



Posgrado en ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



**EFFECTOS DE LA VITAMINA C SOBRE LA REPRODUCCIÓN,
CRECIMIENTO, SUPERVIVENCIA Y RESPUESTAS AL ESTRÉS EN EL PEZ
BLANCO DE PÁTZCUARO, *Menidia estor* (Jordan 1880)**

T E S I S

que para obtener el grado académico de

Doctor en Ciencias
(Biología Marina)

P r e s e n t a

MARÍA GISELA RÍOS DURÁN

Director de Tesis: Dr. CARLOS A. MARTÍNEZ PALACIOS

Comité Tutorial: Dra. Martha Gabriela Gaxiola Cortés
 Dra. Ruth Pedroza Islas
 Dr. Kim Jauncey

México D. F., 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

El presente trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo económico de:

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP).

SAGARPA-CONACYT, mediante el proyecto N° 2002-C01-261 “Desarrollo de las bases técnicas y científicas para el cultivo del pez blanco de Chapala (*Chirostoma promelas*) y Pátzcuaro (*Chirostoma estor estor*)”

Fondos Mixtos CONACYT-Gobierno del estado de Michoacán, mediante el proyecto Mich-2003 C01-12314 “Transferencia tecnológica para el cultivo semi-intensivo del Pez blanco de Pátzcuaro”.

The British Council, mediante el Proyecto: “Development of sustainable aquaculture of an endangered fish species, *Chirostoma estor estor*, in a marginalized and impoverished indigenous community from Pátzcuaro, Central Mexico”.

Gracias al apoyo mediante asesoría científica y técnica:

Dr. Carlos Antonio Martínez palacios, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México

Dra. Ruth Pedroza Islas, Universidad Iberoamericana, México

Dra. Gabriela Gaxiola Cortés, Facultad de Ciencias, UNAM, México

Dra. Zsuzsanna Papp, Research Institute of Fisheries, Aquaculture and Irrigation (HAKI), Zsarvas, Hungría

M. en C. Irma Martínez, CIAD, Mazatlán, México

Dr. Ilie Racotta Dimitrov, CIBNOR, Méxco

Dra. Elena Palacios Metchenov, CIBNOR, México

Dr. Benn North, Institute of Aquaculture, University of Stirling, Escocia

Allan Porter, Institute of Aquaculture, University of Stirling, Escocia

Dr. Kim Jauncey, Institute of Aquaculture, University of Stirling, Escocia

Dr. Gerard Cuzon, Centro Oceanológico de Tahiti, Ifremer, Francia.

Dr. Dominique Bureau, University of Guelph, Canadá.

Gracias al apoyo en el suministro de materias primas (vitaminas, minerales, aglutinantes, etc.) y de Nitrógeno líquido:

DSM Nutritional Products, México

Dr. Jesús Zendejas, Purina, Agribrand, México

Dr. Francisco Negrete, DSM Nutritional Products, México

Dra. Ruth Pedroza Islas, Universidad Iberoamericana, México

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México

Gracias al trabajo en conjunto con:

Biol. Ana Rosa Hernández Téllez

M.V.Z. María Eugenia Reynoso Madrigal

Manuel Alejandro Caballero

Erika Flores Sedano

Gracias al apoyo con Infraestructura y material Biológico:

Laboratorio de Nutrición y Acuicultura, Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Pescadores Indígenas Puhépechas del Lago de Pátzcuaro: Mauricio Dolores Ponciano, Juana Cira Ceras, Eleodoro Dolores Cira y Familia.

Gracias al apoyo económico para actividades académicas y equipo de cómputo:

Universidad Nacional Autónoma de México, Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP)

Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México

Laboratorio de Nutrición y Acuicultura, Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Gracias al apoyo del personal de la coordinación del Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología:

Dr. Martín Merino Ibarra

Dra. Gloria Vilaclara

Norma Suazo

Diana Juárez

Guadalupe Godoy

Gabriela Almaraz

Chantal Ruiz

Gracias al apoyo incondicional de:

Dr. Carlos A. Martínez Palacios

Dra. Elva Mayra Toledo Cuevas

Dr. Martín Merino Ibarra

M. Sc. Víctor Manuel Peredo Álvarez

Dra. Aurora Orsechovski Rayo

Gracias a todos aquellos que de alguna manera hicieron posible la realización de este trabajo

Contenido

Agradecimientos	i
Resumen	iv
Abstract	vi
Introducción general	1
Capítulo 1 Efectos del estrés por transporte en los niveles de ácido ascórbico en tejidos de pez blanco de Pátzcuaro (<i>Menidia estor</i> Jordan 1880)	19
Capítulo 2 Efecto del uso de <i>Artemia franciscana</i> adulta congelada enriquecida con vitamina C como suplemento alimenticio sobre la reproducción del pez blanco	37
Capítulo 3 Efecto del uso de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> enriquecidos con diferentes niveles de vitamina C sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de pez blanco de Pátzcuaro (<i>Menidia estor</i> Jordan 1880)	71
Capítulo 4 Evaluación de los requerimientos de vitamina C en juveniles de pez blanco de Pátzcuaro (<i>Menidia estor</i> Jordan 1880)	91
Capítulo 5 Efectos del nivel de vitamina C de la dieta sobre las concentraciones de ácido ascórbico del hígado en juveniles de pez blanco <i>Menidia estor</i> (Jordan 1880) sometidos a estrés por hipoxia aguda	121
Discusión general y Conclusiones	149
Bibliografía general	159
Anexo	168

Resumen

El pez blanco de Pátzcuaro (*Menidia estor*), especie nativa de la meseta central de México de gran importancia económica y cultural, se encuentra en peligro debido a problemas como la contaminación, la introducción de especies exóticas y la sobrepesca. Se ha propuesto la acuicultura como una alternativa para recuperar sus poblaciones naturales, así como para generar ingresos a las familias que dependen actualmente de su pesquería, que se encuentra en franca disminución. *M. estor* tiene gran potencial para su cultivo; sin embargo, los estudios que se han llevado a cabo hasta la fecha son aún insuficientes, sobre todo en lo que respecta a sus requerimientos nutricionales.

Actualmente se produce a nivel piloto, pero aún se presentan problemas de deficiencias nutricionales, evidentes en signos como lordosis, escoliosis, hemorragias y exoftalmia, entre otros. Estos signos pueden presentarse por deficiencia de variedad de nutrientes, siendo la vitamina C uno de ellos. El presente trabajo se llevó a cabo con el fin de evaluar el estatus de la vitamina C en *M. estor* y los efectos del transporte sobre el mismo, estudiar los efectos de esta vitamina sobre el desempeño en cultivo, mediante la evaluación del crecimiento, la supervivencia, el desempeño reproductivo y las respuestas al estrés, así como determinar si los signos de deficiencia observados son causados por deficiencias de vitamina C. Para tal fin se llevaron a cabo cinco experimentos, con los cuales se tuvieron los siguientes encuentros: 1. En adultos silvestres de *Menidia estor*, niveles de ascorbato hepáticos superiores a 25.9 µg/g en hembras y 46.2 µg/g en machos, no reflejan signos de deficiencia y se sugiere que el estrés por transporte durante tres horas no influencia significativamente el estatus de vitamina C de esta especie. 2. No se observó un efecto significativo de la vitamina C sobre la fecundidad del pez blanco, en términos de número promedio de desoves y número de huevos producidos por desove, así como tampoco sobre la tasa de fertilización, aunque estos parámetros si se vieron afectados por la proporción sexual. Se presume que el nivel de vitamina C proporcionado a los reproductores no fue

suficiente para mejorar significativamente el desempeño reproductivo. 3. Se observó una relación positiva entre el nivel de ácido ascórbico y la supervivencia y el crecimiento de juveniles de *M. estor* alimentados con nauplios de *Artemia* enriquecida con esta vitamina, sin haber una presencia significativa de signos de deficiencia nutricionales en los peces. Niveles de vitamina C entre 345.82 y 509.45 $\mu\text{g g}^{-1}$ (base seca) en los nauplios de *Artemia* enriquecidos, serían apropiados para obtener un crecimiento y supervivencia óptimos en los juveniles de *M. estor*. 4. También se observó un efecto positivo del nivel de vitamina C sobre el crecimiento y la supervivencia de juveniles de *M. estor* alimentados con dietas artificiales. Se observaron signos de deficiencias nutricionales como erosión de aletas, hemorragias, exoftalmia, lordosis, escoliosis y malformaciones óseas, entre otros, las cuales tuvieron una mayor incidencia en los peces alimentados con los más bajos niveles de vitamina C. Con el uso de dietas artificiales se obtuvo un requerimiento de 255 mg Kg^{-1} , para tener mejores crecimientos y supervivencias. 5. Al utilizar dietas artificiales, las concentraciones de ácido ascórbico (AA) en el hígado de los juveniles de pez blanco están relacionadas positivamente con las concentraciones de AA de la dieta. El ácido ascórbico hepático muestra una tendencia incrementarse en los peces sometidos a estrés por hipoxia aguda en comparación con los peces no sometidos a estrés.

Los resultados obtenidos corroboran la importancia de la vitamina C de la dieta en el desempeño de *M. estor*. El presente estudio sienta bases importantes para el desarrollo de dietas artificiales idóneas que permitan el reemplazo del alimento vivo en el cultivo de esta especie y para el diseño de experimentos más detallados que permitan dilucidar el papel de la vitamina C en esta y otras especies de atherinópsidos.

Abstract

Mexican silverside (*Menidia estor*), a native fish of the Mexican Central plateau is a species of great economic and cultural importance. It is in danger due to problems as pollution, exotic species introduction and overfishing. Aquaculture has proposed as an alternative to recover its natural populations, as well as to generate income to the families who depend on its fishery, which is actually decreasing. *M. estor* has a great potential for culture; nevertheless, the studies carried out up to the date are still insufficient, especially regarding its nutritional requirements.

Nowadays, this species is produced at pilot level, but still there are nutritional problems, evident in deficiency signs such as lordosis, scoliosis, hemorrhages and exophthalmia, among others. These signs can appear because of the deficiency of a variety of nutrients, being the vitamin C one of them. The present work was carried out in order to: evaluate the vitamin C status in *M. estor* and the effects of the transportation on this status; study the effects of this vitamin on the culture performance, by means of the evaluation of growth, survival, reproductive performance and stress responses; and determine if the observed deficiency signs are caused by the lack of vitamin C. For such purpose, there were carried out five experiments, which offered the following results: 1. Hepatic ascorbate levels higher than 25.9 µg/g (females) and 46.2 µg/g (males), do not reflect signs deficiency signs in wild adults of *M. estor*; it is suggested that the transportation stress during three hours does not significantly influence the vitamin C status of this species. 2. There was not a significant effect of vitamin C on Mexican silverside fecundity, in terms of number of spawnings and number of eggs by spawning, as well as on fertilization rates; even though these parameters were affected by the sexual ratio. In this study it is presumed that the level of vitamin C provided to the broodstock was not enough to significantly improve the reproductive performance. 3. A positive relation was observed between ascorbic acid level and the survival and growth of juvenile *M. estor* fed on *Artemia* nauplii enriched with this vitamin; there were not a significant presence of nutritional deficiency signs in the fish.

Levels of nauplii vitamin C between 345.82 and 509.45 $\mu\text{g g}^{-1}$ (dry weight), would be adequate to obtain good growth and survival in juvenile *M. estor*. 4. Also it was observed a positive effect of the vitamin C level on the growth and survival of juvenile *M. estor* fed on artificial diets. There were observed nutritional deficiency signs, such as fin erosion, hemorrhages, exophthalmia, lordosis, scoliosis and bony malformations, among others; fish fed on the lowest levels of vitamin C showed higher incidence of such signs. Using artificial diets, a requirement of 255 mg Kg^{-1} was found to have better growth and survival. 5. Using artificial diets, the ascorbic acid (AA) concentrations in the liver of juvenile Mexican silverside is positively related to dietary AA concentrations. The hepatic ascorbic acid concentrations showed a trend to increase in the fish submitted to stress by acute hypoxia in comparison with the not stressed fish.

The obtained results corroborate the importance of the dietary vitamin C in the performance of *M. estor*. The present study offer important bases for the development of artificial suitable diets which allow the replacement of alive food in the culture of this species and the design of most detailed experiments that allow to explain the role of vitamin C in this and others atherinopsid species.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Introducción

La contribución del pescado al aporte total de proteínas animales para consumo humano se ha incrementado notablemente en las últimas décadas. En la actualidad, a nivel mundial, la acuicultura está creciendo más rápidamente que cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal, por lo que se ha situado como una fuente eficiente de proteína de alta calidad para la alimentación humana. El cultivo de peces ocupa el lugar más importante dentro de la producción mundial de la acuicultura y en los últimos años especialmente el cultivo de peces marinos ha ido en aumento (FAO, 2007). La piscicultura, además de aportar en la alimentación humana, puede ser utilizada como una alternativa para recuperar ciertas especies de peces en peligro, ya sea mediante redoblamiento de los cuerpos de agua o mediante el implemento de su cultivo como una alternativa para reducir la presión pesquera sobre las poblaciones naturales.

El pez blanco de Pátzcuaro (antes *Chirostoma estor*) recientemente propuesto como *Menidia estor* (Miller *et al.*, 2005), es una especie de agua dulce nativa de la meseta central de México. Es la especie principal en la pesquería artesanal en el lago de Pátzcuaro, siendo la base de subsistencia de los indígenas Puhépechas que habitan en sus riberas. Tiene una alta demanda en el mercado y un alto precio a nivel comercial, por lo que es una importante fuente de ingresos para la región. Sin embargo problemas como la contaminación, la introducción de especies exóticas y la sobrepesca han causado que las poblaciones naturales de esta especie estén declinando, poniéndola actualmente en peligro (Lyons *et al.*, 1998; Orbe-Mendoza, 2002; Rojas, 2003). La acuicultura se ha propuesto como una alternativa para recuperar esta especie y en la actualidad se está generando la tecnología para su cultivo (www.aquaculture.stir.ac.uk/GISAP/native-species). *M. estor* tiene gran potencial para su cultivo; sin embargo, los estudios que se han llevado a cabo hasta la fecha son aún insuficientes.

Debido a que *M. estor* es una especie de origen marino (Barbour, 1973), presenta algunas características similares a los peces marinos, como una marcada preferencia por el alimento vivo en lugar del alimento preparado inerte. Se ha observado que estos peces consumen el alimento inerte pero se presenta alta mortalidad y un reducido crecimiento. También se ha observado que el pez blanco es muy susceptible al estrés y pocos individuos soportan el manejo, lo cual se evidencia en alta mortalidad, inapetencia, reducido crecimiento y comportamientos anormales, como choques fuertes contra las paredes del tanque donde se encuentran confinados. Al proporcionar dietas artificiales también se han observado claros signos de deficiencias nutricionales, que pueden deberse a niveles inadecuados de micronutrientes como la vitamina C, tales como lordosis, escoliosis, malformaciones óseas, hemorragias y erosión de aletas, entre otros.

La vitamina C o ácido ascórbico (nombre dado a esta vitamina por su papel antiescorbútico) es un micronutriente sintetizado a partir de la glucosa y otros azúcares simples por las plantas y muchas especies de animales. Es una vitamina esencial para aquellos organismos que no pueden sintetizarla, quienes deben suplir sus requerimientos consumiéndola en la dieta. Pocos vertebrados como el hombre y otros primates, los cerdos de guinea, murciélagos frugívoros, algunas aves y varias especies de peces son incapaces de sintetizarla, debido a la falta de la enzima L-gulonolactona-oxidasa, que es la última enzima en la biosíntesis del ácido ascórbico a partir de la glucosa (Burns *et al*, 1956; Sato and Udenfriend, 1978; Chatterjee, 1978; Webster and Lim, 2002). Hasta el momento se desconoce si el pez blanco posee esta enzima y por consiguiente, la capacidad de sintetizar el ácido ascórbico.

Con el fin de conocer si los signos de deficiencias nutricionales observados en el cultivo de *M. estor* son causados por deficiencias de vitamina C en la dieta, además de buscar mejores desempeños reproductivos y mayor resistencia al estrés en los peces blancos cultivados, se llevaron a cabo diferentes experimentos en los cuales se evaluaron los efectos de esta vitamina sobre el crecimiento, supervivencia, la primera reproducción, y las respuestas al estrés de juveniles de esta especie, los cuales se exponen en el presente documento.

Antecedentes

El pez blanco de Pátzcuaro *Menidia estor* (Jordan 1880)

Aunque se han llevado a cabo varios intentos de cultivo a escala experimental de *M. estor* (Lara, 1974; Armijo y Sasso, 1976), las investigaciones básicas acerca de sus requerimientos para el cultivo han comenzado recientemente. De acuerdo a estudios anatómicos e histológicos se ha determinado que *M. estor* es un pez adaptado a la alimentación con zooplancton (Ross *et al.*, 2006) y se han obtenido importantes avances en el conocimiento de su fisiología, comportamiento alimenticio, reproducción y requerimientos nutricionales de proteína y ácidos grasos en cautiverio (Martínez-Palacios *et al.*, 2002a; Martínez-Palacios *et al.*, 2002b; Martínez-Palacios *et al.*, 2004; Avalos, 2006; Monroy, 2006; Martínez-Palacios *et al.*, 2006; Martínez-Palacios *et al.*, 2007; Palacios *et al.*, 2007). Actualmente se llevan a cabo varios estudios acerca de otros requerimientos nutricionales, biología molecular y respuestas al estrés, con el fin de establecer las condiciones óptimas para su cultivo; sin embargo los requerimientos de micronutrientes como las vitaminas y minerales de esta especie son desconocidos hasta el momento.

Vitamina C (ácido ascórbico)

Formas de ácido ascórbico

El ácido ascórbico forma parte del grupo de las vitaminas hidrosolubles, tiene la estructura más simple de todas las vitaminas (Figura 1) y se presenta en dos formas esteroisómeras: ácido L-ascórbico y ácido D-ascórbico (figura 2). La forma L- es la forma bioactiva de la vitamina C, mientras que la forma D- no es útil y es desechada por el organismo. Las fuentes naturales de vitamina C contienen únicamente la forma L-, mientras que la forma D- es pobremente retenida en los tejidos animales.

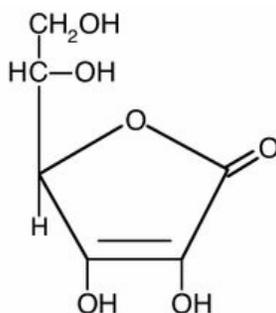


Figura 1. Fórmula estructural de la vitamina C o ácido ascórbico.

El ácido ascórbico es un fuerte agente reductor. Sus funciones bioquímicas y fisiológicas se derivan principalmente de sus propiedades reductoras, pues funciona como un aceptor de electrones. La pérdida de un electrón debido a interacciones con el oxígeno o iones metálicos produce un radical libre reactivo denominado semidehidro-L-ascorbato, que puede reducirse nuevamente a ácido L-ascórbico. Una reacción característica del ácido L-ascórbico es su oxidación a ácido dehidro-ascórbico, el cual a su vez puede ser reducido para generar ácido ascórbico activo nuevamente (figura 3) o ser oxidado y generar fragmentos inactivos sin actividad de vitamina C. Así el ácido ascórbico y el ácido dehidroascórbico forman un efectivo sistema redox (Seib & Tolbert, 1982; Null, 1994).

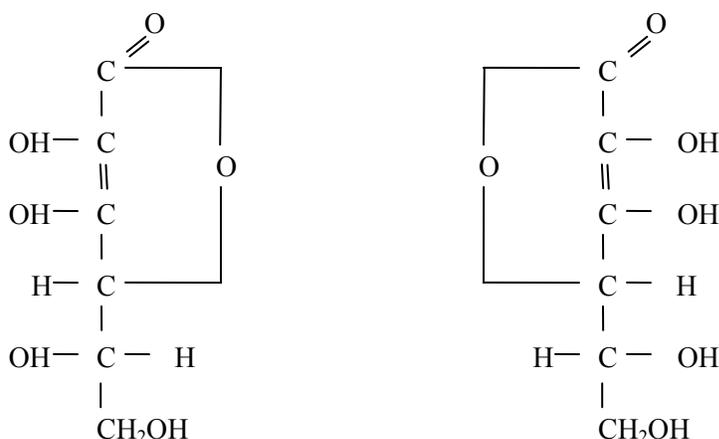


Figura 2. Estructuras del ácido L-ascórbico y ácido D-ascórbico.

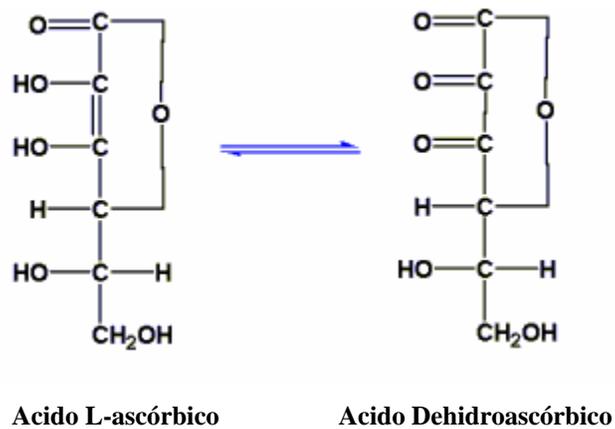


Figura 3. Sistema de oxido-reducción del ácido L-ascórbico y el ácido dehidroascórbico.

Funciones metabólicas de la Vitamina C

En los peces, como en otros organismos, el ácido ascórbico además de ser un importante antioxidante, también juega papeles importantes en diferentes funciones fisiológicas como el crecimiento, el desarrollo, la reproducción, las respuestas al estrés, la cicatrización de heridas, el metabolismo de los lípidos y del colesterol, el metabolismo del ácido fólico, y la absorción y transporte del hierro, entre otras (Lovell, 1998; Webster and Lim, 2002). Además juega un papel significativo en la respuesta inmune y la resistencia a enfermedades infecciosas en los peces, probablemente debido a sus propiedades antioxidantes.

La vitamina C no tiene funciones como coenzima, como lo hacen otras vitaminas hidrosolubles, pero actúa como cofactor en muchas reacciones que involucran enzimas de hidroxilación, como la síntesis de colágeno (Basabe, 2000) y la biosíntesis de corticosteroides y catecolaminas, hormonas que controlan las respuestas al estrés. Esta vitamina es requerida como un cosustrato en ciertas reacciones de oxidación; también es requerida junto con ATP en la incorporación de hierro del plasma (transferrina) a los tejidos (ferritina), al convertir el hierro de la forma oxidada o la forma reducida para el transporte metabólico. (Pond *et al.*, 1995; Lovell, 1998). Igualmente, la vitamina C es requerida en el metabolismo de la tirosina y es necesaria para la calcificación de los huesos (Lovell, 1998).

El ácido ascórbico también protege el ADN de las células del daño causado por radicales libres y mutágenos. Previene alteraciones genéticas nocivas dentro de las células y protege los linfocitos de mutaciones en los cromosomas. Esta vitamina, al parecer, combate los efectos de muchas toxinas, tales como el ozono, el monóxido de carbono, hidrocarburos, pesticidas y metales pesados, al estimular enzimas en el hígado que desintoxican el cuerpo (Null, 1994).

Síntesis de la Vitamina C

En los animales capaces de sintetizar el ácido ascórbico, éste es sintetizado a partir de la L-glucosa o la L-galactosa como parte de la vía metabólica del ácido glucurónico, el cual está involucrado en mecanismos de desintoxicación mediante la conjugación del ácido glucurónico con compuestos extraños (Hassan and Lehninger, 1956). La biosíntesis del ácido ascórbico parte del ácido gulónico, el cual sufre una lactonización enzimática catalizada por la L-gulonolactona hidrolasa; posteriormente ocurre una oxidación de la L-gulonolactona catalizada por la L-gulonolactona oxidasa, para obtener 2-keto-L-gulonolactona y por último ocurre una isomerización espontánea de este compuesto para dar origen al ácido ascórbico (Chatterjee *et al.*, 1960; Stubbs and Haufrect, 1968). La enzima L-gulonolactona-oxidasa (GLO), es la única enzima que no se encuentra en los animales susceptibles al escorbuto (Sato *et al.*, 1976) y por ello se considera como una enzima clave en la síntesis de ácido ascórbico en los animales. Los animales sin actividad de esta enzima son incapaces de sintetizar la vitamina C y por consiguiente dependen de una fuente dietética de esta vitamina para tener buena salud, adecuado crecimiento y un buen desempeño reproductivo (Moreau and Dabrowski, 2001).

Muchos vertebrados superiores pueden sintetizar la vitamina C debido a la presencia de la L-gulonolactona oxidasa asociada con la fracción microsomal del hígado y/o del riñón; sin embargo, el hombre y otros primates, los cerdos de guinea, murciélagos frugívoros y algunas aves passeriformes no son capaces de sintetizar el ácido ascórbico, al no contar con esta enzima, y por lo tanto son susceptibles al escorbuto (Burns *et al.*, 1956; Sato and Udenfriend, 1978; Chaterjee, 1978; Webster and Lim, 2002). En los vertebrados inferiores capaces de sintetizar el ácido ascórbico, como reptiles, anfibios y peces primitivos se ha

encontrado esta enzima únicamente en el riñón (Roy and Guha, 1958; Chatterjee, 1973; Moreau and Dabrowski, 2000; Cho *et al.*, 2007).

Mientras que varias especies primitivas de peces, tales como las lampreas, los esturiones y muchos peces cartilaginosos, tienen la habilidad de sintetizar *de novo* el ácido ascórbico, los peces teleósteos más avanzados carecen de L-gulonolactona-oxidasa (GLO). Al igual que en los vertebrados superiores susceptibles a escorbuto, estos peces no pueden sintetizar ácido ascórbico a partir de la glucosa o la galactosa, debido a que el gen que codifica esta enzima no es funcional en estos organismos (Burns *et al.*, 1956; Sato and Udenfriend, 1978; Chaterjee, 1978; Nishikimi *et al.*, 1994; Nandi *et al.*, 1997; Webster and Lim, 2002) y consecuentemente, sin un adecuado suministro de vitamina C en la dieta, pueden presentar severos signos de deficiencia (Moreau and Dabrowski, 1998a; 1998b).

La pérdida de la actividad de la GLO en humanos y primates se ha considerado una enfermedad genética universal, causada por mutación del gen que codifica a esta enzima (Ha *et al.*, 2004); sin embargo aún no es claro si en el genoma de los peces teleósteos que no pueden sintetizar la vitamina C, exista una forma mutada de este gen. En la actualidad se busca generar peces transgénicos de importancia comercial que sean capaces de sintetizar la vitamina C *de novo*, mediante la transferencia de genes GLO de especies de peces primitivos (Cho *et al.*, 2007).

Absorción de la Vitamina C

En especies que requieren la vitamina C en la dieta (que no pueden sintetizar la vitamina C) la absorción de esta vitamina se da por mecanismos de transporte activo (proceso dependiente de energía que requiere Na^+) a nivel del intestino. Esta entrada activa de vitamina C parece ser muy importante a dosis bajas, mientras que a altas dosis, la vitamina C es absorbida también por transporte pasivo (difusión). En especies que no requieren el ácido ascórbico, la absorción de esta vitamina se da únicamente por mecanismos de transporte pasivo (Johnson, 2001).

La vitamina C entra a las células como los linfocitos, neutrófilos y mucocitos, en forma de ácido dehidroascórbico, debido a que el ácido ascórbico no puede cruzar su membrana. Una

vez el ácido dehidroascórbico ha entrado a las células, es rápidamente reducido a ácido ascórbico por la enzima ácido dehidroascórbico reductasa.

Distribución del ácido ascórbico en los órganos y tejidos de los peces

Se ha observado que la concentración de vitamina C en varios tejidos se relaciona con el consumo de la misma en la dieta y que los niveles de ascorbato en la sangre son afectados rápidamente por este consumo. Dentro de los principales tejidos de almacenamiento de ácido ascórbico en los peces se encuentran el hígado y el riñón, los cuales pueden almacenar grandes cantidades de esta vitamina. Igualmente, se ha encontrado que en el bazo se pueden acumular altas cantidades de vitamina C. (Halver, 1972; Tucker and Halver, 1984; Guerin, 1986; Gabaudan and Verlhac, 2001).

El ácido ascórbico tiene una gran importancia en la preservación de los tejidos vitales contra los procesos de oxidación, lo cual explica sus altos niveles en órganos como el timo y el cerebro, en los cuales estos niveles pueden retenerse por más tiempo que en órganos de almacenamiento como el hígado; se ha encontrado en peces como la trucha arco iris que los leucocitos también acumulan altas concentraciones de esta vitamina (Verlhac *et al.*, 1995).

Las gónadas (ovarios y plasma seminal) son unos de los tejidos que representan los más altos niveles de vitamina C, los cuales pueden ser varias veces más altos que en el plasma sanguíneo (Blom and Dabrowski, 1995; Ciereszko and Dabrowski, 1995). Esto sugiere que en los teleósteos propensos a escorbuto, el ácido ascórbico es de especial importancia en la maduración y calidad de los gametos, debido a que los tejidos periféricos como el ovario son dependientes de la distribución y toma celular de ácido ascórbico para satisfacer los requerimientos de esta vitamina (Guarnaccia *et al.*, 2000).

