">DESHIDRATACIÓN</p> <p>Tiempo de tejidos grandes 9.5 h</p>	<p>2. Cambiar a alcohol etílico al 70% transcurridas las 48h.</p>
<p style="text-align: center;">INFILTRACIÓN EN PARAFINA</p> <p>Tiempo total 8.5 h</p>	<p>3. Alcohol etílico 70%, I y II veces (1h c/u)</p>
	<p>4. Alcohol etílico 80° (1h)</p>
	<p>5. Alcohol etílico 90° (1h)</p>
	<p>6. Alcohol etílico 96°, I y II veces (1h c/u)</p>
	<p>7. Alcohol etílico 100° I, II, III veces (1h c/u)</p>
	<p>8. Mezcla de alcohol etílico absoluto-xilol (1:1) 20 minutos</p>
	<p>9. Xilol absoluto (100 %) 5-10 minutos</p>
	<p>10. Parafina-xilol (1:1) 30 min. (tiempo crítico, no dejar más tiempo)</p>
	<p>11. Parafina (Paraplast) I, (1 a 2h.)</p>
	<p>12. Parafina (Paraplast) II, (1 a 2h.)</p>
	<p>13. Parafina (Paraplast) III, (1 a 2h.)</p>
	<p>14. Parafina (Paraplast) IV, (1 a 2h.)</p>

10.4 Anexo 4: Técnica de tinción Hematoxilina eosina (Harris)

Técnica de tinción Hematoxilina eosina (Harris).
1. Xilol (3 repeticiones) 10 min c/u.
2. Alcohol etílico 96%, 70% (2 repeticiones) 2 min c/u.
3. Agua destilada 5 min.
4. Hematoxilina Harris (HYCEL®, Guadalajara, México), 4 min.
5. Agua corriente 5 min.
6. Agua destilada 5 min.
7. Alcohol ácido 10-15 segundos (1 L alcohol 96% con 5 gotas de ácido clorhídrico).
8. Agua destilada 5 min.
9. Agua amoniacal 10-15 segundos (hidróxido de amonio, 5 gotas por caja de tinción).
10. Agua destilada 5 min.
11. Alcohol etílico 50% y 70%, 2 min c/u.
12. Eosina-Floxina alcohólica (HYCEL®, Guadalajara, México), 3 min.
13. Alcohol 96% (2 repeticiones) 1-2 min c/u.
14. Alcohol 100% (2 repeticiones) 1 min c/u.
15. Citrisolv (3 repeticiones) (sustituto de xileno ó Hemo-De) 5 min c/u.
16. Montar en resina sintética.

10.5 Anexo 5: Técnica de tinción azul alciano-Schiff

Técnica de tinción azul alciano-Schiff
1. Desparafinar e hidratar los cortes con agua destilada.
2. Teñir con azul alciano, (HYCEL®, Guadalajara, México) durante 30 min.
3. Lavar en agua destilada durante 2 minutos.
4. Pasar los cortes al ácido peryódico al 0.5%, durante 10 minutos.
5. Lavar en agua corriente durante 5 minutos y enjuagar con agua destilada.
6. Pasar los cortes por el reactivo de Schiff, durante 30 minutos en el refrigerador.
7. Pasar los cortes a la solución sulfurosa, haciendo tres cambios, de dos minutos cada uno (tres recipientes diferentes).
8. Lavar con agua corriente durante 5 minutos.
9. Teñir con Hematoxilina de Harris por 5 minutos (después de este punto pasar al teñidor automático)
10. Lavar con agua destilada por 2 minutos.
11. Deshidratar con alcohol de 96° una sola vez y con alcohol etílico absoluto con 2 repeticiones por 5 minutos en cada uno.
12. Aclarar en tres cambios de citrisol v durante 5 minutos c/u.
13. Montar con resina sintética o entellan.