Existe una amplia variación en los niveles de ácido ascórbico en los diferentes tejidos dentro de una especie, así como de una especie a otra. Por ejemplo, Agrawal & Majan (1980) al evaluar los niveles de ácido ascórbico en los tejidos de cuatro especies de carpas (*Labeo rohita*, *L. calbasu*, *Cirrhina mrigala* y *Catlacatla*), encontraron que en las cuatro

especies los niveles de ácido ascórbico fueron más altos en el bazo, seguido del riñón anterior, las gónadas, el hígado, el riñón posterior y el cerebro, mientras que los niveles más bajos dentro de los tejidos estudiados, se encontraron en el corazón y la sangre. Sin embargo, al comparar las concentraciones de ascorbato en los tejidos de las cuatro especies, encontraron niveles más altos en *L. rohita*, que en las demás. Por otro lado, Gabaudan & Verlhac (2001), estudiaron la distribución del ácido ascórbico en varios tejidos de la trucha arco iris. Estos autores encontraron las concentraciones más altas de ascorbato en el timo y el cerebro, seguidos del riñón anterior, el bazo, el hígado y el riñón posterior, y detectaron los niveles más bajos en el corazón, el músculo y el plasma. Al encontrar valores muy altos de ascorbato en el timo y el cerebro, los autores confirmaron la hipótesis de la importancia de la vitamina C en la preservación de tejidos vitales contra los procesos de oxidación.

Además del factor nutricional, los factores estresantes, tales como cambios en las condiciones ambientales, pueden causar a su vez cambios en el estatus de ácido ascórbico de los peces. Por ejemplo, Thomas (1990) encontró en la lisa rayada (*Mugil cephalus*) que después de ser expuesta a cambios ambientales, se presentaban cambios en las concentraciones de ácido ascórbico de diferentes tejidos como las branquias, el riñón, el hígado y el cerebro.

Se han llevado a cabo varios estudios para evaluar las reservas corporales de ascorbato en los peces, como una herramienta para predecir el estatus de la vitamina C. Se han sugerido algunos tejidos como el riñón anterior y el hígado, como buenos indicadores del estatus del ascorbato en los peces. Aunque ha sido objeto de debate, se ha sugerido que el hígado es un mejor indicador, debido a se ha encontrado que las concentraciones de ascorbato en el riñón anterior pueden ser muy variables, mientras que en el primero son más consistentes (Halver, 1972; Hilton *et al.*, 1978; Lim and Novell, 1978).

Requerimientos de vitamina C en los peces

El ácido ascórbico es esencial para la mayoría de peces teleósteos, los cuales no pueden sintetizarla. El requerimiento de esta vitamina se encuentra bien documentado para muchas especies de peces (Gabaudan and Verlhac, 2001; Gouillou-Coustans and Kaushik, 2001).

Como en el caso de las demás vitaminas, el requerimiento de vitamina C para los peces varía de acuerdo a la especie, la edad, la tasa metabólica, el estado de salud, la madurez reproductiva, las condiciones ambientales y las interrelaciones entre nutrientes en la dieta, entre otros (Ciereszko and Drabrowski, 1995; Gabaudan and Verlhac, 2001). También este requerimiento puede variar en la ontogenia del pez, por ejemplo, durante la metamorfosis larval o la maduración gonadal (Ciereszko and Drabrowski, 1995). Al parecer, el requerimiento de esta vitamina decrece con la edad; ejemplos de ello se han encontrado en la trucha y el bagre de canal (Li and Lovell, 1984; Lovell, 1998).

Se han establecido los requerimientos nutricionales de vitamina C para el crecimiento normal de varias especies de peces tanto de agua dulce como marinos. Como ejemplos podemos citar el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), la carpa común (*Cyprinus Carpio*), la perca europea (*Dicentrarchus labrax*) y el salmón atlántico (*Salmo salar*), cuyos requerimientos van desde 15 a 50 mg de vitamina C por Kg de dieta (Lall *et al.*; 1989; NRC, 1993; Kaushik, 2002). Otras especies tienen mayores requerimientos; tal es el caso del ayu (*Plecoglossus altivelis*) que requiere 116 mg Kg⁻¹ (Xie and Niu, 2006) y otros peces como la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) y el halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), que tienen requerimientos mayores a los 400 mg Kg⁻¹ (Soliman *et al.*, 1994; Rønnestad *et al.*, 1999).

El requerimiento de esta vitamina también puede variar de acuerdo al tipo de vitamina C utilizado en la dieta. Por ejemplo, la perca gigante (*Lates calcarifer*) requiere de 500 a 700 mg/ Kg, si se utiliza ácido ascórbico cristalino en la dieta, pero requiere de 25 a 30 mg/Kg si se utiliza un derivado estable de la vitamina C como el ascorbyl-2-monofosfato-Mg (Boonyaratpalin *et al.*, 1994; Boonyaratpalin and Williams, 2001). Esto se debe a la diferente biodisponibilidad de la vitamina C en estos derivados y a la afinidad enzima-sustrato en la hidrólisis enzimática de estos compuestos durante la digestión (Dabrowski *et al.*; 1994).

Signos de deficiencia de Vitamina C

El primer signo de deficiencia de vitamina C es un agotamiento de las concentraciones de la misma en los tejidos. Signos tempranos, conocidos como escorbuto, incluyen edema,

pérdida de peso, extenuación y diarrea. Se presentan defectos estructurales específicos en huesos, dientes, cartílago, tejido conectivo y músculos. Estos defectos pueden explicarse por una falla en la formación de colágeno en estos tejidos, incluyendo una formación defectuosa de la matriz de los huesos. En peces se han observado deformidades estructurales como escoliosis, lordosis, anormalidades del cartílago que soporta los ojos, branquias y aletas. Comúnmente se observan hemorragias como resultado de un incremento en la fragilidad capilar. Además de hemorragias, puede ocurrir infiltración de grasa y necrosis en el hígado. La deficiencia de esta vitamina está asociada con una disminución en la concentración de proteína sérica, con anemia, incremento en el tiempo de coagulación de la sangre y retraso en la cicatrización de heridas. En peces con deficiencia de vitamina C también se ha observado ascitis (hidropesía del vientre), anorexia, erosión de aletas, lento crecimiento, triglicéridos y colesterol elevados en el plasma, rendimiento reproductivo reducido, y reducción de la resistencia a contaminantes ambientales (Pond *et al.*, 1995).

La deficiencia de vitamina C también ocasiona cambios bioquímicos como la formación de mucopolisacáridos en el tejido conectivo, un incremento en la producción de ácido hialurónico en la reparación de tejidos y una reducción en la incorporación de sulfato en los mucopolisacáridos (Pond *et al.*, 1995).

Toxicidad de la Vitamina C

Las vitaminas hidrosolubles (excepto la vitamina B₁₂) no son almacenadas en cantidades apreciables en los tejidos; debido a su fácil excreción a través del riñón, es improbable una toxicidad aguda por exceso de estas vitaminas en la dieta. Aunque el nivel de toxicidad del ácido ascórbico para los peces parece ser muchas veces mayor que el requerimiento, existen evidencias de que la ingestión crónica de 5 a 50 veces los niveles recomendados, puede incrementar la susceptibilidad al escorbuto cuando la vitamina C es retirada. (Pond *et al.*, 1995).

El consumo de esta vitamina en grandes cantidades puede causar efectos adversos en algunos individuos, tales como cálculos renales y la destrucción de la vitamina B₁₂. En humanos, altos niveles de la misma pueden causar dolor gastrointestinal, diarrea y náuseas;

estos síntomas son causados más por la acidez que por el ascorbato en sí mismo. Adicionalmente, la vitamina C al facilitar la absorción del hierro, puede causar una reducción en la absorción de cobre y, por consiguiente, un balance negativo de este mineral (Null, 1994).

Derivados estables de ácido ascórbico

Debido a la inestabilidad de las vitaminas durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos, se ha buscado utilizar derivados estables de las mismas que tengan propiedades similares a las vitaminas en forma inestable. En la actualidad estos derivados estables son ampliamente utilizados en la elaboración de alimentos.

Se ha mostrado considerable atención en el estudio de las actividades biológicas de derivados estables de las vitaminas. Existen diferentes derivados estables de ácido ascórbico, tales como el ascorbato-2-sulfato y el ascorbato-2-monofosfato. El primero, aunque es mucho más resistente a la destrucción que el ácido ascórbico, tiene una baja actividad biológica, al parecer debido a la absorción limitada de este derivado en el tracto gastrointestinal de los peces. Por otro lado el ascorbato-2-monofosfato tiene una actividad biológica similar al ácido ascórbico y también es resistente a la destrucción durante el procesamiento y almacenamiento (Jobling, 1994).

Existen otros derivados fosfatados del ácido ascórbico que son biológicamente disponibles y conservan las propiedades de la vitamina, por lo cual son substitutos viables del ácido ascórbico en la manufactura de alimentos para peces. La eficacia de estos compuestos como fuentes de vitamina C está relacionada con la presencia de enzimas fosfatasa en los tejidos del tracto digestivo y otros órganos. Debido a que la actividad de la fosfatasa alcalina es alta en la membrana de borde de cepillo del intestino y la enzima muestra baja especificidad de sustrato, puede haber una hidrólisis considerable de los derivados fosfatados del ácido ascórbico, antes de entrar al sistema circulatorio. Por otro lado, la fosfatasa ácida es una enzima ubicua en la sangre y en los lisosomas de las células; así algunos de los derivados fosfatados que pudieran ser absorbidos intactos en el intestino,

pueden ser rápidamente hidrolizados a ácido ascórbico, una vez han entrado a la sangre (Jobling, 1994).

Otros derivados estables de la vitamina C son el ascorbato-2-glicósido, arcosbato-2-acetato y el ascorbil-6-palmitato (éster formado de ácido ascórbico y ácido palmítico), este último, ampliamente utilizado en el enriquecimiento de alimento vivo en la acuicultura de peces marinos.

Justificación

Aunque en los últimos años se ha logrado avanzar en forma notoria en el conocimiento de *Menidia estor* y en la generación de técnicas para su cultivo (Martínez-Palacios *et al.*, 2002a; Martínez-Palacios *et al.*, 2002b; Martínez-Palacios *et al.*, 2004; Ross *et al.*, 2006; Avalos, 2006; Monroy, 2006; Martínez-Palacios *et al.*, *in press*; Palacios *et al.*, *in press*), aún se tienen carencias en el conocimiento de sus requerimientos nutricionales principalmente de micronutrientes como las vitaminas y minerales. Por lo anterior, se requiere continuar con una investigación metódica que permita obtener mayor productividad a un menor costo e incrementar así su rendimiento en cultivo, lo cual permitirá escalar del cultivo piloto ya existente a un nivel comercial. Al igual que en el cultivo de peces marinos, y debido al desconocimiento del requerimiento de muchos nutrientes para *M. estor*, aún se depende del alimento vivo no sólo en las primeras etapas de desarrollo, sino a nivel de juveniles y adultos, que reciben alimento vivo suplementario, lo cual incrementa notablemente los costos. A la hora de querer reemplazar totalmente el alimento vivo por dietas artificiales comerciales, los peces presentan problemas de crecimiento, supervivencia y acusan signos de deficiencia. Por tal razón los esfuerzos están encaminados a encontrar dietas artificiales idóneas para estos peces en las diferentes etapas de desarrollo que suplan sus requerimientos nutricionales, los provean de la energía necesaria para todos sus procesos metabólicos, que les permita crecer y reproducirse de una manera óptima, además de que sean biodisponibles, fácilmente digeribles y asimilables.

Por otro lado, de la manera en que los peces puedan responder a los cambios en el ambiente o a la presencia de otros organismos, depende su supervivencia en un hábitat determinado. Este es un factor muy importante a tener en cuenta en el cultivo, debido a que los peces en confinamiento son propensos constantemente a situaciones de estrés. *Menidia estor* es una especie que se estresa fácilmente, lo cual dificulta un gran medida su manejo. Debido a esta sensibilidad aparente, los estudios acerca de sus requerimientos nutricionales han tenido cierto grado de dificultad. Con un conocimiento más profundo acerca de sus requerimientos, podría ser posible proporcionar dietas que permitan un buen desempeño de los peces y mejorar las respuestas a las diferentes condiciones estresantes a las que pueden estar sometidos en cultivo.

No se han llevado a cabo estudios acerca de los requerimientos nutricionales de ácido ascórbico ni del estatus de esta vitamina en otros peces Atherinomorfos. Los datos presentados en el presente estudio son los primeros reportados para peces Atherinopsidos y sientan bases para futuros trabajos acerca de los requerimientos nutricionales de estos y otros Atherinopsidos de interés comercial.

Hipótesis

Teniendo en cuenta la información disponible, y de lo anterior, se derivan las siguientes hipótesis:

1. Al igual que en otras especies de peces, es muy posible que la vitamina C en *Menidia estor* se encuentre en mayores concentraciones en órganos vitales como el cerebro y las gónadas. La vitamina C puede estar involucrada en mecanismos fisiológicos de adaptación del pez blanco, lo cual se podría evidenciar en fluctuaciones de las concentraciones de ácido ascórbico en los tejidos de *M. estor* durante cambios en las condiciones ambientales. Así, durante períodos de estrés, es posible que las concentraciones de ascorbato en los tejidos de *M. estor* se alteren significativamente.

2. El proporcionar dietas deficientes en vitamina C podría causar una reducción en los niveles de ácido ascórbico de las gónadas de adultos de *M. estor* y una consecuente reducción en la viabilidad y eclosión de los huevos. El proporcionar dietas suplementadas con ácido ascórbico, incrementaría significativamente los niveles de esta vitamina en las gónadas, huevos fertilizados y larvas, así como la viabilidad y eclosión de los huevos. Por otro lado, es posible que las reservas de vitamina C se transfieran de los huevos a las larvas recién eclosionadas.

3. Es evidente que el alimento vivo, como la *Artemia franciscana*, ofrece mejores respuestas en crecimiento y supervivencia en *Menidia estor*, además de ser mejor ingerido que las dietas artificiales probadas hasta el momento. Incorporar vitamina C extra en el alimento vivo podría incrementar la supervivencia y el crecimiento de juveniles de esta especie.

4. Una de las causas de la alta mortalidad y reducido crecimiento al proporcionar dietas artificiales a juveniles de pez blanco puede ser que las dietas artificiales utilizadas tengan niveles inadecuados de micronutrientes como la vitamina C; así, incrementar los niveles de esta vitamina en la dieta podrían reflejarse en mejores crecimientos y supervivencias. Los signos patológicos observados en individuos de *M. estor* alimentados con dietas artificiales, son una posible evidencia de deficiencias nutricionales de esta vitamina.

5. Es posible que la concentración de vitamina C en tejidos como el hígado de *M. estor* se relacione con el consumo de esta vitamina en la dieta; así, los niveles de ácido ascórbico hepáticos podrían incrementarse a medida que se incremente el mismo en el alimento. Por otro lado, los niveles de ácido ascórbico en el hígado también podrían verse influenciados por situaciones de estrés agudo en *M. estor*, lo cual sugeriría que la vitamina C estaría involucrada en algunos mecanismos fisiológicos de adaptación de esta especie.

Objetivos del trabajo

Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es evaluar el estatus de la vitamina C en el pez blanco de Pátzcuaro, así como la importancia de esta vitamina en el crecimiento, supervivencia, reproducción y algunas respuestas al estrés de la especie, para probar así las hipótesis anteriormente planteadas.

Objetivos específicos

1. Evaluar el estatus de la vitamina C en *Menidia estor* y los efectos del estrés agudo por transporte sobre las concentraciones de esta vitamina en los tejidos.
2. Estudiar los efectos de la concentración de vitamina C de la dieta sobre la primera reproducción del pez blanco de Pátzcuaro.
3. Evaluar el efecto del uso de nauplios de *Artemia franciscana* enriquecidos con diferentes niveles de vitamina C sobre el crecimiento y supervivencia de los juveniles del pez blanco.
4. Determinar el requerimiento dietético de vitamina C para juveniles de *Menidia estor*, mediante el uso de dietas artificiales, en términos de crecimiento, supervivencia y presencia de signos de deficiencia externos.
5. Cuantificar las concentraciones de ácido ascórbico en el hígado de juveniles de pez blanco, *Menidia estor*, alimentados con dietas artificiales a diferentes niveles de vitamina C y su posible variación después de someterlos a estrés por hipoxia aguda.

Breve descripción de la tesis

Con el fin de probar las diferentes hipótesis, se llevaron a cabo cinco experimentos, los cuales se exponen en cinco diferentes capítulos, que están escritos a manera de artículos científicos:

En el **Capítulo 1**, se expone un experimento en el que se evaluaron los niveles de vitamina C en los tejidos de adultos silvestres de pez blanco *Menidia estor* para conocer el estatus del ácido ascórbico en los peces. De la misma manera se evaluaron los cambios en los niveles de esta vitamina en los tejidos de peces sometidos a una situación de estrés como lo es el transporte. De este capítulo se derivó el artículo titulado: “The effect of transportation stress on tissue ascorbic acid levels of Mexican silverside (*Chirostoma estor estor* Jordan, 1979)”, publicado en la revista Biocell (Ríos-Durán *et al.*, 2006) (Anexo).

Un segundo experimento se muestra en el **Capítulo 2**, en el cual se evaluó el efecto del uso de *Artemia franciscana* adulta congelada enriquecida con vitamina C como suplemento alimenticio sobre la primera reproducción de peces blancos mantenidos en laboratorio. Se evaluaron los efectos de dos diferentes niveles de vitamina C en la dieta de los reproductores sobre la fecundidad, fertilización, porcentaje de huevos oculados y eclosión de huevos, al igual que sus efectos sobre las concentraciones de ácido ascórbico de huevos (recién fertilizados y oculados) y larvas recién eclosionadas.

Por otro lado, en un tercer experimento (**Capítulo 3**), se evaluó el efecto del uso de nauplios de *artemia franciscana* enriquecidos con diferentes niveles de vitamina C sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de *Menidia estor*, así como sobre las concentraciones de ácido ascórbico en el hígado de los peces.

En el **Capítulo 4** se muestra una evaluación de los efectos de la vitamina C de dietas artificiales, sobre el crecimiento y supervivencia de juveniles de *M. estor*, así como sobre la incidencia de signos patológicos de deficiencia. Con esta evaluación fue posible determinar

los requerimientos de vitamina C en juveniles de esta especie bajo las condiciones controladas del experimento.

El **Capítulo 5**, describe un último experimento, el cual consistió en evaluar los efectos del nivel de vitamina C de la dieta sobre las concentraciones de ácido ascórbico del hígado en juveniles de pez blanco bajo condiciones controladas de normoxia y en juveniles sometidos a estrés por hipoxia aguda. Se evaluó la supervivencia de los individuos después de ser sometidos a la situación de estrés con el fin de comparar la resistencia de los peces alimentados con los diferentes niveles de vitamina C.

Finalmente, se hace una breve discusión general de los resultados obtenidos a través de los diferentes experimentos y se presentan las conclusiones de la tesis.

CAPITULO 1

**EFFECTOS DEL ESTRES POR TRANSPORTE EN LOS NIVELES DE ACIDO
ASCORBICO EN TEJIDOS DE PEZ BLANCO DE PÁTZCUARO (*Menidia estor*
Jordan 1880)**

Resumen

La vitamina C (ácido ascórbico) además de funcionar en numerosos procesos metabólicos, es esencial para obtener un crecimiento normal y alta resistencia al estrés ambiental. En algunos peces sus concentraciones en los tejidos pueden disminuir bajo situaciones de estrés. Se evaluaron por HPLC las concentraciones de ácido ascórbico Total (TAA), ácido ascórbico reducido (AA) y ácido Dehidroascórbico (DHAA) en tejidos (Cerebro, gónada, hepatopáncreas y músculo) de adultos silvestres de pez blanco de Pátzcuaro (*Menidia estor*), en el campo y después de someterlos a estrés de transporte durante tres horas. Tanto en hembras como en machos las concentraciones más altas de TAA se presentan en el cerebro, seguido de las gónadas, hígado y músculo. Antes del transporte, no existe diferencia significativa entre hembras y machos en las concentraciones de TAA de los tejidos evaluados, con excepción de las gónadas que presentan menor concentración de vitamina C en hembras. Tanto antes como después del transporte, en ambos sexos, la vitamina C se encuentra en mayor proporción como AA (forma reducida) en todos los tejidos, excepto en el cerebro de las hembras que antes del transporte presenta mayor proporción de DHAA (Forma oxidada). No existe diferencia significativa entre las concentraciones de TAA antes y después del transporte en los órganos evaluados de hembras y machos, sin embargo existe un incremento significativo de AA después del transporte en el cerebro de los peces de ambos sexos y el hígado de los machos. Se concluye que el estrés ocasionado por el transporte durante tres horas no es suficiente para ocasionar una disminución significativa de TAA en los tejidos, pero sí para cambiar la proporción de AA y DHAA en el cerebro y el hígado, tejidos en los que la protección contra el daño oxidativo es muy importante, donde la vitamina C actuaría como aceptor de electrones.

Palabras Clave: Niveles de Acido ascórbico en tejidos; *Menidia estor*; estrés por transporte.

Introducción

En las diferentes etapas del ciclo de producción de los peces, estos son sometidos a situaciones de estrés, las cuales incluyen su captura y transporte. Uno de los mayores problemas en el cultivo del pez blanco, *Menidia estor*, es que posee una gran susceptibilidad al manejo y al estrés por transporte. También esta especie se estresa muy fácilmente por los cambios en las condiciones ambientales, tales como la salinidad y el oxígeno disuelto, lo que resulta en alta mortalidad, bajo crecimiento, falta de apetito, etc. Según Pankhurst *et al.* (1997), el estrés puede inhibir el crecimiento debido a su efecto sobre el metabolismo y las vías endocrinas que lo regulan.

Se ha encontrado que la vitamina C (ácido ascórbico) juega un papel importante en la resistencia al estrés ambiental en peces (Wee, 1996; Papp *et al.*, 1997; Li *et al.*; 1998; Henrique *et al.*, 1998; Montero *et al.*, 1999), así como actúa en numerosos procesos fisiológicos como el crecimiento, la formación de los huesos, reproducción, curación de heridas y respuestas inmunes, entre otros (Lygren *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 2000; Lee and Dabrowski, 2004). Una de las funciones más aceptadas de la vitamina C, es que actúa como antioxidante al interrumpir reacciones en cadena de radicales libres.

La vitamina C se encuentra en altos niveles en órganos vitales con un metabolismo activo y su concentración en varios tejidos se relaciona con el consumo de esta vitamina en la dieta. En algunos tejidos como el cerebro, ésta se acumula en altas concentraciones y, comparado con otros órganos de almacenamiento como el hígado y el riñón, estos niveles pueden retenerse por más tiempo. Al parecer, la vitamina C tiene una gran importancia en la preservación de los tejidos vitales contra los procesos de oxidación, lo cual puede explicar los altos niveles encontrados en el cerebro y otros órganos como el timo en los peces (Gabaudan and Verlhac, 2001). En los tejidos de los peces pueden ocurrir fluctuaciones en las concentraciones de ácido ascórbico durante cambios en las condiciones ambientales, lo cual sugiere que la vitamina C está involucrada en mecanismos fisiológicos de adaptación durante las respuestas al estrés. En algunas especies como *Mugil cephalus* L., durante

períodos de estrés, las concentraciones de ascorbato en los tejidos pueden alterarse significativamente (incrementarse o disminuir) (Thomas, 1984).

De acuerdo a Robinson (1989), el principal tejido para evaluar el estatus del ácido ascórbico en los peces es debatible. Los niveles de ascorbato en la sangre son afectados rápidamente por el consumo de vitamina C en la dieta, por lo que estos niveles no son un buen indicador del estatus de la vitamina C. Los niveles de ascorbato del riñón anterior se han sugerido como un buen indicador de las reservas de ácido ascórbico en los peces, pero este tejido es pequeño, lo que causa problemas para los ensayos de vitamina C. Algunos autores consideran los niveles de ascorbato del hígado como mejores indicadores del estatus de vitamina C que los niveles de vitamina C del riñón anterior. Lim y Lovell (1978) evaluaron el contenido de ácido ascórbico en el riñón y en el hígado de juveniles del bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) alimentados con dietas con diferentes niveles de vitamina C durante 22 semanas. Los autores encontraron concentraciones muy variables de ascorbato en el riñón anterior durante el experimento, mientras que los niveles de esta vitamina en el hígado fueron consistentes en el tiempo, siempre que los peces fueran alimentados con niveles de vitamina C adecuados para no causar signos de deficiencia. En otras especies como la trucha arco iris (*Onchorhynchus mykiss*) la concentración de ácido ascórbico en el hígado puede ser usada como un índice del estatus del mismo (Hilton *et al.*, 1977). Sin embargo, no existen datos sobre el estatus de la vitamina C en *M. estor* y los efectos del estrés sobre las concentraciones de esta vitamina en los tejidos.

Metodología

Se evaluó el contenido de ácido ascórbico en diferentes tejidos de adultos silvestres de pez blanco de Pátzcuaro (*Menidia estor*) y se observó si habían cambios significativos en estos niveles al someter a los peces a un estrés por transporte, durante tres horas. Para tal fin se colectaron adultos (L.S. = 14.4 ± 2.03 cm) en el Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México, en septiembre de 2003. Seis hembras y seis machos fueron sacrificados con el fin de extraer el cerebro, hígado (o hepatopáncreas) y gónadas, así como para extraer muestras de músculo, los cuales fueron congelados en nitrógeno líquido, sin dejar pasar más de un minuto entre la

extracción y su congelación. Los tejidos congelados fueron después almacenados a -80°C hasta el momento del análisis de ácido ascórbico.

Otras seis hembras y seis machos (L.S. = $17,7 \pm 1.7$ cm) fueron transportados vivos durante tres horas, en bolsas plásticas con agua dulce oxigenada a una temperatura de $22-24^{\circ}\text{C}$, hasta el laboratorio. Este grupo de peces se tomó como grupo estresado, mientras que los peces no sometidos al transporte como grupo control. Los dos grupos de peces fueron capturados al mismo tiempo, por lo que el estrés por captura fue el mismo para ambos. Después del transporte, de la misma manera que para el grupo control, los peces fueron sacrificados y se tomaron muestras de cerebro, hígado, gónadas y músculo, las cuales se congelaron en nitrógeno líquido en un tiempo no mayor a 1 minuto desde la toma de muestra hasta su congelación. Los tejidos congelados igualmente se almacenaron a -80°C hasta el momento del análisis de ácido ascórbico.

Análisis de ácido ascórbico

Se evaluaron las concentraciones de ácido ascórbico Total (TAA), ácido ascórbico reducido (AA) y ácido dehidroascórbico (DHAA) en los tejidos congelados mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Los tejidos se pesaron y homogenizaron inmediatamente en un Buffer de Acetato de Sodio 0.2M frío a pH 4.8. Posteriormente, muestras de cada extracto (1 mL) se adicionaron a tres tubos, uno para cuantificar el ácido ascórbico reducido (AA), otro para el ácido ascórbico total (TAA) y el último para determinar la línea base (LB). En la figura 1 se muestra el esquema utilizado para la preparación de muestras. La cuantificación de ácido ascórbico (AA y TAA) en las muestras preparadas se llevó a cabo por HPLC, utilizando el método modificado por Papp *et al.* (1998). Posteriormente los niveles de DHAA se determinaron por la diferencia entre las concentraciones de TAA y AA obtenidas.

Para todos los análisis se utilizaron reactivos ultrapuros de J.T. Baker (EUA), Fluka (Suiza), SIGMA (Alemania) y Aldrich (EUA), y para la filtración de buffers y homogenados se utilizaron filtros de membrana Durapore (Millipore) de $0.45 \mu\text{m}$. Se utilizó

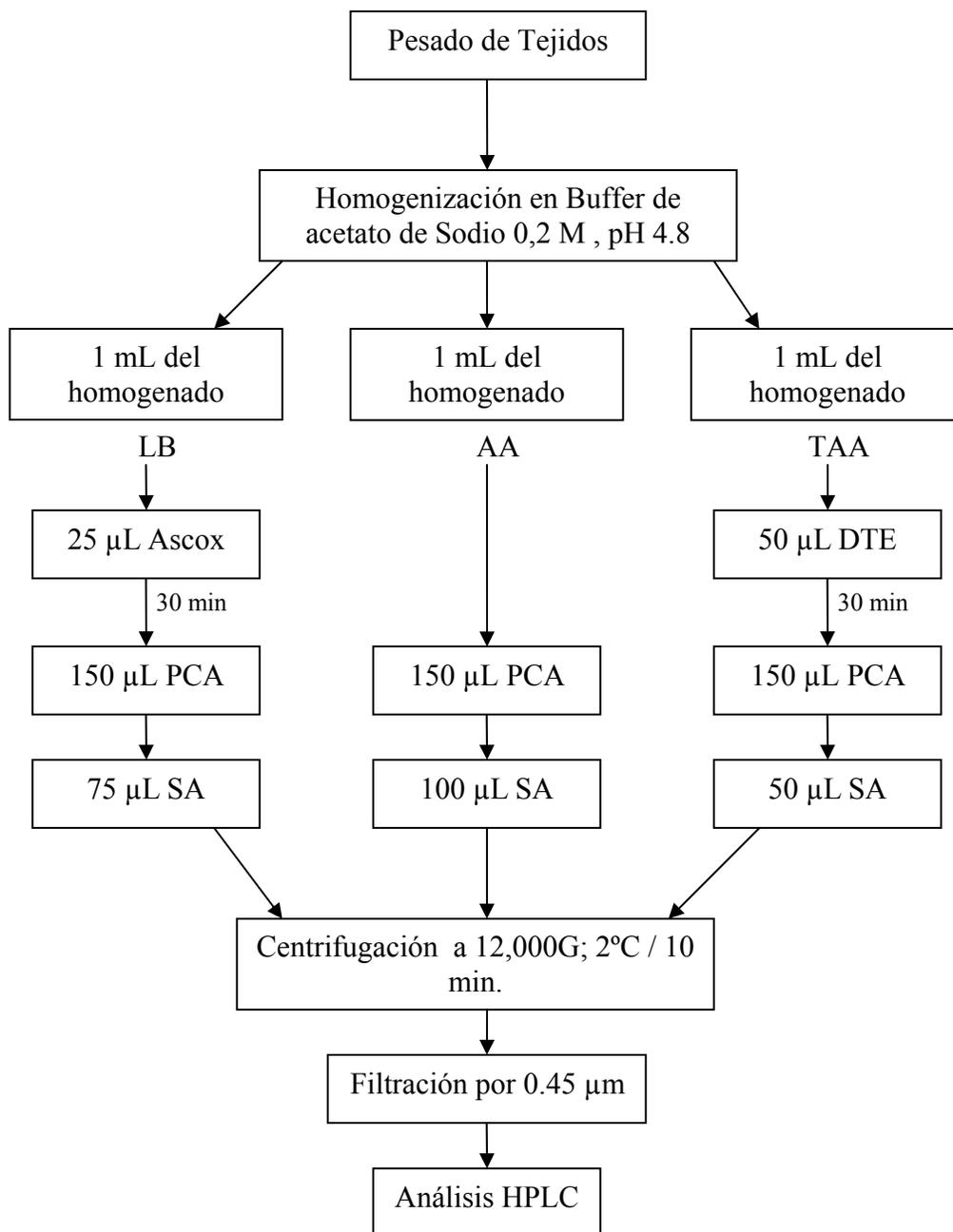


Figura 1. Preparación de muestras para la determinación de ácido ascórbico por Cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC. (BL: Determinación de la Línea Base, AA: Cuantificación del ácido ascórbico reducido, TAA: Cuantificación del ácido ascórbico total, Ascox: Ascorbato oxidasa, DTE: Dithioerythritol al 4%, PCA: Ácido perclórico al 10%, SA: Buffer de acetato de sodio 0.2 M).

un cromatógrafo de líquidos (isocratic single column system, Agilent 1100 series) con un detector UV-visible y una columna Lichrosorb RP-18 (4.6 x 200mm, Agilent). La fase móvil consistió en una solución de acetato de sodio (0.04 M), con EDTA (0.05 mM) y Tetrabutilamonio dihidrógeno fosfato (0.5 mM) a un pH de 3.76. Las condiciones cromatográficas fueron: Flujo= 0.5 ml/min; Presión= 65 bar; Longitud de onda (Detector UV)= 254 nm; Temperatura= 23°C; Volumen de inyección= 2 µL. Los cromatogramas fueron evaluados utilizando el software ChemStation Plus (Agilent).

Análisis de datos

Se calcularon la media y el error estándar (E.S.) de las concentraciones de ascorbato obtenidas en cada tejido, para hembras y machos por separado tanto del grupo control (antes del transporte) como del grupo estresado (después del transporte). Para cada uno de los tejidos evaluados, las diferencias entre medias en AA, TAA Y DHAA, antes y después del transporte, así como entre hembras y machos, se analizaron mediante pruebas de T-student, con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. En los casos en que no hubo una distribución normal, el análisis estadístico se llevó a cabo mediante pruebas de Mann-Whitney, con un nivel de confianza del 95%. Para dichos análisis se utilizó el programa estadístico Minitab, versión 13.32. Debido a que los peces fueron capturados en el lago de Pátzcuaro, las diferencias en tallas fueron inevitables, por lo que los datos obtenidos se reportan como microgramos de ascorbato por gramo de tejido ($\mu\text{g/g}$).

Resultados

Para el grupo control (antes del transporte), se presentaron diferencias en los niveles de ascorbato (TAA, AA y DHAA) en los tejidos evaluados en ambos sexos, con los mayores valores en el cerebro, seguido por las gónadas, el hígado y el músculo. No hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en las concentraciones de TAA, AA y DHAA de los tejidos entre hembras y machos (Tabla 1), con excepción del cerebro que presentó valores significativamente mayores de AA en machos.

Tabla 1. Niveles de ácido ascórbico total (TAA) ($\mu\text{g/g}$) encontrados en hembras y machos silvestres de pez blanco *Menidia estor*. Los datos se expresan como Media \pm E.S. (n = 6)

Tejido	Hembras	Machos
Cerebro	121.81 \pm 21.68 ^a	110.69 \pm 15.92 ^a
Gónadas	38.58 \pm 11.58 ^a	81.43 \pm 24.61 ^a
Hígado	25.86 \pm 2.94 ^a	46.21 \pm 14.68 ^a
Músculo	11.23 \pm 3.68 ^a	12.88 \pm 2.80 ^a

Los valores con el mismo superíndice no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$) entre hembras y machos.

Como se muestra en la figura 2, tanto en hembras como en machos, la vitamina C en los tejidos evaluados se encontró en mayor proporción como AA (forma reducida), que como DHAA (forma oxidada), con excepción del cerebro en las hembras.

Después de someter los peces al estrés por transporte (post-estrés), tanto las hembras como los machos mostraron el mismo patrón en los niveles de ácido ascórbico (TAA, AA y DHAA) en los tejidos que los peces del grupo control (pre-estrés), con los valores más altos en el cerebro y los más bajos en el músculo. En comparación con los niveles de vitamina C pre-estrés, no hubo cambios significativos ($p > 0.05$) en las concentraciones de ascorbato en los tejidos (Figura 3).

No se encontraron diferencias significativas entre hembras y machos en las concentraciones de TAA después del estrés, con excepción del hígado, que presentó valores más bajos en hembras que en machos ($p < 0.05$). Como en el grupo control, la vitamina C post-estrés se presentó en mayor proporción como AA que como DHAA, en ambos sexos. Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre estas dos formas en el cerebro de las hembras ($p > 0.05$). Existe una tendencia a un incremento de los niveles de AA y un decrecimiento de las concentraciones de DHAA en todos los tejidos de ambos sexos después del estrés por transporte (Figura 4), aunque el cambio en su proporción sólo es significativo ($p < 0.05$) en las gónadas de las hembras.

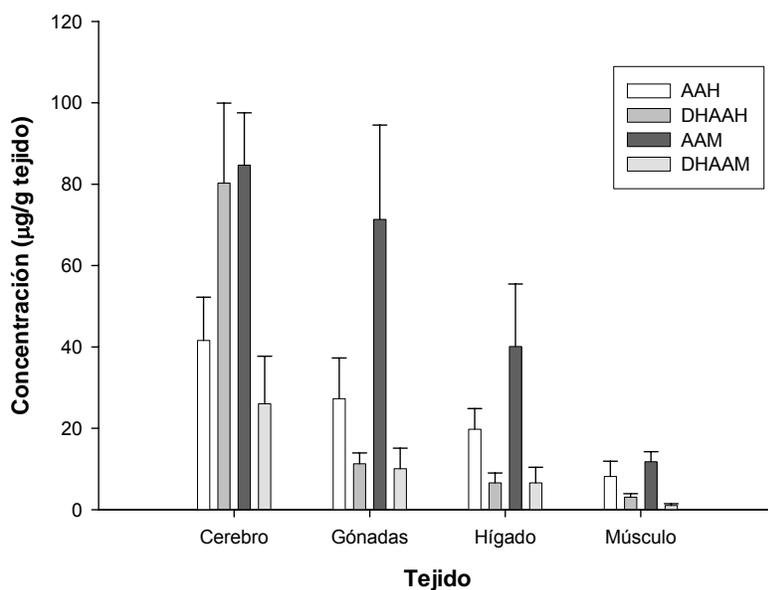


Figura 2. Niveles de ácido ascórbico reducido (AA) y ácido dehidroascórbico (DHA) en hembras y machos de adultos silvestres de Pez Blanco *Menidia estor* (AAH: Acido ascórbico reducido en hembras; DHA AH: Acido dehidroascórbico en hembras; AAM: Acido ascórbico reducido en machos; DHA AM: Acido dehidroascórbico en machos) (Valores promedio \pm S.E., n = 6).

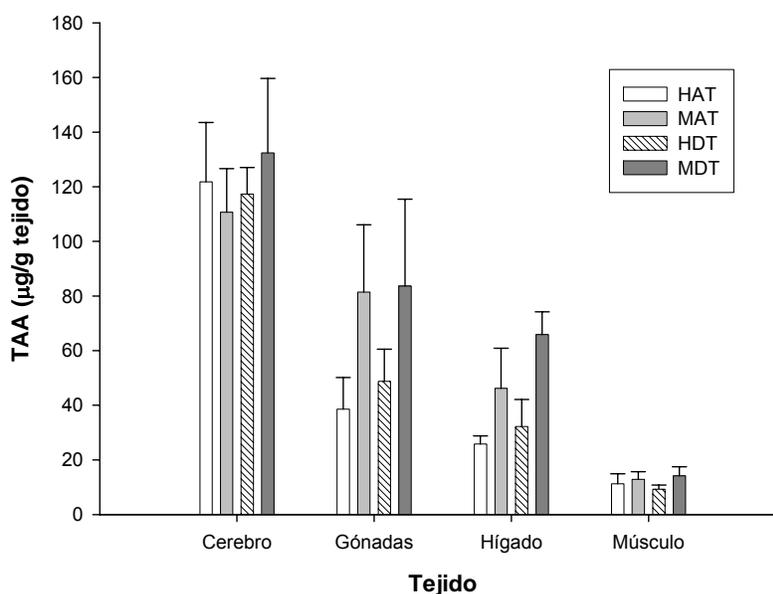


Figura 3. Niveles de ácido ascórbico total (TAA) encontrados en los tejidos evaluados de hembras y machos de *Menidia estor* antes (grupo control) y después (grupo estresado) del transporte (HAT: Hembras antes de transporte; MAT: Machos antes de transporte, HDT: Hembras después de transporte, MDT: Machos después de transporte) (Valores promedio \pm S.E., n = 6).

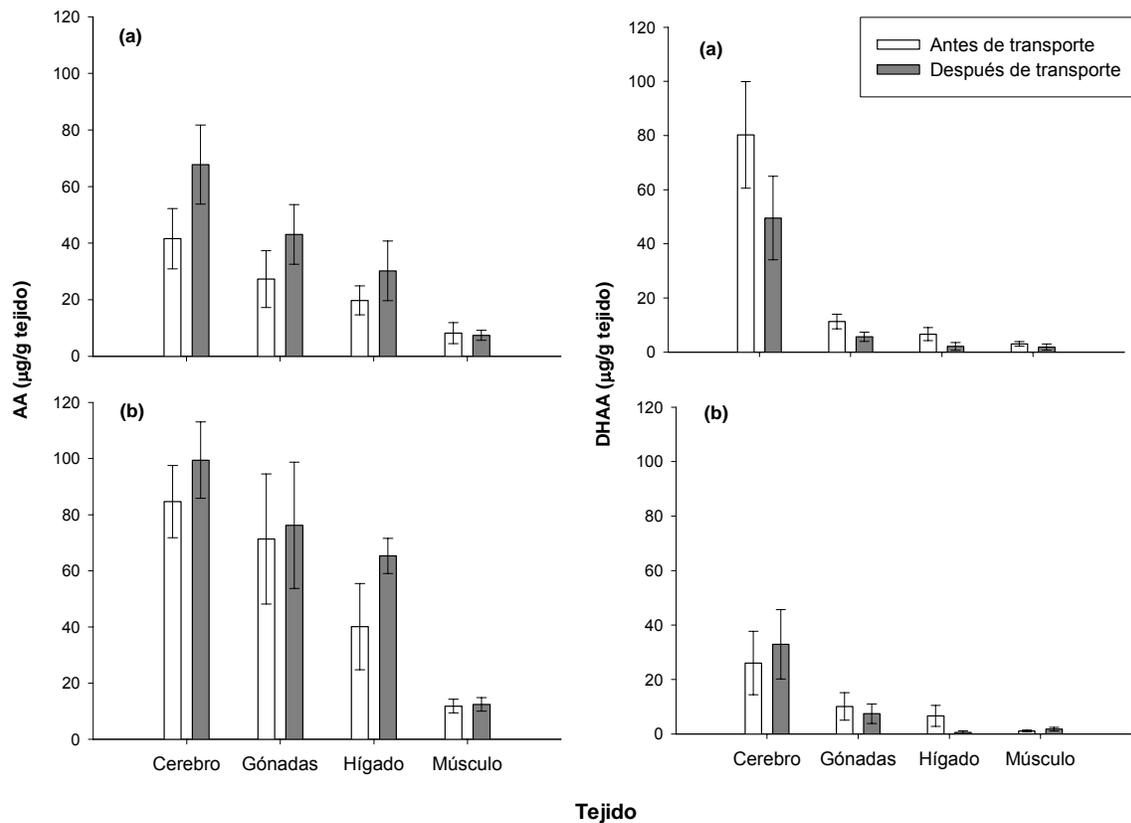


Figura 4. Niveles de ácido ascórbico reducido (AA) y ácido dehidroascórbico (DHAA) en los tejidos de *Menidia estor* (a) hembras y (b) machos, antes (grupo control) y después del estrés por transporte (grupo estresado) (Valores promedio \pm S.E., $n = 6$).

Discusión

Debido a que los peces evaluados fueron capturados del lago de Pátzcuaro, fue inevitable el estrés físico causado durante la captura; sin embargo, se desconoce si tal estrés causó cambios significativos en los niveles normales de ascorbato en los tejidos. En la lisa *Mugil cephalus*, Thomas (1984) encontró que los contenidos de ascorbato del hígado y el cerebro relativamente no son afectados por el estrés de captura. En el presente estudio se asume que el estrés por captura no alteró las reservas de vitamina C de estos tejidos en *M. estor* y que los peces no sometidos a transporte fueron un grupo control válido.

Como se ha encontrado en varias especies de peces, las concentraciones más altas de TAA se encontraron en el cerebro de *M. estor* y estos niveles se mantuvieron después del estrés por transporte, confirmando que en el tejido cerebral la protección contra el daño oxidativo es muy importante, con la vitamina C actuando como un aceptor de electrones (Gabaudan and Verlhac, 2001). Según Patro & Patnaik (1979), en *Ophiocephalus punctatus* las concentraciones de ácido ascórbico en el cerebro no son afectadas por exposiciones cortas a estrés físico, lo cual concuerda con los resultados del presente estudio. Thomas (1984) también encontró este patrón en el cerebro y el hígado de *Mugil cephalus* L. después de un estrés corto de captura. En *M. estor* el estrés causado por tres horas de transporte, no alteró el contenido de ascorbato en el cerebro.

Hilton *et al.* (1977) propusieron el contenido de ácido ascórbico del hígado como un indicador confiable del estatus de vitamina C en los peces y consideraron concentraciones de ascorbato de $20\mu\text{g g}^{-1}$ o menores como indicadores de un estatus pobre de esta vitamina en la trucha arco iris. Lim and Lovell (1978) consideraron niveles de ascorbato en el hígado menores a $30\mu\text{g g}^{-1}$ como indicativo de deficiencia de vitamina C en el bagre. Sin embargo, Robinson (1989) encontró que niveles de ácido ascórbico menores a $30\mu\text{g g}^{-1}$ no reflejaron una deficiencia de la vitamina en el bagre de canal y que niveles entre 16.5 y $18.2\mu\text{g g}^{-1}$ no mostraron signos de deficiencia de la misma. Como se muestra en la tabla 1, los adultos de *M. estor* mostraron niveles de ascorbato en el hígado de $25.9\mu\text{g g}^{-1}$ (hembras) y $46.2\mu\text{g g}^{-1}$ (machos), que muy probablemente indican un buen estatus de vitamina C. Debido a que la concentración de vitamina C en los tejidos está relacionada con su consumo en la dieta, las concentraciones encontradas de ascorbato en el hígado pueden reflejar la alimentación natural de *M. estor*, basada en zooplancton (Ross *et al.*, 2006), un recurso natural de esta vitamina. No obstante, se requieren más datos para establecer los niveles de ácido ascórbico hepáticos que puedan ser usados como indicadores de deficiencia de vitamina C en esta especie. Los niveles de TAA en el hígado del pez blanco no se afectaron por el transporte, lo cual sugiere que este estrés físico durante tres horas, no influencia significativamente el estatus de vitamina C de esta especie.

Como se ha reportado para especies de peces propensas al escorbuto (tabla 2), *M. estor* tiene cantidades significativas de ácido ascórbico en las gónadas, para garantizar una alta calidad de los gametos. Para el grupo control, no se presentaron diferencias significativas en las concentraciones de TAA de las gónadas entre hembras y machos. La mayoría del ácido ascórbico en los testículos se encontró en forma reducida (AA), mientras que en los ovarios no hubo diferencia significativa entre las formas reducida y oxidada (DHAA). Aunque los niveles de TAA no están influenciados por el sexo en *C. estor estor*, la proporción de las formas reducida y oxidada varía en las gónadas. En *Limanda limanda* Saborowski *et al.* (1997) encontraron diferencias en las concentraciones de AA entre las gónadas de hembras y machos, y como se ha encontrado en otras especies (*Carassius carassius*, *Gadus morhua*, *Perca flavescens*), estos niveles variaban con el ciclo reproductivo (Seymour, 1981; Sandnes & Braekkan, 1981; Dabrowski & Ciereszko, 1996).

En *M. estor*, aunque las gónadas evaluadas fueron inmaduras (índices gonadosomáticos entre 0.11 y 0.25% para machos y entre 0.27 y 0.47% para hembras), estos tejidos tuvieron valores más altos de vitamina C que el hígado y el músculo. Se pueden esperar diferentes concentraciones de vitamina C en individuos maduros, dependiendo del estadio del ciclo reproductivo. El estrés por transporte no afectó los niveles de TAA en las gónadas tanto de hembras como de machos, pero la proporción de AA y DHAA cambió significativamente en los ovarios: se incrementaron los niveles de AA y se redujeron los niveles de DHAA. Esto sugiere que la vitamina C pudo haber actuado como un aceptor de electrones, protegiendo efectivamente del daño oxidativo a los ovarios, en una situación de estrés.

Las bajas concentraciones de TAA encontradas en el músculo de *M. estor* indican que este tejido no es un lugar importante de almacenamiento de vitamina C. Niveles bajos de TAA en el músculo también se han observado en otros peces como la lobina europea (*Dicentrarchus labrax*) (<10 µg/g), la brema (*Sparus aurata* L.) (< 12 µg/g) y la trucha arco iris (< 20 µg/g). (Alexis *et al.*, 1999; Gabaudan and Verlhac, 2001). El estrés por transporte durante tres horas no afectó los niveles de ascorbato del músculo del pez blanco.

Tabla 2. Concentraciones de ácido ascórbico (AA) en gónadas de diferentes peces silvestres propensos a escorbuto.

<u>Sexo</u>	<u>Talla</u>	<u>IGS</u> (% del peso del cuerpo)	<u>Concentración de AA ($\mu\text{g g}^{-1}$)</u>	<u>Referencia</u>
<u>Hembras</u>				
<i>Catla catla</i>	4.66±1.44 Kg	NA	286.34±16.54	Agrawal and Mahajan (1980)
<i>Labeo rohita</i>	2.45±0.83 Kg	NA	225.30±15.36	Agrawal and Mahajan (1980)
<i>Cirrhina mrigala</i>	2.75±0.54 Kg	NA	206.81±8.94	Agrawal and Mahajan (1980)
<i>Gadus morua</i>	NA	0.5-20	100-450	Sandnes & Braekkan(1981)
<i>Salvelinus alpinus</i>	12-14 cm	7.5-20	200-344	Dabrowski (1991)
<i>Menidia estor</i>	13.77±2.46 cm	0.27-0.47	38.58 ± 11.58	Este trabajo
<u>Machos</u>				
<i>Catla catla</i>	4.66±1.44 Kg	NA	209.56±20.21	Agrawal and Mahajan (1980)
<i>Labeo rohita</i>	2.45±0.83 Kg	NA	199±12.64	Agrawal and Mahajan (1980)
<i>Cirrhina mrigala</i>	2.75±0.54 Kg	NA	135.75±10.24	Agrawal and Mahajan (1980)
<i>Salvelinus alpinus</i>	12-14 cm	8-10	60-90	Dabrowski (1991)
<i>Menidia estor</i>	15.54±1.01 cm	0.11-0.25	81.43 ± 24.61	Este trabajo

IGS: Indice Gonadosomático

NA: No analizado

Se puede concluir que el estrés causado por tres horas de transporte no es suficiente para causar cambios significativos en las concentraciones de TAA de los tejidos de *M. estor*, pero si es suficiente para cambiar significativamente la proporción de AA y DHAA en las gónadas de las hembras. Aunque los cambios en los niveles de TAA en los tejidos después de la situación de estrés no fueron significativos, existieron algunas variaciones y puede ser que mayores períodos de estrés por transporte resulten en cambios más significativos.

Referencias

Agrawal, N.K. and C.L. Majan. 1980. Comparative tissue ascorbic acid studies in fishes. J. Fish. Biol; 17: 135-141.

Alexis M.N; Nengas, I; Fountoulaki, E; Papoutsi, E; Andriopoulou, A; Koutsodimou, M. and J. Gabaudan. 1999. Tissue ascorbic acid levels in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fingerlings fed diets containing different forms of ascorbic acid. *Aquaculture*, 179: 447-456.

Armijo, O.A. y Y.L. Sasso. 1976. Observaciones preliminares en acuarios sobre incubación y alevinaje de aterínidos (*Chirostoma* spp.) del lago de Pátzcuaro, Michoacán. Fideicomiso para el desarrollo de la Fauna Acuática (3). 13pp.

Dabrowski, K. 1991. Ascorbic acid status in high-mountain charr, *Salvelinus alpinus*, in relation to the reproductive cycle. *Environmental Biology of Fishes*, 31: 213-217.

Dabrowski, K. and A. Ciereszko. 1996. The dynamics of gonad growth and ascorbate status in yellow perch. *Aquaculture Research*, 27: 539-542.

Gabaudan, J. and V. Verlhac. 2001. Critical review of the requirements of ascorbic acid in cold and cool water fishes (salmonid, percids, plecoglossids and flatfishes). *In: Dabrowski K (Ed.). Ascorbic Acid in aquatic organisms. Status and perspectives.* CRC Press. U.S.A. 33-48 pp.

Henrique, M ; Gomes, E ; Gouilloou-Coustans, M; Oliva-Tele, A. and S. Davies. 1998. Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 161(1-4): 415-426.

Hilton, J. W; Cho, C.Y. and S.J. Slinger. 1977. Evaluation of the ascorbic acid status of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board Can.* 34: 2207-2210.

Lara, V.A. 1974. Aspectos del cultivo extensivo e intensivo del pescado blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor estor*, Jordan 1879. Actas del Simposio sobre Acuicultura en América Latina. Documentos de Investigación. Montevideo, Uruguay. Informes de Pesca, FAO, Roma. 159(1): 113-116.

Lee, K.J. and K. Dabrowski. 2004. Long-term effects and interactions of dietary vitamins C and E on growth and reproduction of yellow perch, *Perca flavescens*. *Aquaculture* 230: 377-389.

Li, M.H; Wise, D.J. and E.H. Robinson. 1998. Effect of dietary vitamin C on weight gain, tissue ascorbate concentration, stress response and disease resistance of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J. World Aquacult. Soc.* 29 (1):1-8.

Lim, C. and R.T. Lovell. 1978. Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Nutr.* 108: 1137-1146

Lim, C; Klesius, P.H; Li, M.H. and E. Robinson. 2000. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture*, 185: 313-327.

Lygren, B; Sveier, H; Hjeltnes, B. and R. Waagbø. 1999. Examination of the immunomodulatory properties and the effect on disease resistance of dietary bovine lactoferrin and vitamin C fed to Atlantic salmon (*Salmo salar*) for a short-term period. *Fish Shellfish Immunology*, 9: 95-107.

Martínez-Palacios, C.A; Barriga-Tovar, E; Taylor, J.F; Ríos-Durán, G. and L.G. Ross. 2002a. Effect of temperature on growth and survival of *Chirostoma estor estor*, Jordan 1879, monitored using a simple video technique for remote measurement of length and mass of larval and juvenile fishes. *Aquaculture*, 209: 369-377.

Martínez-Palacios, C.A; Ríos-Durán, M.G; Campos Mendoza, A; Toledo Cuevas, M; Aguilar-Valdez, M.C. and L.G. Ross. 2002b. Progresos en el cultivo del pescado blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor estor*. *Ciencia Nicolaita*, 32: 73-90.

Martínez-Palacios, C.A; Comas Morte, J; Tello-Ballinas, J.A; Toledo-Cuevas, M. and L.G. Ross. 2004. The effects of saline environments on survival and growth of eggs and larvae of *Chirostoma estor estor* Jordan 1880 (Pisces: Atherinidae). *Aquaculture*, 238: 509-522.

Montero, D; Marrero, M; Izquierdo, M.S; Robaina, L; Vergara, J.M. and D.L. Tort. 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture*, 171: 269-278.

Pankhurst, N. and G. Van Der Kraak. 1997. Effects of stress on reproduction and growth of fish. *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Iwama, G., Pickering, A., Sumpter, J., Schreck, C. (eds.). Cambridge UK. Cambridge University Press. 62: 73-93.

Papp, Zs. Gy; Saroglia, M; Jeney, Zs. and G. Terova-Saroglia. 1997. Methodological study on the determination of vitamin C requirements of different fish species. Reports of intersessional working parties meetings, 1997. N° 541, suppl., p123.

Papp, Zs. Gy; Saroglia, M. and G. Terova. 1998. An improved method for assay of vitamin C in sample series of fish feed and tissues. *Chromatographia*, 48(1/2): 43-47.

Patro, U.K.N. and B.K. Patnaik. 1979. Change in ascorbic acid, glycogen and protein of muscle and brain of *Ophiocephalus punctatus* Bloch following short-term cold stress. *Indian J. exp. Biol.* 17: (521-522).

Robinson, E.H. 1989. Vitamin C in catfish nutrition. Delta Branch Experiment Station, Mississippi State University. Takeda, USA.

Ross, L.G; Martínez-Palacios, C.A; Aguilar Valdez, M.C; Beveridge, M.C.M. and M.C. Chavez Sánchez. 2006. Determination of feeding mode in fish: the importance of using structural and functional feeding studies in conjunction with gut analysis in a

selective zooplanktivore *Chirostoma estor estor* Jordan 1880. Journal of Fish Biology, 68: 1-13.

Saborowski, R; Koprivnjak, J.F; Sisak, M.M; Sahling, G; Buchholz, F; Lum, K.R. and R. Schneider. 1997. Ascorbic acid in the gonads of North Sea dab (*Limanda limanda*) during the reproductive cycle. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science, 54: 2847-2852.

Sandnes, K. and O.R. Braekkan. 1981. Ascorbic acid and the reproductive cycle of ovaries in cod (*Gadus morhua*). Comparative Biochemistry and Physiology, 70A: 545-546.

Seymour, E.A. 1981. The effects of powdered carp pituitary on ovarian development, ovarian ascorbic acid and ovulation in *Carassius carassius* L. exposed to various photoperiod and temperature regimes. J. Fish Biol., 19: 675-682.

Thomas, P. 1984. Influence of some environmental variables on the ascorbic acid status of mullet, *Mugil cephalus* L., tissues. I. Effect of salinity, capture-stress and temperature. J.Fish Biol., 25:711-720.

Wee, K.L. 1996. The role of vitamin C in aquaculture. Proceedings of the seminar on fisheries multibillion dollar industry held at Madras, India. August 17-19, 1995. Krishnamoorthi, B., Krishnamoorthi, K. Meenakshisundaram, P., K. Nayar (eds.). Madras India Aquaculture Foundation of India. 50-62pp.

CAPITULO 2

**EFFECTO DEL USO DE *Artemia franciscana* ADULTA CONGELADA
ENRIQUECIDA CON VITAMINA C COMO SUPLEMENTO ALIMENTICIO
SOBRE LA REPRODUCCIÓN DEL PEZ BLANCO**

Resumen

Se evaluó el efecto del uso de *Artemia franciscana* adulta congelada, enriquecida con vitamina C, como suplemento alimenticio en reproductores de pez blanco, sobre la calidad de los desoves en la primera reproducción. Juveniles de pez blanco (*Menidia estor*) (10.8 ± 1.44 g de peso inicial) se alimentaron durante 200 días con alimento extrudizado flotante comercial para trucha (45% de proteína y 14% de lípidos), suplementado con *Artemia franciscana* adulta congelada con dos niveles de enriquecimiento de vitamina C (*Artemia* enriquecida con aceite de pescado: N1 y *Artemia* enriquecida con aceite de pescado y vitamina C: N2). Una vez los peces alcanzaron la madurez sexual y empezaron a reproducirse (a los 125 días), se evaluó la calidad de los desoves durante 75 días en términos de número de huevos producidos, % de fertilización, % de huevos viables y contenido de vitamina C (ácido ascórbico total: AAT). Se evaluó la calidad de los tres primeros desoves en términos de % de oculación, % de eclosión y contenido de AAT de huevos y larvas. De la misma manera se evaluó el contenido de vitamina C de las gónadas de los reproductores al final del experimento y se determinó el índice gonadosomático. No se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los dos tratamientos, en el número de desoves, el número de huevos por desove, el número de huevos fertilizados y el % de huevos viables. En el primer desove, con el tratamiento N2 se obtuvieron los valores más altos ($p < 0.05$) en el número de huevos oculados (%) y en los porcentajes de eclosión. En el segundo no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos y en el tercero, los huevos del tratamiento N2 mostraron mayor porcentaje de eclosión. No se presentaron diferencias en los valores de índice gonadosomático IGS, ni en las concentraciones de AAT de las gónadas, huevos y larvas entre los tratamientos. En ambos tratamientos, las hembras presentaron una concentración significativamente mayor de AAT en las gónadas que los machos. En ambos tratamientos, la fecundidad, al igual que el % de huevos viables, no varió significativamente entre desoves consecutivos. Se concluye que, bajo las condiciones del experimento, el contenido de vitamina C del alimento de los reproductores influye en la calidad de huevos, en cuanto a los porcentajes de oculación y eclosión, pero no en cuanto número de huevos producidos ni al contenido de vitamina C de gónadas, huevos y larvas.

Palabras Clave: *Artemia franciscana* congelada; enriquecimiento con vitamina C; L-Ascorbil-2-Polifosfato (AsPP); *Menidia estor*; reproducción; calidad de huevos y larvas.

Introducción

La Vitamina C en la reproducción de los peces

En los peces se ha observado que el estado nutricional de los reproductores puede afectar la calidad de las crías. La acumulación de nutrientes esenciales en los huevos depende de las reservas de nutrientes en los padres y así de la dieta de los reproductores en el periodo que precede a la gonadogénesis (Blom and Dabrowski, 1996). Por tal razón, la nutrición de los reproductores requiere especial atención, para garantizar el desarrollo y supervivencia óptimos de las larvas durante el período de alimentación endógena y la primera alimentación exógena.

En varias especies de peces se han encontrado efectos benéficos de la suplementación de dietas de reproductores con vitamina C en la fertilidad. En la trucha arco iris, Blom and Dabrowski (1995) encontraron que la saturación de los niveles de ácido ascórbico en los ovarios ocasiona un incremento en la cantidad y una mejor calidad de los huevos. En peces como la tilapia (*Oreochromis mossambicus*) y la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) se ha encontrado que la vitamina C incrementa la eclosión de los huevos y que las reservas de esta vitamina en los huevos puede ser transferida a las larvas recién eclosionadas para proveer ácido ascórbico durante los estadios tempranos de vida (Soliman *et al.*, 1986; Dabrowski and Blom, 1994).

Existe evidencia de que la vitamina C cumple un papel crucial en la reproducción de los peces. En tilapia (*Oreochromis mossambicus*), Soliman *et al.* (1986) observó una maduración retardada en peces alimentados con dietas deficientes en vitamina C. Los ovarios presentan uno de los mayores contenidos de vitamina C ($\mu\text{g g}^{-1}$ de tejido fresco) con respecto a los demás tejidos en los peces (ver capítulo 1) y este contenido cambia durante el ciclo reproductivo; se ha observado que durante el estadio temprano de maduración de los ovarios de peces como la carpa, su contenido de vitamina C se

incrementa, para posteriormente reducirse en el estadio final de maduración, previo a la ovulación (Masumoto *et al.*, 1991).

Al parecer, el ácido ascórbico está implicado en la biosíntesis de esteroides sexuales. Durante la síntesis de estos esteroides, que es muy activa durante la maduración sexual, se reducen los niveles de ácido ascórbico en las gónadas. Si se proporcionan dietas deficientes de ácido ascórbico, la reducción de la vitamina en las gónadas ocasiona una reducción en la eclosión y viabilidad de los huevos. Por el contrario, si se proporciona a los peces una dieta suplementada con esta vitamina, los niveles de ácido ascórbico en los ovarios se restauran y se incrementa la viabilidad de los huevos (Akiyama *et al.*, 1990). En trucha arco iris se ha encontrado que a medida que se incrementa el nivel de vitamina C de la dieta, se incrementa su concentración en los ovarios y consecuentemente se incrementa la masa de los huevos, la fecundidad y la supervivencia de los embriones (Bloom and Dabrowski, 1995).

La vitamina C no sólo funciona como antioxidante celular, sino que también modula muchos procesos bioquímicos intracelulares y extracelulares. Se ha encontrado que esta vitamina ofrece efectos positivos sobre la reanudación de la meiosis en los ovocitos y el desarrollo de los blastocistos en mamíferos (Tao *et al.*, 2004). También se ha encontrado que además de mejorar el desarrollo de los ovocitos, el ácido ascórbico está presente en altas cantidades en los folículos pre-ovulatorios, para prevenir la apoptosis (muerte celular) folicular en porcinos, ratas y ratones (Tilly and Tilly, 1995; Eppig *et al.*, 2000). Hossein *et al.* (2007) demostraron que el ácido ascórbico puede ofrecer efectos benéficos sobre la frecuencia de formación de blastocistos y sobre el número de células en los mismos, dependiendo de su concentración y del tiempo en el que se proporcione esta vitamina como suplemento. También se ha reportado que esta vitamina mejora la diferenciación de células embrionarias en neuronas, miocitos y otros tipos de células durante el desarrollo embrionario aunque los mecanismos no son bien conocidos hasta el momento (Takahashi, 2003; Shin *et al.* 2004).

En peces teleósteos, se sabe que el ácido ascórbico de la dieta tiene un efecto directo sobre la calidad de los gametos, pero el mecanismo de acción de esta vitamina a través de los eventos reproductivos no se ha definido claramente. Se ha sugerido que el crecimiento gonadal en respuesta a la estimulación por gonadotropina, compromete la interacción directa de entre catecolaminas y esteroides y sus sitios de recepción, la cual actúa como un mecanismo regulatorio de absorción de ascorbato, transferencia y metabolismo en el sistema reproductivo, lo cual sugiere que el ácido ascórbico es un nutriente muy importante en las funciones del tejido gonadal (Dabrowski & Ciereszko, 2001).

El papel de la vitamina C en el sistema reproductivo de los peces machos, no ha sido ampliamente estudiado, a pesar de que en otras especies como el hombre se ha demostrado que tiene efectos benéficos en la calidad del esperma. Ciereszko & Dabrowski (1995) encontraron que en trucha arco iris, las concentraciones de espermatozoides y su motilidad está relacionada con las concentraciones de ácido ascórbico del plasma seminal. Los mismos autores en un experimento posterior (Dabrowski & Ciereszko, 1996) también encontraron una correlación entre la supervivencia de embriones y las tasas de eclosión, y las concentraciones de ácido ascórbico del plasma seminal.

Uso de Artemia enriquecida y congelada como suplemento alimenticio

En el salmón (*Oncorhynchus kisutch*) se ha observado que al alimentar las crías con *Artemia* adulta crecen significativamente más rápido que con otras dietas, principalmente debido a un incremento en el consumo de alimento (Kim *et al.*, 1996). El pez blanco de Pátzcuaro, al igual que los peces marinos muestra una marcada preferencia por el alimento vivo, incluso en la edad adulta, y se ha observado que prefiere la *Artemia* a las dietas artificiales (Martínez-Palacios *et al.*, 2002; Martínez-Palacios *et al.*, 2006; Ross *et al.*, 2006).

Aunque usualmente en la acuicultura se utiliza la *Artemia* viva como alimento debido a su valor nutritivo, su mantenimiento es costoso y muchas veces puede ser fuente de

contaminación. Por tal razón la *Artemia* puede congelarse para su uso posterior en la alimentación de peces o crustáceos (Sorgeloos *et al.*, 2001).

La *Artemia* congelada, tiene un costo menor, pero puede resultar en menor crecimiento y supervivencia que al utilizarla viva. Takata & Portella (2007) encontraron que alimentar juveniles de surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) con *Artemia* congelada se presentaban tasas de supervivencia tan altas como en los peces alimentados con *Artemia* viva. Sin embargo, aunque el crecimiento fue similar al de peces alimentados con nauplios vivos, cuando se proporcionaron juveniles de *Artemia* vivos, los peces mostraron un mejor crecimiento. Moler *et al.* (1998) habían encontrado resultados similares en el esturión atlántico, en el que encontraron supervivencias similares en los tratamientos de *Artemia* viva y congelada, pero los peces que recibieron la *Artemia* congelada crecieron menos que aquellos alimentados con *Artemia* viva. No obstante los autores aclaran que el alimento congelado se ofreció tres veces al día, mientras que el alimento vivo se proporcionó cada media hora, y proponen que la *Artemia* congelada es una buena alternativa si se incrementa la frecuencia de alimentación.

La *Artemia* en sí, puede tener deficiencias de ciertos nutrientes; su calidad nutricional se puede mejorar mediante su enriquecimiento con técnicas de bioencapsulación. Tlusty *et al.* (2005) demostraron que con el uso de *Artemia* enriquecida congelada, se pueden observar mejores crecimientos y supervivencias en langostas, con lo que se tendría una dieta más eficiente que cuando se utiliza *Artemia* sin enriquecer. Adicionalmente, al enriquecer la *Artemia* con suplementos nutritivos como ácidos grasos o vitaminas, como el ácido ascórbico, se puede estimular el rendimiento reproductivo. Se ha encontrado que la *Artemia* adulta congelada y más aún la *Artemia* enriquecida congelada (AEC), como suplemento en la dieta, puede incrementar el rendimiento reproductivo en camarones como *Penaeus semisulcatus*, *P. vannamei* y *Stenopus scutellanus* (Browdy *et al.*, 1989; Naessens *et al.*, 1997, Lin and Shi, 2002). Naessens *et al.* (1997) encontraron además en *P. vannamei* que, aunque el suministro de AEC parece no afectar las tasas de apareamiento o fertilización, existe una tendencia clara a incrementar el éxito en el apareamiento y la eclosión cuando la AEC se incluye en una dieta mezclada. Según los autores, mejores tasas

de apareamiento y eclosión, pueden resultar en mejoras en la producción de larvas, y por ello concluyen que se puede utilizar AEC como suplemento en dietas para maduración de camarones. Existe poca información acerca del uso de AEC en dietas para maduración de peces, pero es posible que tenga efectos similares en el desempeño reproductivo.

Hasta el momento se desconoce el papel de la vitamina C en el desempeño reproductivo del pez blanco de Pátzcuaro (*Menidia estor*). El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos del uso de *Artemia franciscana* adulta congelada con dos niveles de enriquecimiento de vitamina C como suplemento alimenticio sobre la calidad de huevos y larvas en la primera reproducción del pez blanco de Pátzcuaro.

Metodología

Peces experimentales

Se obtuvieron juveniles de pez blanco *M. estor* (10.8 ± 1.44 g) provenientes de desoves diferentes, en el Laboratorio de Nutrición y Acuicultura del Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo), Morelia, Michoacán, México. Los juveniles fueron mantenidos con una dieta estándar (40% proteína, 10% lípidos) y nauplios de *Artemia franciscana* hasta 15 días antes del experimento. Durante los 15 días previos al experimento, los peces fueron aclimatados al sistema experimental y se continuaron alimentando con *Artemia*.

Alimento utilizado

Para evaluar el efecto de la suplementación del alimento con vitamina C sobre la primera reproducción del pez blanco, se utilizó alimento extrudizado flotante comercial para trucha (45% de proteína y 14% de lípidos, El Pedregal Silver Cup®), además de *Artemia franciscana* adulta congelada^I con dos niveles de enriquecimiento. Un nivel consistió en

^I Se utilizó la *Artemia* enriquecida congelada debido a que no era posible realizar un enriquecimiento diario que permitiera proporcionarla fresca y recién suplementada a los peces.

enriquecer adultos de *Artemia* con emulsiones de aceite de hígado de bacalao, mientras que el otro, en enriquecer con emulsiones del aceite de hígado de bacalao y vitamina C (L-Ascorbil-2-Polifosfato (AsPP), Rovimix® Stay-C® 35, DSM Nutritional Products).

Enriquecimiento de los adultos de Artemia franciscana

Previamente al inicio del experimento fue necesario iniciar el cultivo de *Artemia franciscana* a partir de nauplios recién eclosionados^{II} y se obtuvieron los primeros adultos al cabo de 30 días aproximadamente. Las artemias en cultivo fueron mantenidas a una temperatura aproximada de 25°C y una salinidad promedio de 25; fueron alimentadas diariamente con microalgas del género *Chlorella sp*^{III} y cada tercer día con leche de soya.

Posteriormente a la obtención de los primeros adultos, se realizaron dos pruebas preliminares de enriquecimiento de la *Artemia* adulta con aceite de hígado de bacalao y vitamina C particulada (Vitamina C estabilizada: L-Ascorbil-2-Polifosfato (AsPP), Rovimix® Stay-C® 35, DSM Nutritional Products), con el fin de probar la eficiencia del método de enriquecimiento con esta forma de vitamina C, puesto que normalmente para enriquecer el alimento vivo, se utiliza la vitamina en forma de ascorbil palmitato.

^{II} Se estableció un sistema para el cultivo de *Artemia* que constó de 7 tanques circulares de 2 m de diámetro x 1 m de profundidad en un invernadero. Se utilizaron quistes de *Artemia Franciscana* Salt Creek®, los cuales fueron decapsulados e incubados por 24 horas hasta su eclosión. Los nauplios de *Artemia* recién eclosionados se sembraron en los tanques donde se cultivaron durante un mes, hasta obtener las *Artemias* adultas.

^{III} Se estableció un cultivo de microalgas (*Chlorella sp.*) en un invernadero, para lo cual se utilizó un tanque cónico de fibra de vidrio de 100 L de capacidad con aireación constante, a una temperatura promedio de 25°C. Para el medio de cultivo se utilizó fertilizante comercial BAYFOLAN® (BAYER®) (24N:17P:13K).

Primera prueba preliminar

Se evaluaron cinco tratamientos de enriquecimiento de *Artemia franciscana* adulta, para lo cual se elaboraron cinco emulsiones en las que se utilizó lecitina de soya líquida como agente tensoactivo:

- Emulsión (aceite/agua) de aceite de hígado de bacalao (E1)
- Emulsión (aceite/agua) de aceite de hígado de bacalao y 10% de vitamina C* (E2)
- Emulsión (aceite/agua) de aceite de hígado de bacalao y 15% de vitamina C* (E3)
- Emulsión (aceite/agua) de aceite de hígado de bacalao y 20% de vitamina C* (E4)
- Emulsión (aceite/agua) de aceite de hígado de bacalao y 25% de vitamina C* (E5)

* Porcentaje de inclusión de vitamina C en la emulsión^{IV}.

La composición de las emulsiones preparadas se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Composición de las emulsiones preparadas para los tratamientos de enriquecimiento. Los datos se expresan en g para cada Litro de medio de enriquecimiento.

Ingrediente	E 1	E 2	E3	E4	E5
Aceite ¹ (g)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Lecitina de soya (g)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Vitamina C ² (g)	0	0.17	0.26	0.34	0.43

¹ Aceite de hígado de Bacalao

² Vitamina C estabilizada: L-Ascorbil-2-Polifosfato (AsPP), Rovimix® Stay-C® 35 (DSM Nutritional Products)

Una vez preparadas las emulsiones, se procedió a llevar a cabo la prueba de enriquecimiento de adultos de *Artemia*. Los cinco tratamientos (correspondientes al

^{IV} La vitamina C utilizada contenía el 35% de ingrediente activo, factor que se tuvo en cuenta a la hora de pesarla para la preparación de las emulsiones. Por ejemplo, 0.17g (tabla 1) contienen 0.06g de ingrediente activo, valor que corresponde al 10% del peso del aceite de pescado + la lecitina de soya.

enriquecimiento con las cinco emulsiones) se evaluaron por triplicado, para tener un total de 15 unidades experimentales. El sistema experimental consistió en 15 tinas plásticas de 3L de capacidad con aireación constante, en un sistema de baño María para mantener la misma temperatura en todos los tratamientos. En cada tina se sembraron 2 g de artemia adulta por 3 L de agua a una salinidad de 25. Para cada tratamiento la emulsión fue adicionada en dos dosis consecutivas de 0.3 g.L⁻¹: una al inicio del enriquecimiento y la segunda a las 12 h (Merchie *et al.*, 1995); se mantuvo aireación fuerte para mantener los niveles de oxígeno disuelto por encima de 4 mg.L⁻¹ y una temperatura controlada de 25° C. Las artemias enriquecidas de cada tratamiento se colectaron a las 24 horas de enriquecimiento, después de lo cual se lavaron con agua dulce, se retiró el exceso de agua y se congelaron a -80° C, para el posterior análisis de su contenido de vitamina C y observar los niveles de enriquecimiento. Las muestras se analizaron por cromatografía de líquidos de alta resolución. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos de ácido ascórbico total por tratamiento.

Tabla 2. Valores promedio de ácido ascórbico total ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco) en *Artemia franciscana* sometida a los diferentes tratamientos de enriquecimiento. Valores con los mismos superíndices no presentan diferencias significativas entre sí.

Tratamiento (emulsión de enriquecimiento)	Ácido ascórbico total ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco)
Aceite ¹	161.57 ± 13.77 ^a
Aceite ¹ + 10% de vitamina C ²	251.48 ± 21.19 ^b
Aceite ¹ + 15% de vitamina C ²	275.57 ± 14.51 ^b
Aceite ¹ + 20% de vitamina C ²	286.70 ± 12.85 ^b
Aceite ¹ + 25% de vitamina C ²	411.21 ± 9.38 ^c

¹Aceite de Hígado de Bacalao

²Vitamina C estabilizada: L-Ascorbil-2-Polifosfato (AsPP), Rovimix® Stay-C® 35 (DSM Nutritional Products)

Segunda prueba preliminar

Se evaluaron tres tratamientos de tiempos de enriquecimiento de *Artemia* adulta, para lo cual se elaboró una emulsión de aceite de hígado de bacalao y 25% de vitamina C. Los tratamientos consistieron en:

- Tratamiento 1: Tiempo de enriquecimiento de 6 horas
- Tratamiento 2: Tiempo de enriquecimiento de 12 horas
- Tratamiento 3: Tiempo de enriquecimiento de 24 horas

Los tres tratamientos se evaluaron por triplicado, para tener un total de 9 unidades experimentales. El sistema experimental consistió en 9 tinas plásticas de 3L de capacidad con aireación constante, en un sistema de baño María para mantener la misma temperatura en todos los tratamientos. En cada tina se sembraron igualmente 2 g de *Artemia* adulta por 3 L de agua a una salinidad de 25. Para cada tratamiento la emulsión fue adicionada en dos dosis consecutivas^V de 0.3 g.L⁻¹ (Merchie *et al.*, 1995), se mantuvo aireación fuerte para mantener los niveles de oxígeno disuelto por encima de 4 mg.L⁻¹ y una temperatura controlada de 25° C. Las artemias enriquecidas de cada tratamiento se colectaron a los diferentes tiempos de enriquecimiento, después de lo cual se lavaron con agua dulce, se retiró el exceso de agua y se congelaron a -80° C, para el posterior análisis. De la misma manera, las muestras se analizaron por cromatografía de líquidos de alta resolución. No se presentaron diferencias significativas en el contenido de vitamina C de las artemias enriquecidas durante los diferentes tiempos ($p > 0.05$) (Tabla 3).

Tabla 3. Valores promedio de ácido ascórbico total ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco) en *Artemia franciscana* sometida a los diferentes tratamientos de enriquecimiento. No se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Tratamiento (tiempo de enriquecimiento)	Ácido ascórbico total ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco)
6 horas	134.93±22.64
12 horas	144.05±22.56
24 horas	148.27±19.33

Enriquecimiento y congelación de Artemia para el experimento

^V Para el caso del tratamiento de 6 horas de enriquecimiento, la primera dosis se proporcionó al inicio del enriquecimiento y la segunda a las 3 h; mientras que para el de 12 horas se adicionó la primera dosis al inicio y la segunda a las 6 h de enriquecimiento; para el tratamiento de 24 horas se proporcionó una al inicio y la segunda a las 12 h de enriquecimiento.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las dos pruebas preliminares, se decidió enriquecer las artemias durante 6 horas y utilizar un 35% de vitamina C^{VI} para el tratamiento que se enriquecería con esta vitamina. Así, el primer tratamiento de enriquecimiento de *Artemia* consistió en suplementar los adultos de *Artemia* con una emulsión (aceite/agua) de aceite de hígado de bacalao (*Artemia* N1) y el segundo en enriquecerlos con una emulsión (aceite/agua) con el aceite y el 35% de vitamina C (*Artemia* N2). Para los dos tratamientos se utilizó lecitina de soya líquida como agente tensoactivo. Las emulsiones se prepararon de la siguiente manera:

Se pesaron el aceite de hígado de bacalao, la lecitina de soya y la vitamina C (la última para el caso del tratamiento 2) (tabla 4). Para la emulsión del tratamiento 1, se dispersó la lecitina de soya en el aceite y para la del tratamiento 2, se dispersaron la lecitina y la vitamina C en el aceite. En cada caso, una vez obtenida la dispersión, se empezó a añadir gota a gota a un litro de agua, mientras se homogenizaba a baja velocidad en un homogenizador Power Gen® Fisher Scientific®. Durante el proceso de homogenización se utilizó un recipiente con hielo alrededor del contenedor de la emulsión para evitar el calentamiento de la misma y mantener una temperatura menor a 30° C, evitando así la separación de las fases (aceite/ agua). Una vez que se terminó de incorporar la dispersión, se homogenizó la mezcla a máxima velocidad durante un minuto. Las emulsiones así obtenidas, estaban listas para el proceso de enriquecimiento.

Tabla 4. Composición de las emulsiones preparadas para los tratamientos de enriquecimiento. Los datos se expresan en g para cada Litro de medio de enriquecimiento.

Ingrediente	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Aceite ¹ (g)	0.4	0.4
Lecitina de soya (g)	0.2	0.2
Vitamina C ² (g)	0	0.6

¹ Aceite de hígado de Bacalao

² Vitamina C estabilizada: L-Ascorbil-2-Polifosfato (AsPP), Rovimix® Stay-C® 35 (DSM Nutritional Products)

^{VI} Para este caso, la vitamina C utilizada también contenía el 35% de ingrediente activo, factor que se tuvo en cuenta a la hora de pesarla para la preparación de las emulsiones. Así 0.6g (tabla 4) contienen 0.21g de ingrediente activo, valor que corresponde al 35% del peso del aceite de pescado + la lecitina de soya.

El sistema en el que se enriquecieron las *Artemias* consistió en dos recipientes plásticos de 20L de capacidad con aireación constante, en un sistema de baño María para mantener la misma temperatura en ambos tratamientos. En cada recipiente se sembraron 200 g (peso húmedo) de *Artemia* adulta por 20L de agua a una salinidad de 25. Para cada tratamiento la emulsión fue adicionada en dos dosis consecutivas, la primera al inicio del enriquecimiento y la segunda a las 3 horas; se mantuvo aireación fuerte para mantener los niveles de oxígeno disuelto por encima de 4 mg.L^{-1} y una temperatura controlada de 25° C . Las artemias enriquecidas de cada tratamiento se colectaron a las 6 horas de enriquecimiento, después de lo cual se lavaron con agua dulce, se retiró el exceso de agua, se pesaron y se congelaron en capas menores a 1 cm de espesor (Sorgeloos *et al.*, 1986) a -80° C , en un ultracongelador, hasta el momento de la alimentación. Las raciones de artemia a proporcionar cada día se congelaron por separado. Se enriqueció *Artemia* y se congeló semanalmente, debido a que no era posible realizar un enriquecimiento diario.

Protocolo experimental

El experimento constó de dos tratamientos de alimentación, con tres repeticiones cada uno, teniendo un total de seis (6) unidades experimentales. El sistema experimental se conformó de seis tanques circulares de fibra de vidrio de 450 L de capacidad (cada uno con aireación constante y recambio diario de agua del 50%). La temperatura del agua se mantuvo a $23.4 \pm 0.19^\circ \text{ C}$ y la salinidad a 5.0 g L^{-1} . Los valores promedio de oxígeno disuelto, pH y amonio fueron $6.2 \pm 0.03 \text{ mg.L}^{-1}$, 8.0 ± 0.25 , y 0.0 mg.L^{-1} , respectivamente.

Diez juveniles de pez blanco ($10.8 \pm 1.44 \text{ g}$) se sembraron en cada uno de los seis tanques experimentales. Tres de los tanques (tratamiento 1) se alimentaron cuatro veces al día con el alimento extrudizado y dos veces al día con *Artemia franciscana* adulta enriquecida con aceite de pescado (Artemia N1), para obtener un total de seis alimentaciones diarias, ofrecidas en intervalos de una hora; los otros tres (tratamiento 2) se alimentaron de la misma manera pero utilizando la *Artemia* enriquecida con aceite de pescado y vitamina C

(*Artemia* N2). Todos se alimentaron diariamente a una ración del 5% del peso corporal^{VII}. Los peces se mantuvieron de esta manera durante 200 días. Durante los primeros 125 días los peces fueron mantenidos con fotoperíodo natural (12h luz: 12h oscuridad), al cabo de este tiempo cuando los peces alcanzaron la madurez sexual, se cambió el fotoperíodo a 18h luz: 6h oscuridad, para estimular la reproducción. Con el cambio de fotoperíodo los peces empezaron a reproducirse. Se anotó el número de desoves por tanque durante los 75 días restantes, se contaron los huevos de cada desove, anotando el número de huevos viables (fertilizados) y no viables, tomando muestras de los primeros para el análisis de vitamina C. La producción de huevos, al igual que el porcentaje de huevos viables se evaluó de esta manera durante los primeros siete desoves consecutivos.

La calidad de huevos y larvas se determinó mediante la medición de ácido ascórbico de huevos y larvas, además de la supervivencia y los porcentajes de fertilización, oculación y eclosión. Se tomaron huevos viables de los primeros tres desoves de cada tanque y se pusieron a incubar por triplicado en un sistema de baño maría a una temperatura de 25°C y una salinidad de 10, con aireación constante^{VIII}. A medida que se daba el desarrollo embrionario, se anotó el número de huevos oculados y se tomaron muestras de los mismos para análisis de vitamina C. Posteriormente se anotó el porcentaje de eclosión y se tomaron muestras de las larvas para análisis de vitamina C. Tanto las muestras de huevos fertilizados y oculados, como las de larvas se almacenaron a -80°C hasta el momento del análisis de ácido ascórbico.

Al cabo de los 200 días, los reproductores fueron contados, sexados y pesados y se sacrificaron con sobredosis de benzocaína. Se extrajeron las gónadas tanto de hembras como machos, se pesaron y se congelaron en nitrógeno líquido (-200°C aprox.) y posteriormente se almacenaron a -80° C en un ultra-congelador hasta el momento del análisis de vitamina C.

^{VII} Se proporcionó el alimento extrudizado a una ración del 4% del peso del cuerpo + *Artemia* enriquecida a una ración del 1% del peso, para dar un total de alimento de 5% del peso corporal al día.

^{VIII} La salinidad se redujo a 5 una vez que los huevos estuvieron oculados.

Se compararon los resultados del número de huevos oculados y eclosionados de los primeros tres desoves de ambos tratamientos, con el fin de evaluar el posible efecto de desoves consecutivos sobre la calidad de los huevos con respecto a los porcentajes de oculación y eclosión.

Se determinó el índice gonadosomático (IGS) de cada uno de los reproductores, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IGS (\%)} = [\text{peso de las gónadas (g)} / \text{peso del pez (g)}] * 100$$

Métodos analíticos

Análisis de vitamina C

Se evaluaron las concentraciones de ácido ascórbico total tanto de la *Artemia* enriquecida como de huevos, larvas y gónadas mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Tanto *Artemia*, huevos y larvas, como gónadas se pesaron y homogenizaron en un Buffer de Acetato de Sodio 0.2M frío a pH 4.8. La cuantificación de ácido ascórbico total en las muestras preparadas se llevó a cabo utilizando el método modificado por Papp *et al.* (1998) (Ver capítulo 1).

El análisis de ácido ascórbico del alimento balanceado utilizado se llevó a cabo de la misma manera descrita anteriormente, pero añadiendo la enzima fosfatasa ácida (Fosfohidrolasa Ortofosfórica-monoéster) para romper los enlaces fosfato.

Para todos los análisis se utilizaron reactivos ultrapuros de J.T. Baker (EUA), Fluka (Suiza), SIGMA (Alemania) y Aldrich (EUA), y para la filtración de buffers y homogenados se utilizaron filtros de membrana Durapore (Millipore) de 0.45 µm. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos (isocratic single column system, Agilent 1100 series) con un detector UV-visible y una columna Lichrosorb RP-18 (4.6 x 200mm, Agilent). La fase móvil consistió en una solución de acetato de sodio (0.04 M), con EDTA (0.05 mM) y

Tetrabutilamonio dihidrógeno fosfato (0.5 mM) a un pH de 3.76. Las condiciones cromatográficas fueron: Flujo= 0.5 ml/min; Presión= 65 bar; Longitud de onda (Detector UV)= 254 nm; Temperatura= 23°C; Volumen de inyección= 2 µL. Los cromatogramas fueron evaluados utilizando el software ChemStation Plus (Agilent).

Análisis de datos

Debido a que no pudo determinarse el sexo de los peces al inicio del experimento, la proporción sexual no fue la misma en todos los tanques; por tal razón los resultados obtenidos de número de desoves, número de huevos por desove, número total de huevos, número de huevos viables, huevos oculados (%) y huevos eclosionados (%) se sometieron a un modelo lineal general (ANOVA anidado), teniendo como factor principal el tratamiento de alimentación y como factor anidado la proporción sexual. De igual manera, para comparar los resultados obtenidos de índice gonadosomático (IGS) y concentración de vitamina C en gónadas, huevos y larvas, entre los tratamientos, los datos fueron sometidos al mismo modelo. Adicionalmente, se llevó a cabo un ANOVA bifactorial para comparar las concentraciones de vitamina C tanto entre estadios (huevos fertilizados, huevos oculados y larvas) como entre tratamientos. Para comparar los desoves consecutivos se utilizó también un ANOVA anidado, pero en este caso se tomó como factor anidado el orden de desove (primero, segundo y tercer desove). Por otro lado, para comparar los datos de concentración de vitamina C de la *Artemia* enriquecida se llevó a cabo una prueba de T-student con un nivel de confianza del 95%. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico MINITAB (versión 13.32) (MINITAB INC).

Resultados

Durante el período experimental no hubo un efecto significativo de la vitamina C sobre el crecimiento de los reproductores (tabla 5), ni se presentaron signos de escorbuto en los peces alimentados con suplemento de vitamina C (N2). La dieta suplementada con *Artemia* congelada, enriquecida únicamente con aceite de hígado de bacalao (N1), no tuvo un efecto negativo en el crecimiento o en las reservas de ácido ascórbico en los huevos producidos

durante el período de evaluación, y tampoco ocasionó signos de deficiencia de vitamina C en los reproductores. En la tabla 5 se muestran el número de desoves, el número de huevos por desove, el número de huevos fertilizados y el % de huevos viables, después de la alimentación suplementaria. No se presentaron diferencias significativas en ninguno de estos parámetros entre los dos tratamientos ($p > 0.05$). De la misma manera, la producción de huevos viables, no varió significativamente entre los primeros siete desoves consecutivos en ambos tratamientos (tabla 6).

Tabla 5. Datos de crecimiento, número de desoves, número de huevos por desove, número de huevos fertilizados y % de huevos viables después de alimentar reproductores de pez blanco con alimento balanceado y *Artemia* adulta con los dos niveles de enriquecimiento (N1 y N2). (Los datos se expresan como promedio \pm E.S.; valores con el mismo superíndice no presentan diferencias significativas: $p > 0.05$).

	Alimento balanceado + <i>Artemia</i> N1 ¹	Alimento balanceado + <i>Artemia</i> N2 ²
Concentración de Vitamina C del alimento ³ ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco)	117.74 \pm 11.09 ^a	180.47 \pm 17.90 ^b
Peso inicial reproductores (g)	12.27 \pm 0.14 ^a	10.37 \pm 0.89 ^a
Peso final hembras (g)	23.9 \pm 1.56 ^a	22.4 \pm 1.70 ^a
Peso final machos (g)	21.5 \pm 1.24 ^a	20.5 \pm 1.29 ^a
Peso Ganado (%) ♀	94.99 \pm 12.71 ^a	120.11 \pm 17.93 ^a
Peso Ganado (%) ♂	75.69 \pm 9.89 ^a	96.31 \pm 11.62 ^a
Nº de desoves Promedio ⁴	16 \pm 2.0 ^a	10 \pm 1.73 ^a
Nº total promedio de huevos	5218.0 \pm 1950 ^a	2978.7 \pm 1462.66 ^a
Nº huevos/desove ⁵	315.82 \pm 82.40 ^a	271.41 \pm 91.16 ^a
Nº huevos/desove/hembra	238.06 \pm 160.16 ^a	90.47 \pm 30.38 ^a
Nº huevos fertilizados	3916.5 \pm 1333.5 ^a	2341.7 \pm 1154.19 ^a
Fertilización (%) (huevos viables) ⁵	78.45 \pm 2.37 ^a	79.42 \pm 5.11 ^a

¹ *Artemia* N1: *Artemia franciscana* adulta enriquecida con aceite de hígado de bacalao.

² *Artemia* N2: *Artemia franciscana* adulta enriquecida con aceite de hígado de bacalao + vitamina C (L-Ascorbyl-2-Polifosfato [AsPP], Rovimix Stay C 35, Roche)

³ Concentración de Vit. C del alimento = Concentración Vit. C de la *Artemia* enriquecida en peso seco + Concentración Vit. C del alimento balanceado en peso seco.

⁴ Número de desoves promedio durante el período de evaluación

⁵ La proporción sexual causa un efecto sobre este parámetro.

Tabla 6. Porcentaje de huevos viables después de alimentar reproductores de pez blanco con alimento balanceado y *Artemia* adulta con los dos niveles de enriquecimiento (N1 y N2), durante los primeros siete desoves. Los datos se expresan como promedio \pm E.S. No se presentan diferencias significativas ($p>0.05$) entre los siete desoves de ambos tratamientos, ni entre los tratamientos.

Desove	Alimento balanceado	Alimento balanceado
	+ <i>Artemia</i> N1 ¹	+ <i>Artemia</i> N2 ²
1	85.88 \pm 7.19	70.52 \pm 15.79
2	77.71 \pm 11.14	90.24 \pm 2.52
3	81.16 \pm 11.73	97.18 \pm 0.97
4	77.16 \pm 5.37	79.61 \pm 13.72
5	94.26 \pm 5.04	87.95 \pm 2.14
6	75.25 \pm 13.58	56.35 \pm 10.32
7	83.91 \pm 8.10	85.62 \pm 11.04

Aunque las diferencias en vitamina C entre tratamientos no causaron un efecto sobre el número de huevos por desove y las tasas de fertilización, la proporción sexual sí lo causó; después de analizar los datos, la proporción sexual de 1:1 (1 hembra por 1 macho) es la que ofrece mejores resultados en cuanto a estos dos parámetros.

Al incubar los huevos viables del primer desove, se obtuvieron diferencias significativas ($p<0.05$) en el porcentaje de huevos oculados y en las tasas de eclosión (%) entre los dos tratamientos; los reproductores que se alimentaron con la *Artemia* enriquecida con vitamina C (N2) mostraron los valores más altos (Tabla 7). Sin embargo, en el segundo desove, no se presentaron diferencias significativas ($p>0.05$) de estos parámetros entre los tratamientos y en el tercer desove tampoco se presentaron diferencias significativas en el porcentaje de huevos oculados, pero hubo un valor significativamente mayor del porcentaje de huevos eclosionados en el tratamiento N2.

Tabla 7. Huevos oculados (%) y eclosionados (%) de pez blanco obtenidos de los tres primeros desoves de reproductores sometidos a los dos tratamientos de alimentación. Valores con diferente superíndice indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). No se presentaron diferencias significativas en estos parámetros entre los tres desoves.

	Alimento balanceado + <i>Artemia</i> N1	Alimento balanceado + <i>Artemia</i> N2
Primer desove		
Huevos Oculados (%)	36.89±6.03 ^a	39.01±5.04 ^b
Huevos Eclosionados (% del total de huevos incubados)	20.46±6.07 ^a	25.18±5.07 ^b
Segundo desove		
Huevos Oculados (%)	42.7±4.50 ^a	34.5±4.26 ^a
Huevos Eclosionados (% del total de huevos incubados)	26.06±2.22 ^a	18.31±2.01 ^a
Tercer desove		
Huevos Oculados (%)	36.82±3.26 ^a	35.24±7.08 ^a
Huevos Eclosionados (% del total de huevos incubados)	15.35±3.54 ^a	24.97±7.17 ^b

Artemia N1: *Artemia franciscana* adulta enriquecida con aceite de hígado de bacalao.

Artemia N2: *Artemia franciscana* adulta enriquecida con aceite de hígado de bacalao + 35 % de vitamina C (L-Ascorbyl-2-Polifosfato [AsPP], Rovimix Stay C 35, Roche)

Los desoves consecutivos tampoco mostraron un efecto sobre la calidad de los huevos con respecto a los porcentajes de oculación y eclosión, pues no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en estos valores entre desoves. De la misma manera, no se presentaron diferencias en los valores de índice gonadosomático (IGS), ni en las concentraciones de vitamina C (ácido ascórbico total: AAT) de las gónadas, entre los tratamientos ($p > 0.05$) (Tabla 8). Sin embargo, en ambos tratamientos, las hembras presentaron una concentración significativamente mayor de AAT en las gónadas que los machos.

Tabla 8. Índices gonadosomáticos y niveles de ácido ascórbico total (AAT) ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) encontrados en las gónadas después de alimentar reproductores de pez blanco con alimento balanceado y *Artemia* adulta con dos niveles de enriquecimiento. (Los valores se expresan como promedio \pm E.S.; valores con el mismo superíndice no presentan diferencias significativas entre tratamientos: $p>0.05$)

	Alimento balanceado + <i>Artemia</i> N1	Alimento balanceado + <i>Artemia</i> N2
IGS (%) hembras	3.54 \pm 2.04 ^a	2.86 \pm 0.72 ^a
IGS (%) machos	2.39 \pm 0.25 ^a	2.03 \pm 0.22 ^a
AAT ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) hembras*	130.25 \pm 21.96 ^a	139.57 \pm 8.26 ^a
AAT ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) machos*	83.35 \pm 7.97 ^a	85.73 \pm 7.7 ^a

Artemia N1: *Artemia franciscana* adulta enriquecida con aceite de hígado de bacalao.

Artemia N2: *Artemia franciscana* adulta enriquecida con aceite de hígado de bacalao + 35 % de vitamina C (*L-Ascorbyl-2-Polifosfato [AsPP]*, *Rovimix Stay C 35*, Roche)

* Al comparar los valores de AAT entre sexos, se presentan diferencias significativas ($p<0.05$).

En la figura 1 se observan las concentraciones de vitamina C (AAT) encontradas tanto en huevos fertilizados y oculados, como en larvas recién eclosionadas producidas por los reproductores sometidos a los dos tratamientos. No se presentaron diferencias significativas entre tratamientos en dichas concentraciones tanto de los huevos oculados y fertilizados como de las larvas ($p>0.05$). Sin embargo, al comparar los niveles de AAT entre estadios de desarrollo (huevos fertilizados, huevos oculados y larvas) si se presentaron diferencias significativas: las larvas contenían concentraciones de AAT significativamente mayores que los huevos fertilizados. Mientras tanto, los tratamientos por sí solos, así como la interacción entre tratamientos y estadios de desarrollo, no causaron un efecto significativo en las concentraciones de esta vitamina en los huevos y las larvas.

Discusión

Al analizar el contenido promedio de vitamina C de la *Artemia* proporcionada a los reproductores como suplemento alimenticio, no se obtuvo el nivel de enriquecimiento esperado para el caso de la *Artemia* enriquecida con vitamina C. Aunque la diferencia en las concentraciones de vitamina C de la *Artemia* entre los tratamientos N1 y N2 fue

significativa ($p < 0.05$), esta sólo fue de aproximadamente $63 \mu\text{g g}^{-1}$ en peso seco, cuando se esperaba una diferencia aproximada de $250 \mu\text{g g}^{-1}$, de acuerdo a las pruebas preliminares de enriquecimiento. El haber obtenido niveles de vitamina C más bajos de lo esperado, más que deberse a un inadecuado almacenamiento, pudo deberse a la densidad de *Artemia* en los medios de enriquecimiento, la cual fue mayor que la utilizada en las pruebas preliminares. Este error metodológico fue inevitable, debido a que no se contaba con el suficiente número de tanques en el momento de la experimentación, y por ello fue necesario incrementar la densidad de *Artemia* con respecto a la utilizada en dichas pruebas.

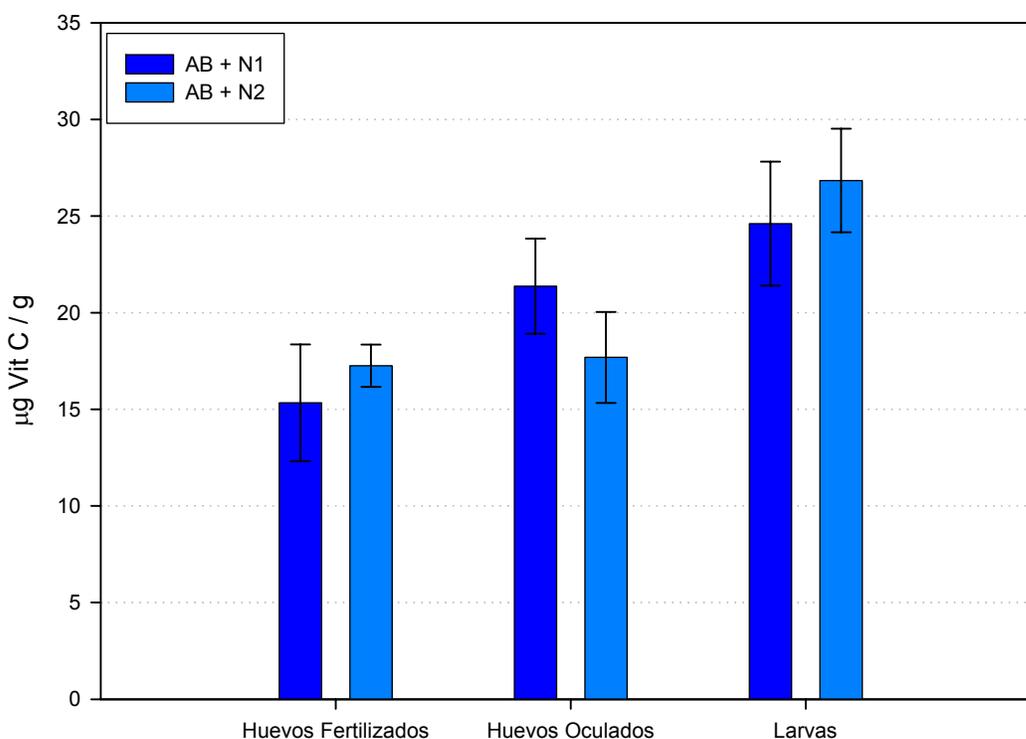


Figura 1. Concentraciones de ácido ascórbico total (AAT) ($\mu\text{g g}^{-1}$) en los huevos fertilizados, huevos oculados y larvas recién eclosionadas obtenidas de los reproductores de pez blanco sometidos a los dos tratamientos de alimentación. (AB + N1: Alimento balanceado + *Artemia* N1; AB + N2: Alimento balanceado + *Artemia* N2)

Durante los 200 días de alimentación (aproximadamente 6.5 meses), los peces alimentados sin suplemento de vitamina C (N1) incrementaron su peso entre 75.69% (machos) y 94.99% (hembras), mientras que los alimentados con suplemento de vitamina C (N2)

crecieron entre 96.31% (machos) y 120.11 % (hembras). Dabrowski & Blom (1994) obtuvieron crecimientos menores, entre 33.6% y 74.3%, en reproductores de trucha arco iris alimentados con una dieta deficiente de vitamina C y una dieta suplementada con una cantidad equivalente de $300 \mu\text{g g}^{-1}$ de ascorbil-2-monofosfato, durante 8 meses. A pesar de que en el presente estudio la *Artemia* enriquecida contenía un suplemento de sólo $63 \mu\text{g g}^{-1}$ y el tiempo de duración del experimento fue menor, se obtuvieron crecimientos mayores a los obtenidos por los autores mencionados, tanto en los reproductores alimentados sin suplemento de vitamina C como en los alimentados con suplemento de esta vitamina. Es importante aclarar que el peso inicial de los peces en ambos estudios fue diferente y que cada especie presenta patrones de crecimiento particulares; en el caso de este estudio se inició con juveniles (entre 10.37 y 12.27 g) y se evaluó su primera reproducción, mientras que en el estudio con trucha arco iris se inició con peces adultos (977 ± 220 g). Los peces juveniles por lo general presentan mayores tasas de crecimiento que los adultos, lo cual, además de las características particulares de la especie, puede explicar las diferencias en crecimiento.

Lee & Dabrowski (2004) realizaron un experimento con perca canadiense (*Perca flavescens*) en el que también empezaron con juveniles y evaluaron los efectos de la vitamina C en el crecimiento y la reproducción, después de alimentar los peces durante 8 meses, con dietas con y sin vitamina C, y obtuvieron mayores tasas de crecimiento que las obtenidas en el presente trabajo. Por otro lado, mientras que los autores obtuvieron las mayores tasas de crecimiento y supervivencia en peces alimentados con dietas suplementadas con vitamina C, en el presente estudio no se observó un efecto significativo de la vitamina C sobre el crecimiento de *M. estor*.

Tampoco hubo un efecto significativo de la vitamina C sobre la fecundidad del pez blanco, en términos de número promedio de desoves y número de huevos producidos por desove, así como tampoco sobre el porcentaje de fertilización. Existen varios estudios en otras especies de peces como el bacalao (*Gadus morhua*), la perca europea (*Dicentrarchus labrax*) y el lenguado (*Scophthalmus maximus*), en los que no encontraron un efecto significativo del ascorbato sobre la fertilización y la supervivencia de los embriones

(Mangor-Jensen and Holm,1994; Terova *et al*; 1998; Lavens *et al*; 1999). Dabrowski & Ciereszko (2001) atribuyen dichos resultados a la corta duración de estos experimentos (de 2 a 3 meses), lo que no permite que haya una reducción suficiente de las reservas de ácido ascórbico en los peces que se alimentan con dietas deficientes de vitamina C. En el caso de este estudio, el experimento tuvo una duración de 6.5 meses, y los resultados obtenidos pudieron deberse más que a una corta duración, a que la diferencia de vitamina C entre la *Artemia* congelada con suplemento y aquella sin el suplemento de esta vitamina, fue solo de $63 \mu\text{g g}^{-1}$ (peso seco), que pudo no ser suficiente para mejorar la fecundidad y las tasas de fertilización.

Pavlidis *et al.* (2004) encontraron que la proporción sexual tiene un efecto en el rendimiento de los desoves en *Dentex dentex*, y que con una relación 1:1 (hembras: machos) había mayor producción de huevos, porcentajes más altos de huevos viables, mayor número de desoves y fecundidades relativas más altas, que con proporciones de $4\text{♀}:1\text{♂}$ y $1\text{♀}:4\text{♂}$. De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, la proporción sexual causó un efecto sobre el porcentaje de huevos viables y las tasas de fertilización de *M. estor*, siendo también la proporción 1:1, la que ofreció mejores resultados. Sin embargo, estos resultados no son conclusivos, debido a que no se sabe si todos los machos aportaron esperma o si todas las hembras ovipositaron, durante los desoves. Así, aunque una proporción igual de hembras y machos ofreciera los mejores resultados, puede llegar a suceder que sólo pocos de los machos sean los padres de los huevos fertilizados y que las tasas de fertilización obtenidas, se deban más a la proporción hembras “sexualmente activas” : machos “sexualmente activos” que a la proporción sexual de cada tanque. En el presente estudio fue imposible determinar si todos los peces se reprodujeron, ni cuántas hembras y cuántos machos de cada tratamiento aportaron huevos y esperma. Por tal razón, no se pueden tener conclusiones precisas acerca de la influencia de la proporción sexual sobre las tasas de fertilización obtenidas en *M. estor*.

Como se mencionó anteriormente, la producción de huevos viables no varió significativamente entre los primeros siete desoves consecutivos (tabla 6), en ambos tratamientos; lo cual significaría que se puede tener una producción continua de huevos sin

que se reduzca su viabilidad, por lo menos durante siete desoves consecutivos, lo cual sería deseable para propósitos de producción de crías de pez blanco. La calidad de los huevos con respecto a los porcentajes de oculación y eclosión tampoco varió significativamente entre los tres primeros desoves consecutivos. Sería necesario evaluar la calidad de huevos con respecto a estos parámetros durante más desoves para poder determinar con cuántos desoves sucesivos se pueden producir huevos sin que se reduzca su calidad.

Se ha encontrado en algunos camarones cultivados con capacidad de desoves múltiples, un deterioro en la calidad de los huevos en desoves sucesivos después de la ablación, debido presumiblemente a que el tiempo disponible entre desoves es insuficiente para la acumulación de nutrientes (Beard and Wickins, 1980). Racotta *et al.* (2003) hacen una revisión de las consecuencias del agotamiento reproductivo por desoves consecutivos en la calidad de huevos y larvas de diferentes especies. Sin embargo, según Marsden *et al.* (1997) esta influencia negativa puede ser contrarrestada con dietas de mejor calidad para los reproductores. Wyban *et al.* (1997) confirman esta aseveración al encontrar que la influencia negativa del tiempo en los desoves consecutivos se contrarresta al suplementar las dietas de reproductores de camarón con páprika (que además de aportar ciertos pigmentos, aporta calcio, vitamina A y vitamina C). Es posible que el suplemento con vitamina C en las dietas de los reproductores de pez blanco, pudiera tener un efecto similar sobre el desempeño reproductivo durante los primeros siete desoves.

Sin embargo, la hipótesis anterior quedaría rebatida, si se tiene en cuenta que se tomó el número de huevos producidos y el porcentaje de huevos viables por tanque y no por hembra. Es posible que no todas las hembras desovaran sincrónicamente y que cada desove no correspondiera a huevos producidos por todas (o la mayoría de) las hembras. Así puede ser que cada desove correspondiera a huevos de diferentes hembras, sin que necesariamente fueran desovadoras consecutivas. Durante el experimento fue imposible determinar si las hembras de pez blanco desovaron sincrónicamente o si los siete desoves evaluados correspondieron a hembras diferentes. Por ello, es necesario realizar más estudios para determinar si las hembras de *M. estor* desovan cosecutivamente o no y poder

afirmar que se puede tener una producción continua sin afectar la calidad de los huevos y las larvas.

En el primer desove se presentó una mejora significativa en el % de huevos oculados y las tasas de eclosión en los huevos producidos por los reproductores que se alimentaron con la *Artemia* enriquecida con vitamina C (N2), con respecto a los reproductores del tratamiento N1 (Tabla 6). Igualmente, en el tercer desove hubo una mayor tasa de eclosión de los huevos de reproductores alimentados con suplemento de vitamina C. Resultados similares se han encontrado en otros peces en los que las tasas de eclosión de los huevos se mejoran significativamente en peces alimentados con dietas con suplemento de vitamina C (Lee and Dabrowski, 2004).

Se ha encontrado que el nivel de ácido ascórbico de la dieta afecta las concentraciones del mismo en las gónadas de variedad de peces como el bacalao (*Gadus morhua*), la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*, antes *Salmo gairdneri*) y otras especies como la tilapia (*Oreochromis mossambicus*), que presenta incrementos significativos del nivel de AAT en los ovarios cuando se suplementa la dieta con vitamina C (Soliman *et al.*, 1986; Waagbo *et al.*, 1989; Mangor-Jensen and Holm, 1994; Bloom and Dabrowski, 1995). En la trucha arco iris las concentraciones de AAT en los testículos también se incrementan en respuesta al incremento de vitamina C en la dieta, al igual que en machos de la perca canadiense (*Perca flavescens*) (Ciereszko and Dabrowski, 1995; Lee and Dabrowski, 2004). Sin embargo, en este estudio el suplemento de ácido ascórbico en la dieta no afectó significativamente las concentraciones de AAT en los ovarios y los testículos de los reproductores de pez blanco, lo que indica que no hubo un consumo óptimo de vitamina C para obtener mejoras significativas en el potencial reproductivo.

Como se observa en la tabla 8, se presentaron diferencias significativas en los contenidos de AAT de las gónadas entre hembras y machos del pez blanco. Resultados similares se han encontrado en otras especies de peces como el lenguado (*Limanda limanda*) (Saborowski *et al.*, 1997); sin embargo, al parecer estas diferencias pueden variar de acuerdo a la capacidad de los peces para sintetizar el ácido ascórbico. Moreau & Dabrowski (1998) no encontraron

diferencias significativas en los niveles de ascorbato entre ovarios y testículos en peces capaces de sintetizar ácido ascórbico. Aún se desconoce si el pez blanco puede sintetizar *de novo* la vitamina C, pero se presume que no puede hacerlo y por lo tanto requiere consumirla en la dieta.

Tampoco se presentaron diferencias significativas en el índice gonadosomático (IGS) entre los reproductores de *M. estor* que consumieron las dos dietas (N1 y N2), resultado que concuerda con el obtenido en trucha arco iris por Ciereszko & Dabrowski (1995). Otros autores reportan valores significativamente más bajos de IGS en peces alimentados con dietas sin vitamina C, comparado con peces alimentados con dietas suplementadas con la vitamina (Lee and dabrowski, 2004). Sería importante observar en estudios posteriores los efectos de una mayor inclusión de vitamina C en las dietas de pez blanco, sobre el índice gonadosomático de hembras y machos.

Los huevos viables obtenidos de reproductores alimentados con *Artemia* enriquecida con vitamina C (N2), tuvieron una concentración promedio de AAT de $15.08 \pm 2.28 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso húmedo. Sandnes *et al.* (1984) propusieron niveles de AAT en los huevos de $20 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso húmedo como límite mínimo para un desarrollo normal de los alevines en trucha arco iris, y sugirieron que el nivel de ácido ascórbico de la dieta debe ser suficiente para que los huevos tengan mínimo esta concentración de vitamina C. De acuerdo a esto, Soliman *et al.* (1986) sugirieron que dietas con 125 mg de ácido ascórbico / 100 g en peso seco, son adecuadas para obtener mayores tasas de eclosión y una mejora en el rendimiento reproductivo de la tilapia (*Oreochromis mossambicus*), al encontrar un contenido de AAT en los huevos de $201.83 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso húmedo. Por otro lado, Blom & Dabrowski reportaron niveles de ácido ascórbico por encima de $200 \mu\text{g g}^{-1}$ en huevos obtenidos de peces alimentados con dietas suplementadas con vitamina C (30 mg de ácido ascórbico / 100 g en peso seco). Teniendo en cuenta lo anterior, en el presente estudio, la dieta suplementada con vitamina C contenía un nivel insuficiente de ascorbato (18.05 mg / 100 g en peso seco) para que los huevos alcanzaran la concentración mínima crítica de $20 \mu\text{g g}^{-1}$ (peso húmedo).

La cantidad de ácido ascórbico total en los huevos colectados de las hembras fue de 11.78% y 10.81% del contenido de AAT en los ovarios para los tratamientos N1 y N2 respectivamente. Soliman *et al.* (1986) encontraron en *Oreochromis mossambicus* que los huevos obtenidos de hembras alimentadas con dietas suplementadas con vitamina C, contenían el 47% del contenido de ascorbato de los ovarios, valor más alto que los encontrados para los dos tratamientos en el presente estudio. Los autores sugirieron que el bajo porcentaje de AAT de los huevos con respecto al de las gónadas, probablemente se debe a limitaciones en la transferencia de ascorbato del ovario a los huevos y al metabolismo del ácido ascórbico. Los bajos porcentajes encontrados en este estudio, además de deberse a esto, podrían deberse a la insuficiente cantidad de ascorbato proporcionada en la dieta.

Al parecer, en algunos peces existe una transferencia activa de ascorbato del saco vitelino al cuerpo de las larvas. En algunos peces Perciformes se ha observado que las concentraciones de ácido ascórbico se incrementan significativamente entre los huevos no fertilizados y las larvas recién eclosionadas, mientras que en otros peces como la trucha arco iris se ha observado que durante el desarrollo embrionario y la alimentación exógena hay una reducción entre el 20 y el 50% en las concentraciones de ascorbato (Knox *et al.*, 1988; Terova *et al.*, 1998). Algunos autores (Dabrowski and Blom, 1994) atribuyen estas discrepancias a que aparentemente haya problemas analíticos en los estudios en que se encontró un incremento de vitamina C entre los huevos y las larvas. A pesar de esto, en el caso de *M. estor* se encontró un incremento significativo en las concentraciones de AAT entre los huevos fertilizados y las larvas de ambos tratamientos (Figura 1); sería necesario realizar un nuevo experimento para observar si estos resultados se repiten y confirmar que efectivamente hay un incremento en los niveles de ascorbato.

Las formas de ascorbil fosfato pueden ser una excelente fuente de ácido ascórbico para los peces (Wilson *et al.*, 1989; Mustin and Lovell, 1992; Dabrowski *et al.*, 1994; Shiau and Hsu, 1995) y se ha comprobado que son formas biológicamente disponibles que se transfieren a las gónadas (Dabrowski and Blom, 1994). Aunque, en el caso del pez blanco, se utilizó una de estas formas de vitamina C, esta no se incluyó en un nivel suficiente en la

dieta, para observar cambios significativos en las concentraciones de AAT en las gónadas y mejorar el desempeño reproductivo. Sería necesario incluirlo en dietas artificiales para obtener concentraciones más altas de vitamina C que permitan determinar el requerimiento de esta vitamina en los reproductores de pez blanco.

De los parámetros de rendimiento reproductivo evaluados en el presente estudio, el suplemento de vitamina C en la dieta únicamente afectó las tasas de eclosión en el primer y tercer desoves y la tasa de oculación del primero. A pesar de que la vitamina C proporcionada en el alimento suplementado (N2), fue suficiente para un crecimiento normal, no fue suficiente para producir mejoras en los parámetros reproductivos evaluados. Con lo anterior, podría pensarse que, dentro de los parámetros evaluados, las tasas de eclosión y oculación son los indicadores reproductivos más sensibles a la deficiencia de vitamina C y que no se presentaron diferencias en los demás, debido al bajo nivel de suplemento.

Referencias

- Akiyama, T; Shiraishi, M; Yamamoto, T. and K. Hirose.** 1990. Variations of administered ascorbic acid levels during maturation and spawning period in sardine. Japanese Society of Fisheries Meeting. Abs. N° 436.
- Beard, T.W. and J.F. Wickins.** 1980. Breeding of *Penaeus monodon* Fabricius in laboratory recirculation systems. *Aquaculture*, 20: 79-89.
- Blom, J.H. and K. Dabrowski.** 1995. Reproductive success of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to graded dietary ascorbyl monophosphate levels. *Biol. Reprod.*, 52: 1073-1080.
- Blom, J.H. and K. Dabrowski.** 1996. Ascorbic acid metabolism in fish: is there a maternal effect on progeny? *Aquaculture*, 147, 215-224.

Browdy, C.L; Hadani, A; Samocha, T.M. and Y. Loya. 1989. An evaluation of frozen *Artemia* as a dietary supplement for the stimulation of reproduction in penaeid shrimp. *In: De Paw, N; Jaspers, E; Ackefors, H. and N. Wilkins (Eds.). Aquaculture / A Biotechnology in Progress.* European Aquaculture Society. Belgium. 671-623 pp.

Ciereszko, A. and K. Dabrowski. 1995. Sperm quality and AA concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. *Biol. Reprod.*, 52: 982-988.

Dabrowski, K. and J.H. Blom. 1994. Ascorbic acid deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs and survival of embryos. *Comp. Biochem. Physiol.* 108A(1): 129-135.

Dabrowski, K; Matusiewicz, M. and J.H. Blom. 1994. Hydrolysis, absorption and bioavailability of ascorbic acid esters in fish.

Dabrowski, K. and A. Ciereszko. 1996. AA protects against male infertility in a teleost fish. *Experientia*, 52: 97-100.

Dabrowski, K. and A. Ciereszko. 2001. Ascorbic acid and reproduction in fish: endocrine regulation and gamete quality. *Aquaculture Research*, 32: 623-638.

Epping, J.J; Hosoe, M; O'Brien, M.J; Pendola, F.M; Requena, A. and S. Watanabe. 2000. Conditions that affect acquisition of developmental competence by mouse oocytes *in vitro*: FSH, insulin, glucose and ascorbic acid. *Mol. Cell. Endocrinol*; 163: 109-116.

Hossein, M.S; Hashem, M.A; Jeong, Y.W; Lee, M.S; Kim, S; Kim, J. H; Koo, O.J; Park, S.M; Lee, E.G; Park, S.W; Kang, S.K; Lee, B.C. and W.S. Hwang. 2007. Temporal effects of α -tocopherol and l-ascorbic acid on *in vitro* fertilized porcine embryo development. *Animal Reproduction Science*, 100 (1-2): 107-117.

Kim, J; Masee, K.C. and R.W. Hardy. 1996. Adult *Artemia* as food for first feeding coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 144: 217-226.

Knox, D; Bromage, N.L.R; Cowey, C.B. and J.R.C. Springate. 1988. The effect of broodstock ration size on the composition of rainbow trout eggs (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 69: 93-104.

Lavens, P; Lebegue E; Jaunet, H; Brunel, A; Dhert, Ph and P. Sorgeloos. 1999. Effect of dietary essential fatty acids and vitamins on egg quality in turbot broodstocks. *Aquaculture International*, 7: 225-240.

Lee, K.J. and K. Dabrowski. 2004. Long-term effects and interactions of dietary vitamins C and E on growth and reproduction of yellow perch, *Perca flavescens*. *Aquaculture*, 230: 377-389.

Lin, J. and P. Shi. 2002. Effects of broodstock diet on reproductive performance of the golden banded coral shrimp, *Stenopus scutellanus*. *J. World Aquaculture Society*, 33(3): 383-286.

Mangor-Jesen, A. and J.C. Holm. 1994. Effects of dietary vitamin C on maturation and egg quality of cod *Gadus morhua* L. *Journal of the World Aquaculture Society*, 25: 30-40.

Marsden, G.E; McGuren, J.J; Hansford, S.W. and M.J. Burke. 1997. A moist artificial diet for prawn broodstock: its effect on the variable reproductive performance of wild caught *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 149: 145-156.

Martínez-Palacios, C.A; Ríos-Durán, M.G; Campos Mendoza, A; Toledo Cuevas, M; Aguilar-Valdez, M.C. and L.G. Ross. 2002. Progresos en el cultivo del pescado blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor estor*. *Ciencia Nicolaita*, 32: 73-90.

Martínez-Palacios, C.A; Racotta, I.S; Ríos-Durán, M.G; Palacios, E; Toledo-Cuevas, M. and L.G. Ross. 2006. Advances in applied research for the culture of Mexican silversides (*Chirostoma*, Atherinopsidae). BIOCELL. 30: (1), 137-148.

Masumoto, T; Hosokawa, H. and S. Shimeno. 1991. Ascorbic acid's role in aquaculture nutrition. *In:* Akiyama, D.M. and R.K.H. Tan (Eds.). Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop. Thailand and Indonesia. 42-48 pp.

Merchie, G; Lavens, P; Dhert, Ph; Dehasque, M; Nelis, H; De Leenheer, A. and P. Sorgeloos. 1995. Variation of ascorbic acid content in different live food organisms. *Aquaculture*, 134: 325-337.

Mohler, J.W; King, K. and P. Farrell. 1998. Comparison of growth and mortality in first-feeding Atlantic sturgeon fry when offered live *Artemia sp*; frozen *Artemia* or a formulated diet. *In:* Annual Report of Biological Activities. U.S. Fish and Wildlife Service. Northeast Fishery Center. Lamar, Pennsylvania. Study Number: LM-98-06.

Moreau, R. and K. Dabrowski. 1998. Fish acquired ascorbic acid synthesis prior to terrestrial vertebrate emergence. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 25: 989-990.

Mustin, W.G. and R.T. Lovell. 1992. Na-L-ascorbyl-2-monophosphate as a source of vitamin C for channel catfish. *Aquaculture*, 105: 95-100.

Naessens, E; Lavens, P; Gomez, L; Browdy, C.L; McGovern-Hopkins, K; Spencer, A.W; Kawahigashi, D. and P. Sorgeloos. 1997. Maturation performance of *Penaeus vannamei* co-fed *Artemia* biomass preparations. *Aquaculture*, 155: 87-101.

Papp, Zs. Gy; Saroglia, M and G. Terova. 1998. An improved method for assay of vitamin C in sample series of fish feed and tissues. *Chromatographia*, 48(1/2): 43-47.

Pavlidis, M; Greenwood, L. and A.P. Scott. 2004. The role of sex ratio on spawning performance and on the free and conjugated sex steroids released into the water by common dentex (*Dentex dentex*) broodstock. *General and Comparative Endocrinology*, 138: 255-262.

Racotta, I.S; Palacios, E. and M. Ibarra. 2003. Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. *Aquaculture*, 227: 107-130.

Ross, L.G; Martínez-Palacios, C.A; Aguilar Valdez, M.C; Beveridge, M.C.M. and M.C. Chavez Sánchez. 2006. Determination of feeding mode in fish: the importance of using structural and functional feeding studies in conjunction with gut analysis in a selective zooplanktivore *Chirostoma estor estor* Jordan 1880. *Journal of Fish Biology*, 68: 1-13.

Saborowski, R; Koprivnjack, J.F; Sisak, M.M; Sahling, G; Buchholz, F; Lum, K.R. and R. Schneider. 1997. Ascorbic acid in the gonads of North Sea dab (*Limanda limanda*) during the reproductive cycle. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 54: 2847-2852.

Sandnes, K; Ulgenes, Y; Braekkan, O.R. and F. Utne. 1984. The effect of ascorbic acid supplementation in broodstock feed on reproduction of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 43: 167-177.

Shiau, S. and T. Hsu. 1995. L-ascorbyl-2-sulphate has equal antiscorbutic activity as L-ascorbyl-2-monophosphate for tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O.aureus*. *Aquaculture*, 133: 147-157.

Shin, D.M; Ahn, J.K; Lee, K.H; Lee, Y.S and Y.S. Lee. 2004. Ascorbic acid responsive genes during neuronal differentiation of embryonic stem cells. *Neuroreport*, 15(12): 1959-1963.

Soliman, A.K; Jauncey, K. and R.J. Roberts. 1986. The effect of dietary ascorbic acid supplementation on hatchability, survival rate and fry performance in *Oreochromis mossambicus*, Peters. *Aquaculture*, 59: 197-208.

Sorgeloos, P; Lavens, P; Léger, Ph; Tackaert, W. and D. Versichele. 1986. Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. State University of Ghent, Faculty of Agriculture. 319 pp.

Sorgeloos, P; Dhert, P. and P. Candreva. 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 200: 147-159.

Takata, R and M.C. Portella. 2007. Use of *Artemia franciscana* nauplii and juveniles on intensive larviculture of surubim *Pseudoplatystoma coruscans*. World Aquaculture Society, *Aquaculture 2007*, WAS Meeting abstract, 227.

Tao, Y; Zhou, B; Xia, G; Wang, F; Wu, Z. and M. Fu. 2004. Exposure to L-Ascorbic acid or α -Tocopherol facilitates the development of porcine denuded oocytes from metaphase I to metaphase II and prevents cumulus cells from fragmentation. *Reprod. Dom. Anim*; 39: 52-57.

Terova, G; Saroglia, M; Papp, Z. and S. Cecchini. 1998. Asorbate dynamics in embryos and larvae of sea bass and sea bream, originated from broodstocks fed supplements of ascorbic acid. *Aquaculture international*, 6: 357-367.

Tilly, J.L. and K.I. Tilly. 1995. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology*, 136: 242-252.

Thusty, M.F; Goldstein, J.S. and D.R. Fiore. 2005. Hatchery performance of early benthic juvenile American lobsters (*Homarus americanus*) fed enriched frozen adult *Artemia* diets. *Aquaculture Nutrition*, 11: 191-198.

Takahashi, K; Lord, B; Schulze, P.C; Fryer, R.M; Sarang, S.S; Gullans, S.R. and R.T. Lee. 2003. Ascorbic Acid Enhances Differentiation of Embryonic Stem Cells Into Cardiac Myocytes. *Circulation*, 107: 1912.

Waagbo, R; Thorsen, T. and K. Sandnes. 1989. Role of dietary ascorbic acid in vitellogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 80: 301-314.

Wilson, R.P; Poe, W. and E. Robinson. 1989. Evaluation of L-ascorbyl-2-polyphosphate (AsPP) as a dietary ascorbic acid source for Channel Catfish. *Aquaculture*, 81: 129-136.

Wyban, J; martínez, G. and J.N. Sweeney. 1997. Adding paprika to *Penaeus vannamei* maturation diet improves nauplii quality. *World Aquaculture*, 28: 59-62.

CAPITULO 3

**EFFECTO DEL USO DE NAUPLIOS DE *Artemia franciscana* ENRIQUECIDOS CON
DIFERENTES NIVELES DE VITAMINA C SOBRE EL CRECIMIENTO Y
SUPERVIVENCIA DE JUVENILES DE PEZ BLANCO DE PÁTZCUARO (*Menidia
estor* Jordan 1880)**

Resumen

Se evaluó el efecto del uso de nauplios de *Artemia franciscana* enriquecidos con vitamina C (L-Ascorbil-2-Polifosfato), en el crecimiento y supervivencia de juveniles de *Menidia estor*. Se llevaron a cabo cinco tratamientos de enriquecimiento: A0: nauplios de *Artemia* sin enriquecer; AP0: enriquecimiento con aceite de hígado de bacalao (AHB); AP15: enriquecimiento con AHB y 15% de vitamina C; AP25: enriquecimiento con AHB y 25% de vitamina C y AP35: enriquecimiento con AHB y 35% de vitamina. Los contenidos de vitamina C promedio de los nauplios enriquecidos fueron 56.29, 71.30, 142.59, 345.82 y 509.45 $\mu\text{g g}^{-1}$ en peso seco, respectivamente. Juveniles de pez blanco de 1.08 ± 0.09 g de peso inicial se alimentaron *ad libitum* tres veces al día, con los nauplios de *Artemia* enriquecidos a los diferentes niveles de vitamina C, durante 90 días, tiempo en el cual se evaluó el crecimiento de los peces, la eficiencia alimenticia y la supervivencia. Igualmente se evaluó el contenido de vitamina C del hígado de los peces. Se observó un claro efecto del nivel de enriquecimiento de los nauplios, sobre el crecimiento y la supervivencia de los juveniles de *M. estor*. Los mejores crecimientos ($p < 0.05$), en cuanto al peso final, peso ganado (%), ganancia de peso individual (mg día^{-1}) y tasa específica de crecimiento (%), se obtuvieron con los tratamientos AP25 (345.82 $\mu\text{g g}^{-1}$) y AP35 (509.45 $\mu\text{g g}^{-1}$). Las más bajas supervivencias se observaron con los tratamientos A0 y AP0; los demás tratamientos no presentaron mortalidad. No hubo un efecto del nivel de enriquecimiento sobre la acumulación de vitamina C en el hígado de los peces. Se concluye que los tratamientos AP25 y AP35 son los mejores, al producir las mejores respuestas de crecimiento, utilización de alimento y supervivencia en los juveniles de pez blanco. Bajo las condiciones del experimento, niveles de vitamina C entre 345.82 y 509.45 $\mu\text{g g}^{-1}$ (base seca) en los nauplios de *Artemia* enriquecidos, serían apropiados para obtener mejor crecimiento y supervivencia en los juveniles de *M. estor*.

Palabras Clave: nauplios de *Artemia franciscana*; enriquecimiento con L-Ascorbil-2-Polifosfato (AsPP); juveniles de *Menidia estor*; crecimiento; supervivencia.

Introducción

El pez blanco de Pátzcuaro, *Menidia estor*, es un pez de agua dulce que aparentemente conserva características de sus antecesores marinos, tales como la eurihalinidad, un destete tardío y sus preferencias zooplanctófagas (Martínez-Palacios *et al*; 2006). Es por esto que en el cultivo de esta especie se utiliza alimento vivo (*Brachionus plicatilis* y *Artemia franciscana*) para las primeras etapas de desarrollo e incluso para los juveniles y adultos. Debido a que aún no se cuenta con una formulación artificial que sustituya completamente la *Artemia*, aún se depende del uso de este alimento vivo en el cultivo de esta especie.

Aunque ya se conocen los requerimientos de proteína del pez blanco (Martínez-Palacios *et al*; *in press*), los requerimientos de otros nutrientes para los juveniles de esta especie aún no están suficientemente documentados. Durante el desarrollo de las técnicas de cultivo del pez blanco, se han observado diferentes signos patológicos tales como lordosis, escoliosis, hemorragias y exoftalmia entre otros, los cuales pueden ser indicios de deficiencias nutricionales, específicamente de algunas vitaminas como el ácido ascórbico y otros micronutrientes.

El ácido ascórbico es generalmente considerado como un componente esencial de la dieta para los organismos en las diferentes etapas de cultivo (Merchie *et al*; 1997). Debido a que la mayoría de peces no pueden sintetizar la vitamina C, son dependientes de un suministro constante de cantidades adecuadas de esta vitamina a través de la dieta. El pez blanco parece no ser la excepción, por lo que es importante determinar los requerimientos de ácido ascórbico para un óptimo rendimiento de los peces en cultivo.

El valor nutritivo de la *Artemia* puede cambiar entre poblaciones geográficas, entre especies y entre desoves de diferentes años. Por ejemplo, estos factores pueden influenciar significativamente las concentraciones de vitamina C en los quistes y en los nauplios recién eclosionados, y por consiguiente su valor nutricional para los peces (Sorgeloos *et al*; 2001).

Debido a que los nauplios de *Artemia* son consumidores no selectivos de partículas, es posible manipular su valor nutritivo, con la incorporación de diferentes clases de productos, mediante métodos simples como la bioencapsulación o enriquecimiento. El enriquecimiento de *Artemia* es ampliamente utilizado en la producción de peces marinos y crustáceos para incrementar su valor nutritivo. Se ha tenido un progreso considerable en el incremento del valor nutritivo de la *Artemia* para su uso como alimento, mediante el desarrollo de procedimientos de enriquecimiento con ácidos grasos esenciales (Léger *et al.*; 1987) y más recientemente con otros componentes específicos como vitaminas y pigmentos, con el fin de suplir los requerimientos nutricionales de los peces y crustáceos cultivados. Por ejemplo, se ha demostrado que se pueden incorporar niveles altos de vitamina C en el alimento vivo mediante estas técnicas de bioencapsulación (Merchie *et al.*; 1995 a).

Para incorporar vitamina C extra en los nauplios de *Artemia* en una forma estable y biodisponible mayormente se utiliza ascorbil palmitato, fuente estable de ácido ascórbico de carácter lipofílico, el cual es incorporado mediante técnicas de bioencapsulación utilizadas para el enriquecimiento con ácidos grasos (HUFA). Recientemente se ha empezado a utilizar ascorbil-2-fosfato, forma particulada de ácido ascórbico prácticamente insoluble en agua (Smith *et al.*, 2004 a) para enriquecer la *Artemia*. Smith *et al.* (2004 b) demostraron que los niveles endógenos de ácido ascórbico en nauplios y juveniles de *Artemia* se pueden incrementar efectivamente utilizando técnicas de bioencapsulación con esta forma particulada de vitamina C, la cual puede ser útil para la suplementación de ácido ascórbico en el cultivo de peces marinos y crustáceos, especialmente aquellos que requieren presas de mayor tamaño.

Numerosos estudios han demostrado el efecto positivo del alimento vivo enriquecido sobre el crecimiento y la supervivencia de varias especies de peces cultivadas (Tuncer and Harrell, 1992; Mourente *et al.*, 1993; Ozkizilcik and Chu, 1994; Merchie *et al.*, 1997; Gapasin *et al.*, 1998). Se ha encontrado en algunas especies de peces y crustáceos que la incorporación de ácido ascórbico en el alimento vivo tiene un efecto pronunciado en el

crecimiento y la resistencia al estrés, además de estar correlacionada con niveles altos de esta vitamina en los tejidos (Merchie *et al.*, 1995 a, b).

Para evaluar las necesidades dietéticas de ácido ascórbico en los juveniles de *M. estor* se utilizaron nauplios de *Artemia franciscana* enriquecidos con ácidos grasos y vitamina C estabilizada (L-Ascorbil-2-Polifosfato (AsPP), Rovimix® Stay-C® 35). Para ello se evaluó el efecto de la alimentación con los nauplios con cinco niveles de enriquecimiento en el crecimiento y supervivencia de los juveniles.

Metodología

Peces experimentales

Se obtuvieron juveniles de pez blanco *M. estor* a partir de huevos en el Laboratorio de Nutrición y Acuicultura del Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo), Morelia, Michoacán, México. Después de la eclosión, las crías fueron mantenidas con rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y nauplios de *Artemia franciscana* durante los primeros 30 días, al cabo de los cuales fueron destetadas y mantenidas con una dieta estándar (40% proteína, 10% lípidos) y *Artemia* hasta 15 días antes del experimento. Durante los 15 días previos al experimento, los peces fueron aclimatados al sistema experimental y se alimentaron únicamente con nauplios de *Artemia franciscana*.

Protocolo experimental

Se realizó un experimento que constó de 5 tratamientos con tres repeticiones cada uno, teniendo un total de 15 unidades experimentales:

Tratamiento 1: Alimentación con nauplios de *Artemia franciscana* sin enriquecer (A0)

Tratamiento 2: Alimentación con nauplios de *Artemia* enriquecidos con aceite de hígado de bacalao (AP0)

Tratamiento 3: Alimentación con nauplios de *Artemia* enriquecidos con aceite de hígado de bacalao y 15% de vitamina C* (AP15)

Tratamiento 4: Alimentación con nauplios de *Artemia* enriquecidos con aceite de hígado de bacalao y 25% de vitamina C* (AP25)

Tratamiento 5: Alimentación con nauplios de *Artemia* enriquecidos con aceite de hígado de bacalao y 35% de vitamina C* (AP35)

* Porcentaje de inclusión de vitamina C en la emulsión.

El experimento se llevó a cabo en un sistema cerrado de recirculación consistente en 15 tanques de fibra de vidrio de 50 litros de capacidad (cada uno con aireación constante y un flujo continuo de agua de 1L / min.) un sedimentador y un filtro biológico. La temperatura del agua se mantuvo a $25.0 \pm 0.58^\circ \text{C}$ y la salinidad a $5.5 \pm 0.90 \text{ g L}^{-1}$, con un fotoperíodo de 12L: 12O. Los valores promedio de oxígeno disuelto, pH, nitritos y amonio fueron $6.1 \pm 0.27 \text{ mg L}^{-1}$, 8.1 ± 0.14 , $0.03 \pm 0.01 \text{ mg L}^{-1}$ y 0.0 mg L^{-1} , respectivamente.

Juveniles de pez blanco de $1.08 \pm 0.09\text{g}$ de peso promedio fueron sembrados al azar en los 15 tanques (10 peces por tanque; cada tanque correspondió a una unidad experimental) y se alimentaron *ad libitum* tres veces al día con los nauplios de *Artemia* enriquecidos a los diferentes niveles de vitamina C, durante 90 días. Cada mes los animales fueron pesados mediante el uso de anestesia con benzocaína a una concentración de 24 mg/L. Diariamente se anotó la supervivencia en cada uno de los tanques. Al final del experimento, un grupo de peces se sacrificó para evaluar el contenido de vitamina C del hígado, para lo cual se congelaron a -80°C hasta el momento de su análisis. Además de evaluar la supervivencia en cada tratamiento, con los datos de peso y alimento consumido, se evaluó el crecimiento de los peces y la eficiencia alimenticia.

Enriquecimiento de los nauplios de Artemia franciscana

Los nauplios de *Artemia* se enriquecieron con emulsiones (aceite/agua) de aceite de hígado de bacalao y vitamina C (L-Ascorbil-2-Polifosfato (AsPP), Rovimix® Stay-C® 35)^I en diferentes proporciones, para las cuales se utilizó lecitina de soya líquida como agente tensoactivo. (Los nauplios para el tratamiento A0 no fueron enriquecidos). Las emulsiones se prepararon de la siguiente manera:

Se pesaron el aceite de hígado de bacalao, la lecitina de soya y la vitamina C^{II} (tabla 1) (para la emulsión del tratamiento AP0 no se utilizó vitamina C). Para el tratamiento AP0, se dispersó la lecitina de soya en el aceite y para los demás tratamientos (AP15, AP25 y AP35), se dispersaron la lecitina y la vitamina C en el aceite. En cada caso, una vez obtenida la dispersión, se empezó a añadir gota a gota a un litro de agua, mientras se homogenizaba a baja velocidad en un homogenizador Power Gen® Fisher Scientific®. Durante el proceso de homogenización se utilizó un recipiente con hielo alrededor del contenedor de la emulsión para evitar el calentamiento de la misma y mantener una temperatura menor a 30° C, evitando así la separación de las fases (aceite/ agua). Una vez que se terminó de incorporar la dispersión, se homogenizó la mezcla a máxima velocidad durante un minuto. Las emulsiones así obtenidas, estaban listas para el proceso de enriquecimiento.

Se utilizaron quistes de *Artemia Franciscana* Salt Creek®, los cuales, después de un proceso de decapsulación^{III} fueron incubados por 24 horas en agua^{IV} a una salinidad de 35 y

^I Para garantizar un tamaño de partícula adecuado para los nauplios de *Artemia*, antes de preparar las emulsiones el L-Ascorbil-2-Polifosfato fue pasado por un molino (cyclotec®, Foss tecator® 1093) para obtener partículas menores a 20µm.

^{II} La vitamina C utilizada contenía el 35% de ingrediente activo, factor que se tuvo en cuenta a la hora de pesarla para la preparación de las emulsiones. Así 0.26g (tabla 1) contienen 0.09g de ingrediente activo, valor que corresponde al 15% del peso del aceite de pescado + la lecitina de soya; 0.43g contienen 0.15g de ingrediente activo, correspondiendo al 25% y 0.6g contienen 0.21g de ingrediente activo, que corresponde al 35%.

^{III} El proceso de decapsulación de los quistes se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Dhont *et al.* (1993).

^{IV} 0.8 g de quistes de *Artemia franciscana* por litro de agua.

una temperatura de 28° C, con iluminación constante, hasta su eclosión. Una vez eclosionados, se mantuvieron los nauplios en agua limpia a la misma salinidad y una temperatura de 25° C durante 24 horas más, para esperar a que los nauplios pasaran al segundo estado larvario y garantizar que se alimentaran a la hora de enriquecerlos. Al cabo de este tiempo se enriquecieron los nauplios en 24 horas. Para cada tratamiento la emulsión fue adicionada en dos dosis: una al inicio del enriquecimiento y la segunda a las 12 horas (Dhont *et al.*, 1993; Merchie *et al.*, 1995); se mantuvo aireación constante para mantener los niveles de oxígeno disuelto por encima de 4 mg L⁻¹ y una temperatura controlada de 25° C.

Tabla 1. Composición de las emulsiones preparadas para los tratamientos de enriquecimiento. Los datos se expresan en g para cada Litro de medio de enriquecimiento.

Ingrediente	AP0	AP15	AP25	AP35
Aceite de pescado ¹	0.4	0.4	0.4	0.4
Lecitina de soya	0.2	0.2	0.2	0.2
Vitamina C ²	0	0.26	0.43	0.6

¹ Aceite de hígado de Bacalao

² Vitamina C estabilizada: L-Ascorbil-2-Polifosfato (AsPP), Rovimix® Stay-C® 35 (DSM Nutritional Products)

El sistema en el que se enriquecieron las *Artemias* consistió en 12 cubetas plásticas de 5L de capacidad, con aireación constante (3 cubetas por nivel de enriquecimiento), en un sistema de baño María para mantener la misma temperatura (≈25° C) en todos los tratamientos. Después de las 24 horas de enriquecimiento, se colectaron los nauplios, se lavaron y se mantuvieron en agua salina limpia a 4° C con aireación leve^V, entre las tres dosis de alimentación de los peces. Este procedimiento se llevó a cabo diariamente. En la tabla 2 se muestran las concentraciones promedio obtenidas de vitamina C en los nauplios

^V Los nauplios se almacenan vivos a dicha temperatura con aireación leve para evitar que se precipiten al fondo y sufran sofocación. Según Merchie *et al.*(1995) los nauplios enriquecidos mantienen su valor nutricional con respecto a la vitamina C si se almacenan a 4° C durante máximo 24 horas. De la misma manera a temperaturas menores a 10° C se asegura que los ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs) no sean metabolizados durante el almacenamiento (Dhont *et al.*, 1993).

enriquecidos con los diferentes tratamientos, los cuales se proporcionaron a los peces durante el experimento.

Tabla 2. Concentración de vitamina C (ácido ascórbico total) ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco) obtenida en los nauplios enriquecidos con los diferentes tratamientos (Los datos se expresan en valores promedio \pm S.E. Valores con el mismo superíndice no presentan diferencias significativas).

Tratamiento	Contenido de vitamina C ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco)
A0	56.29 ± 7.74^a
AP0	71.30 ± 4.19^a
AP15	142.59 ± 18.19^b
AP25	345.82 ± 4.49^c
AP35	509.45 ± 29.73^d

Parámetros de crecimiento

Con los datos de peso y alimento consumido, se evaluó el crecimiento y eficiencia alimenticia de los peces alimentados con las diferentes dietas. Se calcularon el peso ganado (PG), la ganancia de peso individual (GPI), la tasa específica de crecimiento (TEC), el alimento consumido individual (ACI) y la tasa de conversión alimenticia (TCA), utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{PG (\%)} = 100 * (\text{Peso final} - \text{Peso inicial}) / \text{Peso inicial}$$

$$\text{GPI (mg día}^{-1}\text{)} = \text{Peso Ganado individual (mg)} / \text{tiempo (días)}$$

$$\text{TEC (\% día}^{-1}\text{)} = 100 * [\text{Ln(Peso final)} - \text{Ln(Peso inicial)}] / \text{Tiempo (días)}$$

$$\text{ACI (mg día}^{-1}\text{)} = [\sum (\text{alimento consumido (mg)} / \text{número de individuos})_{t_1, t_2, \dots, t_n}] /$$

$$\text{Tiempo (días)}$$

$$\text{TCA} = \text{ACI} / \text{GPI}$$

Métodos analíticos

Análisis de vitamina C

Los peces congelados fueron disectados en frío para extraer los hígados, utilizando como base una lámina de acero inoxidable sobre hielo. Los tejidos hepáticos extraídos se pesaron y se analizó su contenido de vitamina C. Se determinó el ácido L-ascórbico de los nauplios enriquecidos y de los hígados de los peces por cromatografía de líquidos de alta resolución. Tanto nauplios como tejidos, se homogenizaron en un buffer de acetato de sodio frío (pH 4.8). Los extractos se dividieron en dos partes: la primera para la detección de la línea base, tratándola con enzima ascorbato-oxidasa durante 30 minutos; la segunda para la detección de ácido L-ascórbico, añadiendo 1,4-Ditioeritritol. Previo al análisis en el cromatógrafo los extractos se deproteinizaron con ácido perclórico al 10% y se centrifugaron a 12000 G, a una Temperatura de 2° C durante 10 minutos (Papp *et al.*, 1998). Los sobrenadantes se filtraron (utilizando filtros de membrana de 0.45 µm) y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos (isocratic single column system, Agilent 1100 series). Se utilizó un buffer (fase móvil o eluente) de acetato de sodio 0.04M (con EDTA 0.05 mM y fosfato de tetrabutilamonio 0.5mM, pH 3.76), a una temperatura de 23° C, con un flujo de 0.5 mL/min y una presión de 65 Bar. Se utilizó una columna Lichrosorb RP-18 (4.6 x 200mm, Agilent) y la lectura de picos se realizó en el espectro UV visible a una longitud de onda de 254 nm. Para todos los análisis se utilizaron reactivos ultrapuros de J.T. Baker (EUA), Fluka (Suiza), SIGMA (Alemania) y Aldrich (EUA), y para la filtración de buffers y homogenados se utilizaron filtros de membrana Durapore (Millipore) de 0.45 µm.

Análisis de datos

Con los datos de peso de peces e hígados se determinó el índice hepatosomático (IHS) de los peces de cada tratamiento, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IHS (\%)} = [\text{peso del hepatopáncreas (g)} / \text{peso del pez (g)}] * 100$$

Tanto los resultados obtenidos del contenido de vitamina C de los nauplios de *Artemia* y de los hígados de los peces, como los de parámetros de crecimiento, se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) a una vía y para comparar las medias entre los tratamientos se llevaron a cabo pruebas *post-hoc* de Tukey ($\alpha = 0.05$). Los datos de supervivencia se sometieron a un análisis de Kruskal-Wallis, debido a que no cumplían los supuestos de normalidad. Para cada uno de los tratamientos se aplicó un modelo de regresión logarítmica ($y = a \ln(x) + y_0$) con los datos de peso promedio contra tiempo y se compararon las pendientes obtenidas, mediante un ANOVA de una vía utilizando igualmente una prueba *post-hoc* de Tukey ($\alpha = 0.05$). Todos los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico MINITAB (versión 13.32) (MINITAB INC).

Resultados

El nivel de enriquecimiento de los nauplios de *Artemia* franciscana, tuvo un claro efecto sobre el crecimiento de los juveniles de *M. estor* (Figura 1). En la tabla 3 se muestran los parámetros de crecimiento y utilización del alimento de los juveniles de pez blanco sometidos a los diferentes tratamientos. Los mejores crecimientos, en cuanto al peso final (mg), peso ganado (%) y ganancia de peso individual (mg día^{-1}), se obtuvieron en los tratamientos AP35 y AP25, mientras que la mejor tasa de conversión alimenticia se presentó en los peces del tratamiento AP35. Como se observa en la figura 2, se presentaron diferencias significativas de supervivencia entre los peces alimentados con *Artemia* sin adición de vitamina C y los alimentados con *Artemia* adicionada con esta vitamina ($p < 0.05$). Por otro lado, hubo incidencia de algunos signos de deficiencia de vitamina C, aunque esta no fue significativa ($p > 0.05$). En el tratamiento A0 se presentaron signos como cataratas (1 individuo), exoftalmia (1 individuo) y hemorragias (2 individuos), después del día 19 de experimentación. En el tratamiento AP0 después del día 43 se observaron casos de exoftalmia (3 individuos) y lordosis (2 individuos), mientras que en el tratamiento AP15 sólo se observó un caso de cataratas después del día 31. En ninguno de los demás tratamientos se presentaron signos patológicos de deficiencia de vitamina C.

No hubo un efecto del nivel de enriquecimiento de los nauplios de *Artemia* sobre la acumulación de vitamina C en el hígado de los peces. Al analizar el contenido de vitamina C, como ácido ascórbico total (AAT), de este órgano en los peces muestreados no se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes tratamientos (figura 3).

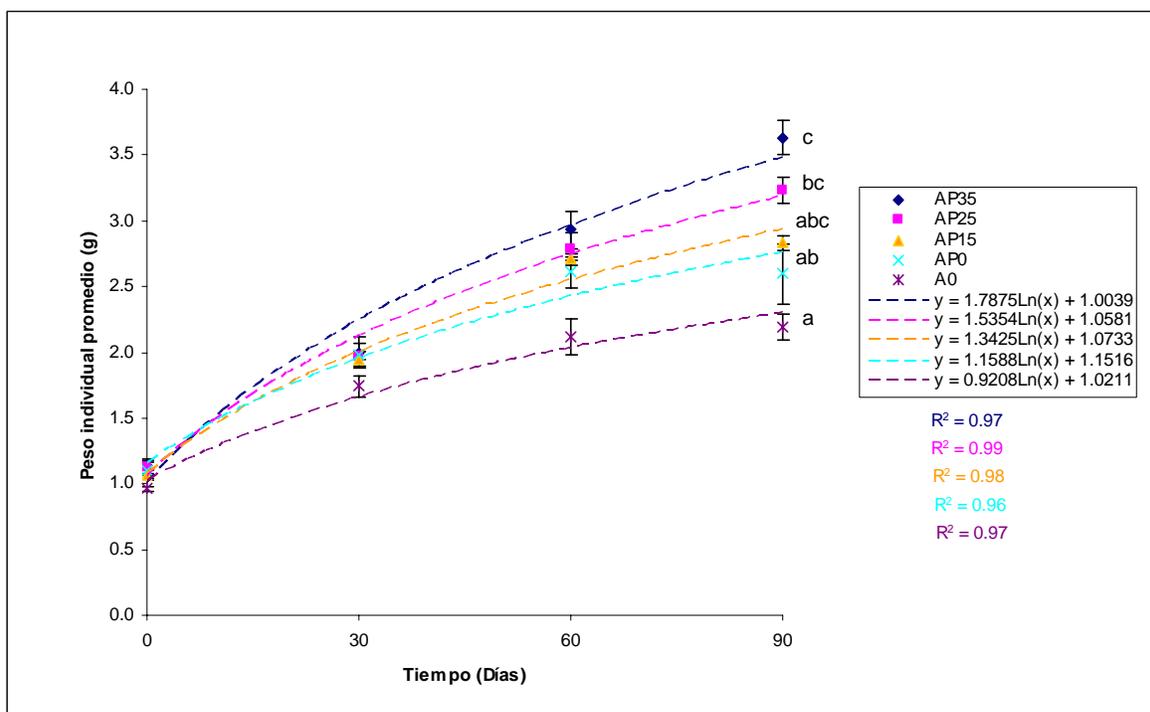


Figura 1. Crecimiento (Valores promedio de tres repeticiones \pm S.E.) de los juveniles de pez blanco a lo largo del experimento (A0: *Artemia* sin enriquecer; AP0: *Artemia* enriquecida con aceite de pescado (AP); AP15: *Artemia* enriquecida con AP y 15% de vitamina C; AP25: *Artemia* enriquecida con AP y 25% de vitamina C; AP35: *Artemia* enriquecida con AP y 35% de vitamina C). Indices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las pendientes de las curvas de regresión, representadas por líneas punteadas.

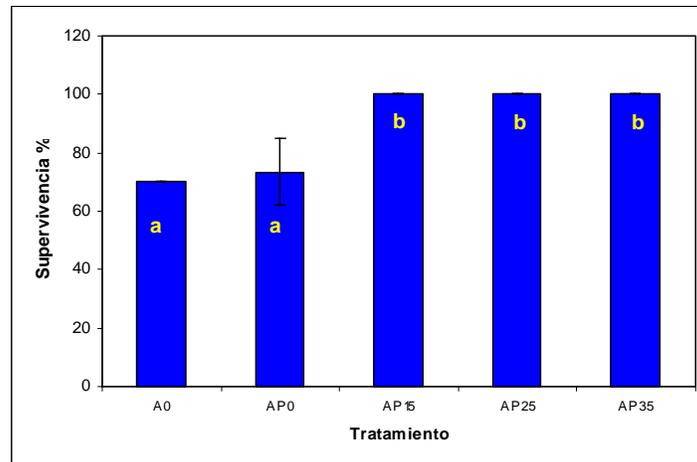


Figura 2. Supervivencia (Valores promedio de tres repeticiones \pm S.E.) de los juveniles de pez blanco alimentados con nauplios de *Artemia* a diferentes niveles de enriquecimiento. (A0: *Artemia* sin enriquecer, AP0: *Artemia* enriquecida con aceite de pescado, AP15: *Artemia* enriquecida con aceite de pescado y 15% de vitamina C, AP25: *Artemia* enriquecida con aceite de pescado y 25% de vitamina C, AP35: *Artemia* enriquecida con aceite de pescado y 35% de vitamina C). Indices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

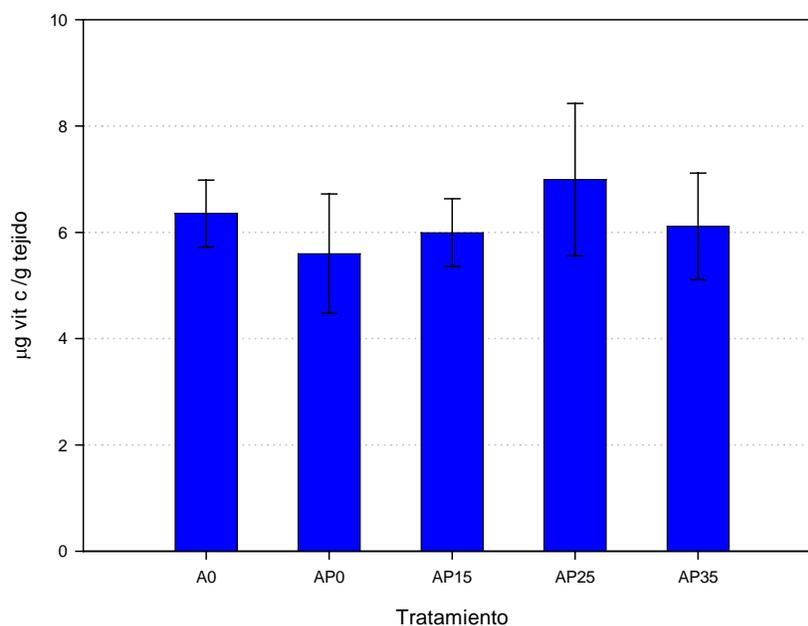


Figura 3. Concentración de ácido ascórbico total (AAT) ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (valores promedio \pm S.E., $n \geq 8$) en el hígado de los peces alimentados con los nauplios de *Artemia* con diferentes niveles de enriquecimiento. No se presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$).

Tabla 3. Parámetros de crecimiento y eficiencia alimenticia (valores promedio de tres grupos \pm S.E.) de los juveniles de pez blanco sometidos a los diferentes tratamientos. Valores con el mismo superíndice no presentan diferencias significativas entre tratamientos.

TRATAMIENTO	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Peso ganado (mg)	Peso ganado (%)	GPI (mg/día)	ACI (mg /día)	TCA	TEC (%/día)
A0	963.33 \pm 18.56 ^a	2190.48 \pm 97.71 ^a	1227.14 \pm 59.59 ^a	127.17 \pm 5.81 ^a	13.63 \pm 0.88 ^a	20.39 \pm 0.0 ^a	1.51 \pm 0.09 ^a	0.91 \pm 0.03 ^a
AP0	1100.00 \pm 63.50 ^a	2594.44 \pm 229.61 ^{ab}	1494.44 \pm 283.61 ^{ab}	139.34 \pm 31.92 ^a	16.60 \pm 3.15 ^{ab}	20.39 \pm 0.0 ^a	1.35 \pm 0.31 ^{ab}	0.95 \pm 0.16 ^a
AP15	1066.67 \pm 32.83 ^a	2833.05 \pm 53.43 ^b	1766.36 \pm 46.62 ^{ab}	165.94 \pm 7.26 ^a	19.63 \pm 0.52 ^{ab}	20.39 \pm 0.0 ^a	1.04 \pm 0.03 ^{ab}	1.09 \pm 0.03 ^a
AP25	1123.33 \pm 56.96 ^a	3226.67 \pm 99.05 ^{bc}	2103.33 \pm 102.03 ^{bc}	188.59 \pm 15.75 ^{ab}	23.37 \pm 1.13 ^{bc}	20.39 \pm 0.0 ^a	0.88 \pm 0.04 ^{bc}	1.17 \pm 0.06 ^{ab}
AP35	1133.33 \pm 54.57 ^a	3633.33 \pm 132.83 ^c	2500.00 \pm 83.27 ^c	220.98 \pm 5.66 ^b	27.78 \pm 0.92 ^c	20.39 \pm 0.0 ^a	0.74 \pm 0.02 ^c	1.29 \pm 0.02 ^b

GPI: Ganancia de peso individual

ACI: Alimento consumido individual en base seca

TCA: Tasa de conversión alimenticia

TEC: Tasa específica de crecimiento

Discusión

Los niveles promedio de ácido ascórbico obtenidos en los nauplios de *Artemia* enriquecidos (entre 142.6 y 509.4 $\mu\text{g g}^{-1}$, peso seco) difieren notablemente de aquellos obtenidos por otros autores que utilizaron la misma forma de ácido ascórbico particulada (Ascorbil-2-polifosfato: A2P), bajo condiciones similares de enriquecimiento. Por ejemplo, Smith *et al.* (2004) al enriquecer nauplios de dos días de edad durante 24 horas a 28 °C, obtuvieron niveles de ácido ascórbico de 11080 $\mu\text{g g}^{-1}$ en peso seco. Sin embargo, cabe anotar que los niveles originales de la vitamina en los nauplios no enriquecidos utilizados por los autores, fueron notablemente más altos (485 $\mu\text{g g}^{-1}$) que los niveles originales de los nauplios en el presente experimento (entre 56.3 y 71.3 $\mu\text{g g}^{-1}$). Esto refleja la gran variabilidad del valor nutricional que puede tener la *Artemia* entre un lugar y otro.

El suplemento de vitamina C tuvo un claro efecto dosis-dependiente sobre el crecimiento de los juveniles de *M. estor* (Figura 1; tabla 3). Estos resultados concuerdan con los de otros autores como Gapasin *et al.* (1998), quienes al proporcionar alimento vivo enriquecido con ácidos grasos (HUFA) y vitamina C obtuvieron mayores crecimientos que al proporcionar alimento sin enriquecer, en crías del sabalote *Chanos chanos*. De la misma manera, Merchie *et al.* (1995a) observaron efectos significativamente positivos de la incorporación de altos niveles de ácido ascórbico en el alimento vivo sobre el crecimiento de larvas del bagre africano *Clarias gariepinus*. Otros autores no han encontrado el mismo efecto sobre el crecimiento de otras especies de peces, debido a que los requerimientos de vitamina C para un crecimiento óptimo son más bajos que los contenidos originales de los nauplios de artemia utilizados (Merchie *et al.* 1995 b; Merchie *et al.*, 1996; Merchie *et al.*, 1997).

Los juveniles de *M. estor* que recibieron suplemento de vitamina C presentaron supervivencias significativamente mayores que aquellos que no lo recibieron. Se ha reportado para crías de peces como el bagre africano, la perca europea (*Dicentrarchus labrax*) y el rodaballo (*Scophthalmus maximus*), que la supervivencia no se vio influenciada

por el nivel de ácido ascórbico en la dieta debido a que los niveles de vitamina C del alimento vivo no enriquecido superaba los requerimientos de los peces (Merchie *et al* 1995 b; Merchie *et al.*, 1996).

Como se observa en la figura 2 y en la tabla 3, no se presentaron diferencias significativas en la supervivencia y las respuestas de crecimiento y eficiencia alimenticia de los peces alimentados con nauplios sin enriquecer y aquellos que recibieron nauplios enriquecidos con el aceite de pescado, el cual contiene ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) y altamente poli-insaturados (HUFA). Es posible que la vitamina C por sí sola hubiera mejorado la supervivencia y el rendimiento en crecimiento de los juveniles de pez blanco, pero no puede desecharse un efecto sinérgico de esta vitamina y los ácidos grasos del aceite utilizado. Se requiere llevar a cabo otros estudios para poder determinar si existe tal efecto del ácido ascórbico junto con los ácidos grasos sobre el rendimiento del pez blanco.

Como se mencionó anteriormente, los peces sometidos a los tratamientos con más bajos niveles de vitamina C, es decir, los que recibieron *Artemia* sin suplemento de esta vitamina, presentaron signos patológicos de deficiencia, pero los casos fueron pocos para obtener diferencias significativas. Estos peces, tuvieron un menor crecimiento que los que recibieron alimento vivo enriquecido, lo cual indica que los niveles de ácido ascórbico de los nauplios de *Artemia* sin enriquecer no ocasionaron una presencia significativa de signos patológicos y pudieron ser suficientes para suplir las necesidades básicas de los peces, pero no para obtener crecimientos y supervivencia óptimos.

La incorporación de ácido ascórbico (AA) en el alimento vivo está correlacionada con altos niveles de la vitamina en los tejidos de los peces. El contenido de AA en los tejidos del depredador se incrementa con el nivel de vitamina C del alimento vivo hasta el punto en que hay una saturación en las reservas de AA en los mismos (Merchie *et al*; 1995b). Dabrowski (1990) sugiere que los niveles óptimos de vitamina C en la dieta son aquellos que permiten el mantenimiento de una concentración constante de AA en los tejidos de los peces. En el presente estudio las concentraciones de AA en el hígado de los peces no se incrementaron con el nivel de vitamina C de la *Artemia* y no se puede decir que las

concentraciones llegaron a un nivel de saturación; los resultados obtenidos pudieron deberse a que los niveles de vitamina C suministrados en el alimento vivo, no fueron suficientes para causar diferencias significativas en las concentraciones de AA del hígado entre los peces de los diferentes tratamientos.

Hilton *et al.* (1978) encontraron que la trucha arco iris mantiene relativamente constantes los niveles de AA hepáticos al alimentarla con dietas suplementadas con 80 a 320 mg AA Kg⁻¹, pero cuando se alimenta con niveles de AA de 1280 mg AA Kg⁻¹ (12 veces el requerimiento para un crecimiento normal), la vitamina C del hígado se incrementa más del doble. Los niveles de vitamina C proporcionados a los juveniles de pez blanco a través de la *Artemia* en el presente estudio estuvieron entre 56 y 510 mg Kg⁻¹, y los niveles de AA del hígado se mantuvieron constantes. Sería necesario proporcionar alimento con mayor inclusión de vitamina C para observar si ocurre un efecto parecido al observado en la trucha.

Los niveles de AA del hígado de los juveniles de pez blanco en este estudio no sobrepasaron los 10 µg g⁻¹ en peso húmedo, concentraciones que se puede pensar, no alcanzan los niveles de saturación. Estas concentraciones son más bajas que las encontradas en el hígado de los adultos silvestres de pez blanco (capítulo 1), entre 25 y 46 µg g⁻¹ (peso húmedo), las cuales indican un buen estatus de la vitamina C en los peces. Para otras especies como la trucha arco iris se han reportado niveles de saturación de AA en el hígado de 109 µg g⁻¹ (Blom and Dabrowski, 1995), los cuales son mucho mayores que los encontrados en los juveniles de pez blanco sometidos a los diferentes tratamientos.

Merchie *et al.* (1997) concluyeron que en general los niveles de ácido ascórbico en los nauplios de *Artemia* son suficientes para obtener un crecimiento y supervivencia normales de la mayoría de larvas de peces y crustáceos; cosa que no se puede afirmar en el presente estudio, debido a que los nauplios utilizados^{VI} contenían niveles mucho más bajos que los encontrados por los autores. En este caso, los nauplios de *Artemia* enriquecidos con aceite

^{VI} Los nauplios utilizados se obtuvieron a partir de quistes de *Artemia* marca Salt Creek, provenientes del Lago Salado, Utha, U.S.A.

de hígado de bacalao y vitamina C resultaron ser una dieta apropiada para el crecimiento y supervivencia de los juveniles de pez blanco, mientras que la *Artemia* sin enriquecer no suplió completamente los requerimientos nutricionales de estos peces. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, los niveles de vitamina C de la *Artemia* no enriquecida fueron suficientes para no causar signos patológicos de deficiencia de manera significativa.

No fue posible determinar los requerimientos de vitamina C para los juveniles de pez blanco mediante el presente estudio, debido a que no se alcanzaron niveles mayores de ácido ascórbico en los nauplios de *Artemia*, que permitieran obtener una meseta en las respuestas de crecimiento. Sin embargo, el trabajo atestigua la importancia de la vitamina C en el crecimiento, desarrollo y supervivencia del pez blanco. Bajo las condiciones del experimento, niveles de vitamina C entre 345.82 y 509.45 $\mu\text{g g}^{-1}$ (base seca) en los nauplios de *Artemia* enriquecidos, serían apropiados para obtener mejor crecimiento y supervivencia en los juveniles de *M. estor*.

Referencias

- Blom, J.H. and K. Dabrowski.** 1995. Reproductive success of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to graded dietary ascorbyl monophosphate levels. *Biol. Reprod.*, 52: 1073-1080.
- Dabrowski, K.** 1990. Ascorbic acid status in the early life of whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). *Aquaculture*, 84: 61-70.
- Dhont, J; Lavens, P. and P. Sorgeloos.** 1993. Preparation and use of *Artemia* as food for shrimp and prawn larvae. *In: McVey, J. P. (Ed.). CRC Handbook of Mariculture. 2nd Edition, vol.1. Crustacean Aquaculture. 61-93pp.*
- Gapasin, R.S.J; Bombeo, R; Lavens, P; Sorgeloos, P. and H. Nelis.** 1998. Enrichment of live food with essential fatty acids and vitamin C: effects on milkfish (*Chanos chanos*) larval performance. *Aquaculture*, 162: 269-286.

Hilton, J.W; Cho, C. and S.J. Slinger. 1978. Effect of graded level of supplemental ascorbic acid in practical diets fed to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish. Res. Bd. Can., 35: 431.

Léger, Ph; Naessens-Foucquaert, E. and P. Sorgeloos. 1987. International study on *Artemia*. XXXV. Techniques to manipulate the fatty acid profile in *Artemia* nauplii and the effect on its nutritional effectiveness for the marine crustacean *Mysidopsis bahia* (M.). In: Sorgeloos, P; Bengston, D.A; Declair, W. and E. Jaspers (Eds.). *Artemia* research and its applications. Vol. 3. Universa Press, Belgium. 411-424 pp.

Martínez Palacios, C.A; Racotta, I.S; Ríos-Durán, M.G; Palacios, E; Toledo-Cuevas, M. and L.G. Ross. 2006. Advances in applied research for the culture of Mexican silversides (*Chirostoma*, Atherinopsidae). Biocell, 30(1): 137-148.

Martínez-Palacios, C. A; Ríos-Durán, M.G; Ambriz-Cervantes, L; Ross, L.G. and K.J. Jauncey. Dietary protein requirement of juvenile Mexican Silverside (*Chirostoma estor estor* Jordan 1879), a stomachless zooplanktophagous fish. Aquaculture Nutrition, *In press*.

Merchie, G; Lavens, P; Dhert, Ph; Dehasque, M; Nelis, H; De Leenheer, A. and P. Sorgeloos. 1995 a. Variation of ascorbic acid content in different live food organisms. Aquaculture, 134: 325-337.

Merchie, G; Lavens, P; Dhert, Ph; Pector, R; Mai Soni, A.F; Abbes, M; Nelis, H; Ollevier, F; De Leenheer, A. and P. Sorgeloos. 1995 b. Live food mediated vitamin C transfer to *Dicentrarchus labrax* and *Clarias gariepinus*. J. Appl. Ichthyol., 11: 336-341.

Merchie, G; Lavens, P; Dhert, Ph; García Ulloa Gómez, M; Nelis, H; De Leenheer, A. and P. Sorgeloos. 1996. Dietary ascorbic acid requirements during the hatchery production of turbot larvae. J. Fish Biol., 49: 573-583.

Merchie, G; Lavens, P; Verreth, J; Olleiver, F; Nelis, H; De Leenheer, A; Storch, V. and P. Sorgeloos. 1997. The effect of supplemental ascorbic acid in enriched live food for *Clarias gariiepinus* larvae at satrfeeding. *Aquaculture*, 151: 245-258.

Mourente, G; Rodriguez, A; Tocher, D.R. and J.R. Sargent. 1993. Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) on lipid and fatty acid compositions and growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae during first feeding. *Aquaculture* 112: 79-98.

Ozkizilcik, S. and F.L.E. Chu. 1994. Evaluation of omega-3 fatty acid enrichment of *Artemia* nauplii as food for striped bass *Morone saxatilis* Walbaum larvae. *J. World. Aquacult. Soc.*, 25: 147-154

Papp, Zs. Gy; Saroglia, M and G. Terova. 1998. An improved method for assay of vitamin C in sample series of fish feed and tissues. *Chromatographia*, 48(1/2): 43-47.

Smith, G.G; Brown, M.R. and A.J. Ritar. 2004 a. Feeding juvenile *Artemia* enriched with ascorbic acid improves larval survival in the spiny lobster *Jasus edwardsii*. *Aquaculture nutrition*, 10: 105-112.

Smith, G.G; Ritar, A.J. and M.R. Brown. 2004 b. Uptake and metabolism of a particulate form of ascorbic acid by *Artemia* nauplii and juveniles. *Aquaculture nutrition*, 10: 1-8.

Sorgeloos, P; Dhert, P. and P. Candreva. 2001. Use of brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 200: 147-159.

Tuncer, H. and R.M. Harrel. 1992. Essential fatty acid nutrition of larval striped bass (*Morone saxatilis*) and palmetto bass (*M. saxatilis* X *M. chrysops*). *Aquaculture*, 101: 105-121.

CAPITULO 4

**EVALUACIÓN DE LOS REQUERIMIENTOS DE VITAMINA C EN
JUVENILES DE PEZ BLANCO DE PÁTZCUARO (*Menidia estor* Jordan 1880)
MEDIANTE EL USO DE DIETAS ARTIFICIALES**

Resumen

Se llevó a cabo un experimento para determinar el requerimiento de Vitamina C de juveniles de Pez blanco (*Menidia estor*). Se elaboraron siete dietas isoenergéticas (~2222 KJ/100g), con diferentes niveles de vitamina C (L-Ascorbil-2-Polifosfato) (25, 40, 80, 100, 125, 480 y 660 mg/Kg), y se evaluaron sus efectos sobre el crecimiento, supervivencia y eficiencia alimenticia en juveniles de pez blanco de 1.3 ± 0.08 g de peso inicial. Los peces fueron alimentados a saciedad seis veces al día con las diferentes dietas, durante 90 días y se observaron los posibles signos externos de deficiencia de vitamina C.

Los signos de deficiencia observados fueron hemorragias, lordosis, escoliosis, malformaciones óseas, erosión de aletas, exoftalmia, y cataratas, entre otros. Los peces alimentados con las dietas con mayores concentraciones de vitamina C, presentaron una menor incidencia ($p < 0.05$) de signos de deficiencia que los alimentados con los niveles más bajos de esta vitamina. Los peces alimentados con los niveles más bajos de vitamina C (25 y 40 mg/Kg) presentaron las más bajas supervivencias (19.3 y 30% respectivamente). No se presentaron diferencias significativas en la supervivencia de los peces sometidos a los demás tratamientos, la cual fue mayor (entre 35 y 52%). En general, las tasas de conversión alimenticia fueron altas, las mejores se presentaron a partir de los 80 mg Kg⁻¹ (con valores entre 3.3 y 4.4). De acuerdo a los resultados obtenidos de crecimiento (Peso ganado %), se obtuvo un requerimiento de vitamina C de 255 mg Kg⁻¹ para los juveniles de *Menidia estor*.

Palabras Clave: Requerimiento de vitamina C; juveniles de *Menidia estor*; crecimiento; supervivencia; signos de deficiencia externos.

Introducción

Debido a que muchas especies de peces no pueden sintetizar la vitamina C a partir de la D-glucosa, debido a la falta de la enzima L-gulonolactona-oxidasa, última enzima en la biosíntesis del ácido ascórbico (Sato and Udenfriend, 1978), es necesario suplir sus requerimientos a través de la dieta. El requerimiento de vitamina C para los peces varía de acuerdo a la especie, la edad, la tasa metabólica, el estado de salud, las interrelaciones entre nutrientes en la dieta, etc. (Gabaudan and Verlhac, 2001).

Se ha establecido el requerimiento cuantitativo de la vitamina C para el crecimiento normal de especies de peces de agua dulce como son el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), el salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*), la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), la tilapia áurea (*Oreochromis aureus*) y la carpa común (*Cyprinus Carpio*), cuyos requerimientos van desde 15 a 50 mg de vitamina C por Kg de dieta (NRC, 1993; Guillaou-Coustans *et al.*, 1998; Robinson and Li, 2002). Otras especies tienen un mayor requerimiento, como es el caso de la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), que requiere 420 mg Kg⁻¹ (Soliman *et al.*, 1994).

También se ha establecido el requerimiento de vitamina C para el crecimiento normal de algunas especies de peces marinos como la perca europea (*Dicentrarchus labrax*), que tiene un requerimiento menor a 50 mg/ Kg (Kaushik, 2002); el pargo japonés (*Pagrus major*), que requiere menos de 200 mg/ Kg (Furuichi *et al.*, 1990); el salmón atlántico (*Salmo salar*), que crece normalmente con niveles de ácido ascórbico de 50 mg/Kg (Lall *et al.*; 1989) y el halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), que requiere 750 mg/Kg en su estado larvario (Rønnestad *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha establecido el requerimiento de vitamina C de especies de peces diadromos como el ayu (*Plecoglossus altivelis*) que requiere 116 mg de ácido ascórbico por Kg de dieta (Xie and Niu, 2006).

La formación de colágeno es necesaria para un crecimiento normal, debido a que este es el mayor componente del esqueleto. Además de ser uno de los componentes principales de los

huesos y cartílagos, el colágeno también es un componente importante de la piel y el endotelio de los vasos sanguíneos. La vitamina C juega un papel importante en la formación de colágeno. En los peces se ha encontrado que el ácido ascórbico es consumido rápidamente en áreas del cuerpo donde se forma el colágeno, como la piel, la aleta caudal, el cartílago del hocico, cabeza y mandíbula, el cartílago de soporte de las branquias y los huesos (Halver, 1972).

La síntesis de colágeno es un proceso complejo que incluye síntesis de proteínas, modificaciones postraduccionales, secreción de proteínas y formación de matrices extracelulares, cuyos pasos se afectan con las variaciones de vitamina C en la dieta (Basabe, 2000). Los componentes esenciales del colágeno son los aminoácidos hidroxiprolina e hidroxilisina. La hidroxilación de los residuos prolil y lisil, específicos del procolágeno, es catalizada por enzimas hidroxilasas dependientes del ácido ascórbico. El ácido ascórbico mantiene el átomo de hierro prostético de las enzimas Prolil y Lisil hidroxilasa en el estado reducido (ferroso), manteniendo así su actividad. Los residuos de hidroxiprolina contribuyen a la rigidez de la triple hélice del procolágeno y una carbohidratos para formar enlaces cruzados que le dan la integridad estructural al colágeno.

Un inadecuado consumo de vitamina C en la dieta ocasiona una actividad reducida de la hidroxilisina en la formación del colágeno. Este colágeno anormal produce la deformación de los tejidos cartilagosos (lordosis, escoliosis, etc.) (Masumoto *et al*, 1991). Adicionalmente el colágeno anormal tiene un punto de fusión más bajo que el colágeno normal y la temperatura del agua parece afectar la incidencia de deformación. Sato *et al*. (1983) encontraron en trucha arco iris, que existe una mayor tasa de deformación a mayores temperaturas del agua, cuando los peces reciben dietas bajas en vitamina C.

Para determinar el requerimiento de vitamina C de una especie de pez dada, el primer paso es estudiar su efecto sobre el crecimiento, su estatus fisiológico y la capacidad de almacenamiento. En el capítulo 3 se evaluó el crecimiento, supervivencia y almacenamiento del ácido ascórbico en el hígado de juveniles de pez blanco utilizando alimento vivo enriquecido con diferentes niveles de vitamina C; sin embargo no fue posible

establecer el requerimiento para los peces. En el presente estudio se utilizaron dietas preparadas con diferentes niveles de vitamina C para evaluar el requerimiento de los juveniles de esta especie, en términos de crecimiento, supervivencia y aparición de signos externos de deficiencia.

Metodología

Peces experimentales

Se obtuvieron juveniles de pez blanco *M. estor* a partir de huevos en el Laboratorio de Nutrición y Acuicultura del Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo), Morelia, Michoacán, México. Después de la eclosión, las crías fueron mantenidas con rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y nauplios de *Artemia franciscana* durante los primeros 30 días, al cabo de los cuales fueron destetadas y mantenidas con una dieta estándar (40% proteína, 10% lípidos) y *Artemia* hasta 15 días antes del experimento. Durante los 15 días previos al experimento, los peces fueron aclimatados al sistema experimental y se alimentaron con *Artemia franciscana*.

Dietas experimentales

Se elaboraron siete dietas isoenergéticas (~2222 KJ/100g) en hojuelas, con diferentes niveles de vitamina C (25, 40, 80, 100, 125, 480 y 660 mg/Kg), utilizando filetes de jurel (*Caranx* sp.) y huachinango (*Lutjanus* sp.), gónada de atún (*Thunnus* sp.) y calamar (*Loligo* sp.) como fuentes de proteína (Tabla 1). Para enriquecer las dietas se utilizó vitamina C estabilizada: L-Ascorbil-2-Polifosfato (AsPP), Rovimix® Stay-C® 35 (DSM Nutritional Products).

Los filetes, el calamar y las gónadas se molieron separadamente en un Molino de carne (Torrey®), y se homogenizaron con agua en una licuadora (Osterizer®). Posteriormente se pasaron por un homogenizador Power Gen® (Fisher Scientific®) hasta obtener una pasta líquida sin fibras. Aparte se preparó una emulsión con aceites de maíz y de pescado,

Tabla 1. Composición de las dietas elaboradas para la evaluación del requerimiento de vitamina C de juveniles de *M. estor*. Los datos se expresan en g Kg⁻¹.

INGREDIENTE	D25	D40	D80	D100	D125	D480	D660
Filete de jurel	246.6	246.6	246.6	246.6	246.6	246.6	246.6
Filete de Huachinango	108.6	108.6	108.6	108.6	108.6	108.6	108.6
Calamar	101.8	101.8	101.8	101.8	101.8	101.8	101.8
Gónada de atún	86.1	86.1	86.1	86.1	86.1	86.1	86.1
Almidón de maíz	226.1	226.0	225.8	225.6	225.5	223.1	221.9
Aceite de pescado	61.7	61.7	61.7	61.7	61.7	61.7	61.7
Aceite de maíz	46.9	46.9	46.9	46.9	46.9	46.9	46.9
Lecitina de soya	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
BHT	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Premezcla de vitaminas ¹	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
Colina	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Vitamina E	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Vitamina C ²	0.17	0.27	0.54	0.67	0.84	3.20	4.40
Premezcla de minerales ¹	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Mezcla de Aglutinantes ³	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0

¹ Premezclas de vitaminas y minerales (DSM Nutritional Products).

² Vitamina C estabilizada: LAscorbil-2-Polifosfato (AsPP), Rovimix® Stay-C® 35 (DSM Nutritional Products).

³ Mezcla de cuatro aglutinantes; Goma arábica : suero de leche : alginato de sodio : carragenina (5:1:1:1).

lecitina de soya y BHT (antioxidante), a la que se añadió posteriormente una mezcla de cuatro aglutinantes: goma arábica, suero de leche, alginato de sodio y carragenina (en una proporción 5:1:1:1), disueltos en agua. Más tarde se mezcló la pasta con los demás ingredientes (emulsión de aceites con los aglutinantes, almidón, vitaminas, minerales) usando una mezcladora Hobart®, después de lo cual se obtuvo una pasta suave para obtener hojuelas. Las hojuelas se elaboraron manualmente, esparciendo la pasta en capas finas sobre papel plastificado con ayuda de una espátula y luego se secaron a 35° C durante

12 horas en un secador de aire forzado. Las hojuelas obtenidas se quebraron manualmente, se pasaron por tamices de diferentes tamaños y se almacenaron en un congelador a -20°C hasta su uso. Se llevaron a cabo análisis de la composición proximal y del contenido de vitamina C de cada dieta (tablas 2 y 3).

Tabla 2. Composición proximal de las dietas. Los datos se expresan en porcentaje del peso seco. (ELN: Extracto libre de nitrógeno).

Dieta	Proteína (%)	Lípidos (%)	Cenizas (%)	ELN* (%)	Humedad (%)	Energía (MJ/Kg)
D25	51.00	10.40	3.24	35.36	11.31	22.23
D40	50.72	10.37	2.67	36.24	9.45	22.31
D80	52.49	10.40	2.81	34.30	9.82	22.40
D100	50.33	9.82	3.01	36.84	10.99	22.10
D125	52.45	10.06	2.98	34.51	11.85	22.30
D480	51.13	10.69	4.48	33.70	10.06	22.09
D660	50.54	10.24	3.44	35.78	10.47	22.13

* $ELN = 100 - (\%proteína + \%lípidos + \%cenizas + \%humedad)$

Tabla 3. Concentración de Vitamina C de las dietas experimentales

Dieta	Concentración de vitamina C (mg /Kg dieta)
D25	25.17
D40	40.41
D80	78.25
D100	100.30
D125	127.28
D480	478.71
D660	658.60

Protocolo experimental

El experimento constó de 7 tratamientos (correspondientes a las siete dietas con diferentes niveles de vitamina C), con tres repeticiones cada uno, teniendo un total de 21 unidades experimentales. Se llevó a cabo en un sistema cerrado de recirculación consistente en 21 tanques de fibra de vidrio de 50 litros de capacidad (cada uno con aireación constante y un flujo continuo de agua de 1L / min.) un sedimentador y un filtro biológico. La temperatura del agua se mantuvo a $24.6 \pm 0.49^\circ \text{C}$ y la salinidad a $5.9 \pm 0.95 \text{ g L}^{-1}$, con un fotoperíodo de 12L:12O. Los valores promedio de oxígeno disuelto, pH, nitritos y amonio fueron $6.2 \pm 0.77 \text{ mg L}^{-1}$, 7.8 ± 0.25 , $0.05 \pm 0.02 \text{ mg L}^{-1}$ y 0.0 mg L^{-1} , respectivamente.

Juveniles de pez blanco de $1.3 \pm 0.08 \text{ g}$ de peso promedio, provenientes de diferentes desoves, fueron sembrados al azar en cada tanque (cada tanque correspondió a una unidad experimental), a una densidad de 1 pez L^{-1} (50 peces por tanque) y se alimentaron a saciedad seis veces al día con las diferentes dietas, durante 90 días. Diariamente se llevó un registro del alimento consumido y de la supervivencia. Mensualmente los animales fueron pesados mediante el uso de anestesia con benzocaína a una concentración de 24 mg L^{-1} . Cada día se observaron los peces con el fin de detectar posibles signos de deficiencia, tales como: opérculos cortos, hemorragias, erosión de aletas, nado errático, lordosis y escoliosis, entre otros.

Parámetros de crecimiento

Con los datos de peso y alimento consumido, se evaluó el crecimiento y eficiencia alimenticia de los peces alimentados con las diferentes dietas. Se calcularon el peso ganado (PG), la ganancia de peso individual (GPI), la tasa específica de crecimiento (TEC), el alimento consumido individual (ACI) y la tasa de conversión alimenticia (TCA), utilizando las siguientes fórmulas:

$$\text{PG (\%)} = 100 * (\text{Peso final} - \text{Peso inicial}) / \text{Peso inicial}$$

$$\text{GPI (mg día}^{-1}\text{)} = \text{Peso Ganado individual (mg)} / \text{tiempo (días)}$$

$$\text{TEC (\% día}^{-1}\text{)} = 100 * [\text{Ln(Peso final)} - \text{Ln(Peso inicial)}] / \text{Tiempo (días)}$$

$$\text{ACI (mg día}^{-1}\text{)} = [? \text{ (alimento suministrado (mg) / número de individuos)} t_1, t_2, \dots t_n] /$$

Tiempo (días)

$$\text{TCA} = \text{ACI} / \text{GPI}$$

Métodos analíticos

Análisis proximales (bromatológicos) de las dietas

Los análisis proximales de las dietas se llevaron a cabo utilizando métodos estándar (AOAC, 2000). La humedad se analizó mediante el secado de muestras a 105° C por 24 horas en una estufa de aire forzado; la proteína cruda (N x 6.25) por el método de Dumas (Ebling, 1968), utilizando un analizador de Nitrógeno (Leco FP-528); el extracto etéreo (lípidos) por extracción, utilizando una unidad de extracción automática Foss Tecator (2050 Soxtec Avanti); las cenizas por calcinación en una mufla a 550° C y el extracto libre de nitrógeno (carbohidratos) se calculó mediante la fórmula: $ELN = 100 - (\%proteína + \%lípidos + \%cenizas + \%humedad)$. Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

La estimación de la energía de las diferentes dietas se calculó utilizando los valores típicos de energía para proteínas (23.60 kJ.g⁻¹), lípidos (36.23 kJ.g⁻¹) y carbohidratos (17.2 kJ.g⁻¹) (NRC, 1993), multiplicándolos por el contenido de proteína, lípidos y carbohidratos de la dieta respectivamente.

Análisis de vitamina C

Se determinó el ácido L-ascórbico de las dietas por cromatografía de líquidos de alta resolución. Las dietas se homogenizaron en un buffer de acetato de sodio frío (pH 4.8). Los extractos se dividieron en dos partes: la primera para la detección de la línea base, tratándola con enzima ascorbato-oxidasa durante 30 minutos; la segunda para la detección de ácido L-ascórbico, añadiendo 1,4-Ditioeritritol y la enzima fosfatasa ácida

(Fosfohidrolasa Ortofosfórica-monoéster) para romper los enlaces fosfato. Previo al análisis en el cromatógrafo los extractos se deproteinizaron con ácido perclórico al 10% y se centrifugaron a 12000 G, a una Temperatura de 2° C durante 10 minutos (Papp *et al.*, 1998). Los sobrenadantes se filtraron (utilizando filtros de membrana de 0.45 µm) y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos (isocratic single column system, Agilent 1100 series). Se utilizó un buffer (fase móvil o eluente) de acetato de sodio 0.04M (con EDTA 0.05 mM y fosfato de tetrabutilamonio 0.5mM, pH 3.76), a una temperatura de 23° C, con un flujo de 0.5 mL/min y una presión de 65 Bar. Se utilizó una columna Lichrosorb RP-18 (4.6 x 200mm, Agilent) y la lectura de picos se realizó en el espectro UV visible a una longitud de onda de 254 nm. Para todos los análisis se utilizaron reactivos ultrapuros de J.T. Baker (EUA), Fluka (Suiza), SIGMA (Alemania) y Aldrich (EUA), y para la filtración de buffers y homogenados se utilizaron filtros de membrana Durapore (Millipore) de 0.45 µm.

Análisis de datos

Los resultados obtenidos de parámetros de crecimiento, consumo de alimento, presencia de signos de deficiencia y supervivencia se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) a una vía y para comparar las medias entre los tratamientos se llevaron a cabo pruebas *post-hoc* de Tukey ($\alpha = 0.05$). Para cada tratamiento, se aplicó un modelo de regresión de crecimiento exponencial ($y = a^{bx}$) con los datos de peso promedio contra tiempo; las pendientes obtenidas se compararon mediante un ANOVA de una vía utilizando igualmente una prueba *post-hoc* de Tukey ($\alpha = 0.05$). Todos los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico MINITAB (versión 13.32) (MINITAB INC).

La estimación del requerimiento de vitamina C se llevó a cabo mediante la obtención de una curva de dosis-repuesta, aplicando un modelo de regresión log normal, de cuatro parámetros, del Peso ganado (%) contra el nivel de vitamina C de la dieta, para lo cual se utilizó el programa SIGMA-PLOT (versión 8.0).

Resultados

En general, el crecimiento de los juveniles alimentados con las diferentes dietas fue lento a lo largo del experimento (Figura 1), con respecto al crecimiento observado en los peces alimentados con nauplios de *Artemia* (capítulo 3). En la tabla 4 se observan las pendientes obtenidas al aplicar los modelos de regresión de crecimiento exponencial ($y = a^{bx}$) con los datos de peso promedio contra tiempo. Las mayores pendientes se obtuvieron a partir de los 80 mg Kg⁻¹, sin presentarse diferencias significativas ($p > 0.05$) con las dietas de mayor contenido de vitamina C. Como se observa en la tabla 5, las mejores respuestas de crecimiento en cuanto al peso ganado (PG) (%), y la tasa específica de crecimiento (TEC) (% día⁻¹) fueron obtenidas con las dietas con niveles de vitamina C entre 80 y 660 mg Kg⁻¹. Tanto el peso final (mg), como el peso ganado (mg) y la ganancia de peso individual (mg día⁻¹) de los peces, se incrementaron con el aumento de vitamina C en la dieta hasta los 80 mg Kg⁻¹, a partir de los cuales no se presentaron diferencias significativas; al llegar a un nivel de 660 mg Kg⁻¹ se presentó una reducción significativa de estos parámetros ($p < 0.05$). Las mejores tasas de conversión alimenticia (TCA) se presentaron en los peces alimentados con niveles de vitamina C entre 80 y 660 mg Kg⁻¹ (tabla 5). Las menores supervivencias se obtuvieron con las dietas con más bajo contenido de vitamina C (D25 y D40); no se presentó diferencia significativa en la supervivencia de los peces alimentados con las demás dietas, que mostraron los mayores valores (Figura 2).

Se observaron signos de deficiencia externos tales como erosión de aletas, hemorragias, lordosis, escoliosis, acortamiento del cuerpo, malformaciones óseas a nivel de la cabeza y hocico, exoftalmia, cataratas, nado errático, protrusión de intestino y heridas sin sanar con desarrollo de hongos (Figura 3), siendo la erosión de aletas y las hemorragias los signos más frecuentes (Figura 4). Se observó una clara tendencia a reducirse la presencia de signos a medida que se incrementaba el nivel de vitamina C de la dieta. Los peces alimentados con la dieta D25 mostraron una mayor incidencia de signos de deficiencia (47 casos en promedio) que los demás tratamientos ($p < 0.05$), mientras que los peces alimentados con la dieta D660 presentaron la menor incidencia de signos (~18 casos en promedio) (Figura 5).

Bajo las condiciones del experimento, al analizar la curva de dosis-respuesta del peso ganado (%) contra el nivel de vitamina C de la dieta, se obtuvo un requerimiento de 255 mg Kg^{-1} para los juveniles de *Menidia estor* (figura 6).

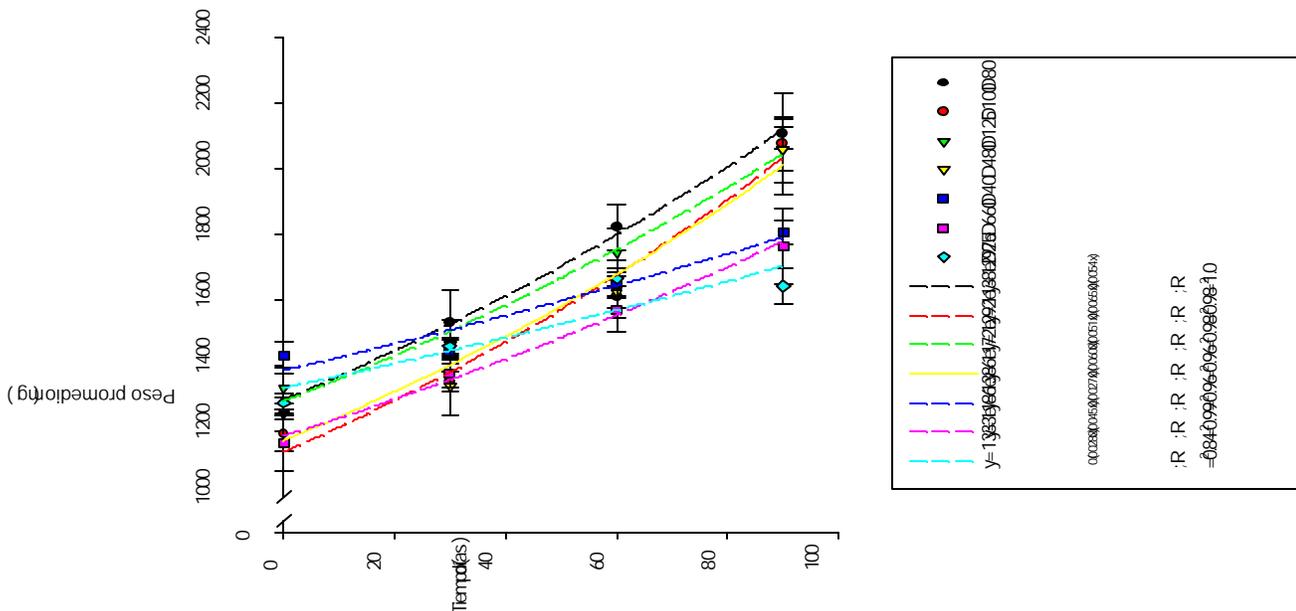


Figura 1. Crecimiento de los juveniles de *M. estor* (valores promedio de tres repeticiones) alimentados con las dietas a diferentes niveles de vitamina C (25, 40, 80, 100, 125, 480 y 660 mg vit C / Kg de dieta) durante 90 días. Las líneas punteadas representan curvas de regresión.

Tabla 4. Comparación entre las pendientes (b) de las curvas de crecimiento, obtenidas al aplicar el modelo de crecimiento exponencial ($y = a^{bx}$), a los datos de peso promedio (mg) en relación al tiempo (días). Los datos se presentan como el promedio de tres repeticiones. Indices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tratamiento	Pendiente
D25	0.0028 ^{ab}
D40	0.0027 ^a
D80	0.0054 ^c
D100	0.0065 ^c
D125	0.0051 ^{bc}
D480	0.0060 ^c
D660	0.0045 ^{abc}

Tabla 5. Parámetros de crecimiento y eficiencia alimenticia (valores promedio de tres grupos \pm S.E.) de los juveniles de pez blanco alimentados con las diferentes dietas. Valores con los mismos superíndices no presentan diferencias significativas entre tratamientos ($p>0.05$).

Tratamiento	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Peso ganado (mg)	Peso ganado (%)	GPI (mg/día)	ACI (mg/día)	TCA	TEC (%/día)
D25	1287.00 \pm 29.7	1642.86 \pm 57.14 ^a	355.86 \pm 78.14 ^a	27.76 \pm 6.52 ^a	3.95 \pm 1.23 ^a	38.29 \pm 4.63 ^a	9.90 \pm 1.00 ^c	0.27 \pm 0.06 ^a
D40	1433.00 \pm 38.2	1807.20 \pm 34.47 ^{ab}	374.20 \pm 7.47 ^a	26.11 \pm 0.029 ^a	4.16 \pm 0.08 ^a	32.32 \pm 3.17 ^a	7.79 \pm 0.92 ^{bc}	0.26 \pm 2.8e-4 ^a
D80	1284.00 \pm 19.8	2105.95 \pm 44.05 ^b	821.95 \pm 30.05 ^{bc}	64.00 \pm 1.64 ^b	9.13 \pm 0.33 ^{bc}	30.29 \pm 1.56 ^a	3.33 \pm 0.29 ^a	0.55 \pm 0.01 ^b
D100	1193.00 \pm 55.1	2077.16 \pm 154.1 ^b	884.16 \pm 115.09 ^c	73.88 \pm 7.23 ^b	9.82 \pm 1.28 ^c	36.31 \pm 0.15 ^a	3.76 \pm 0.50 ^a	0.61 \pm 0.05 ^b
D125	1330.00 \pm 45.0	2061.12 \pm 67.78 ^b	731.12 \pm 49.93 ^{bc}	54.93 \pm 3.25 ^b	8.12 \pm 0.55 ^{bc}	34.25 \pm 1.49 ^a	4.27 \pm 0.43 ^{ab}	0.49 \pm 0.02 ^b
D480	1253.33 \pm 14.7	2057.20 \pm 99.13 ^b	803.87 \pm 92.41 ^{bc}	64.07 \pm 7.01 ^b	8.93 \pm 1.03 ^{bc}	35.53 \pm 1.70 ^a	4.07 \pm 0.42 ^a	0.55 \pm 0.05 ^b
D660	1164.67 \pm 83.9	1764.72 \pm 113.9 ^a	600.05 \pm 98.85 ^{ab}	51.65 \pm 8.93 ^b	6.67 \pm 1.10 ^{ab}	28.10 \pm 1.15 ^a	4.44 \pm 0.70 ^{ab}	0.46 \pm 0.07 ^b

GPI: Ganancia de peso individual
ACI: Alimento consumido individual
TCA: Tasa de conversión alimenticia
TEC: Tasa específica de crecimiento

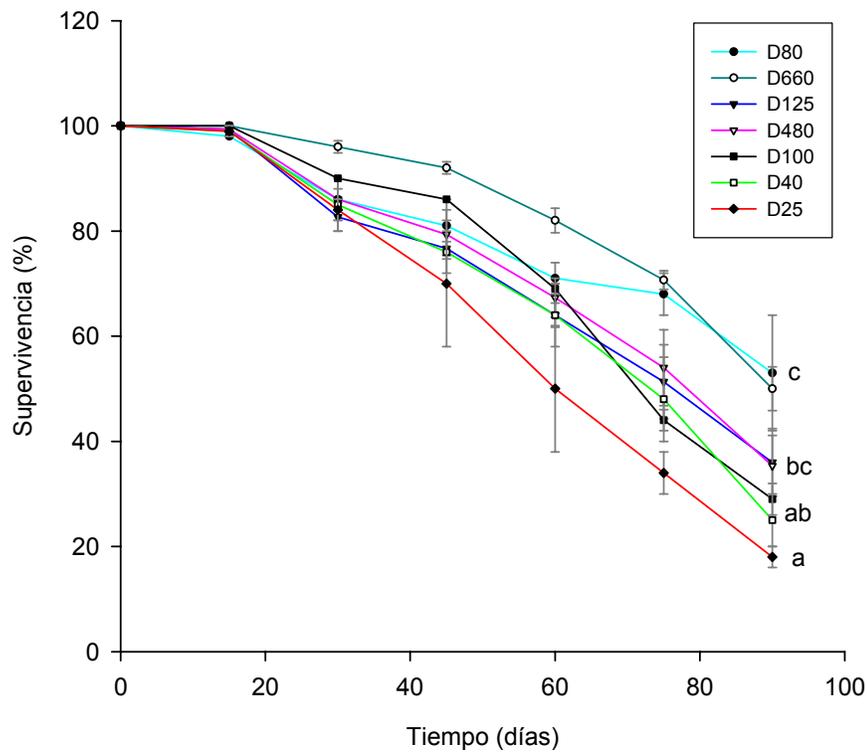


Figura 2. Supervivencia (valores promedio de tres repeticiones) de los juveniles de pez blanco alimentados con dietas a diferentes niveles de vitamina C (25, 40, 80, 100, 125, 480 y 660 mg Kg⁻¹), durante 90 días de experimentación. Indices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los datos finales de supervivencia.



Figura 3.

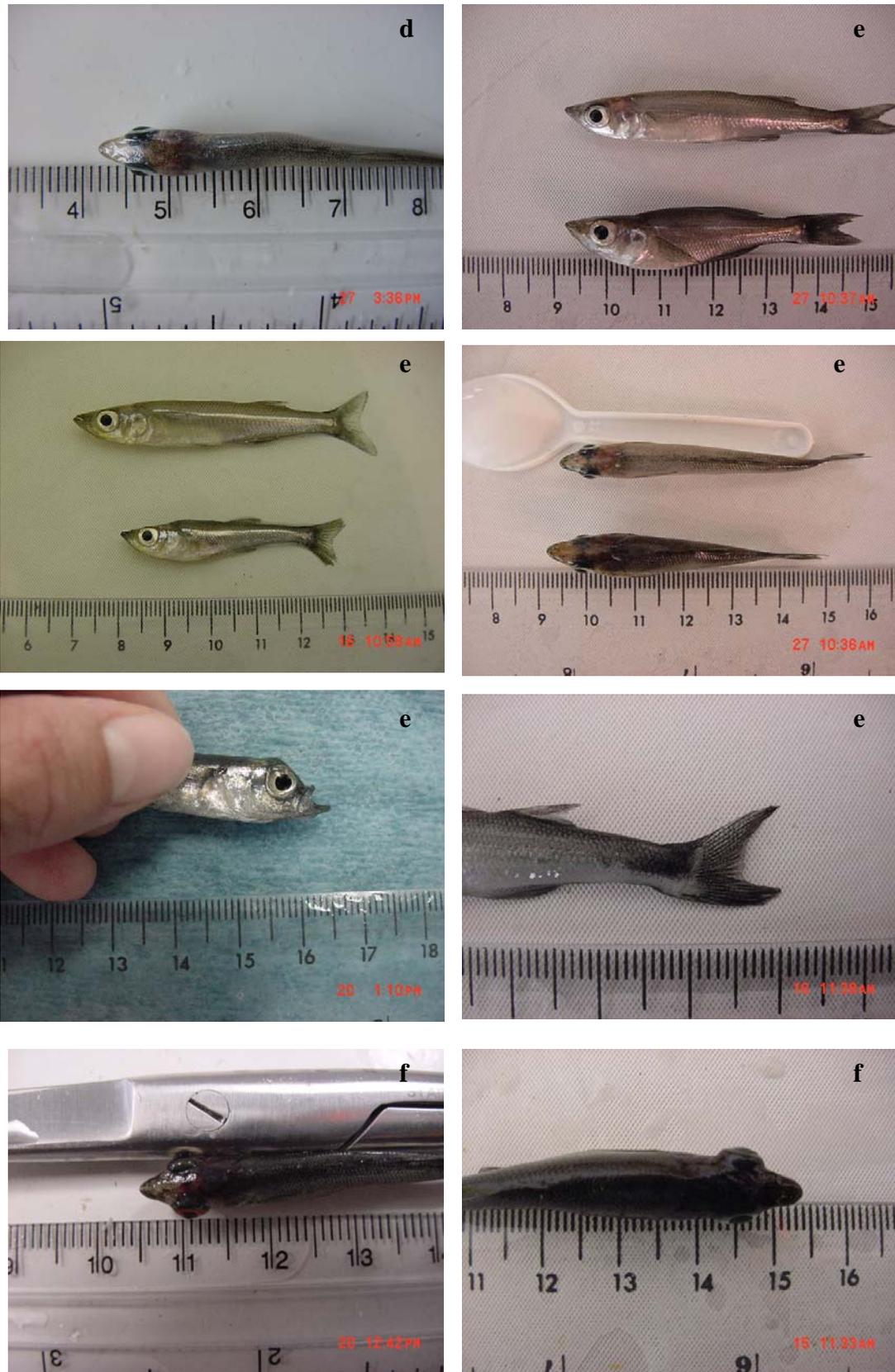


Figura 3.

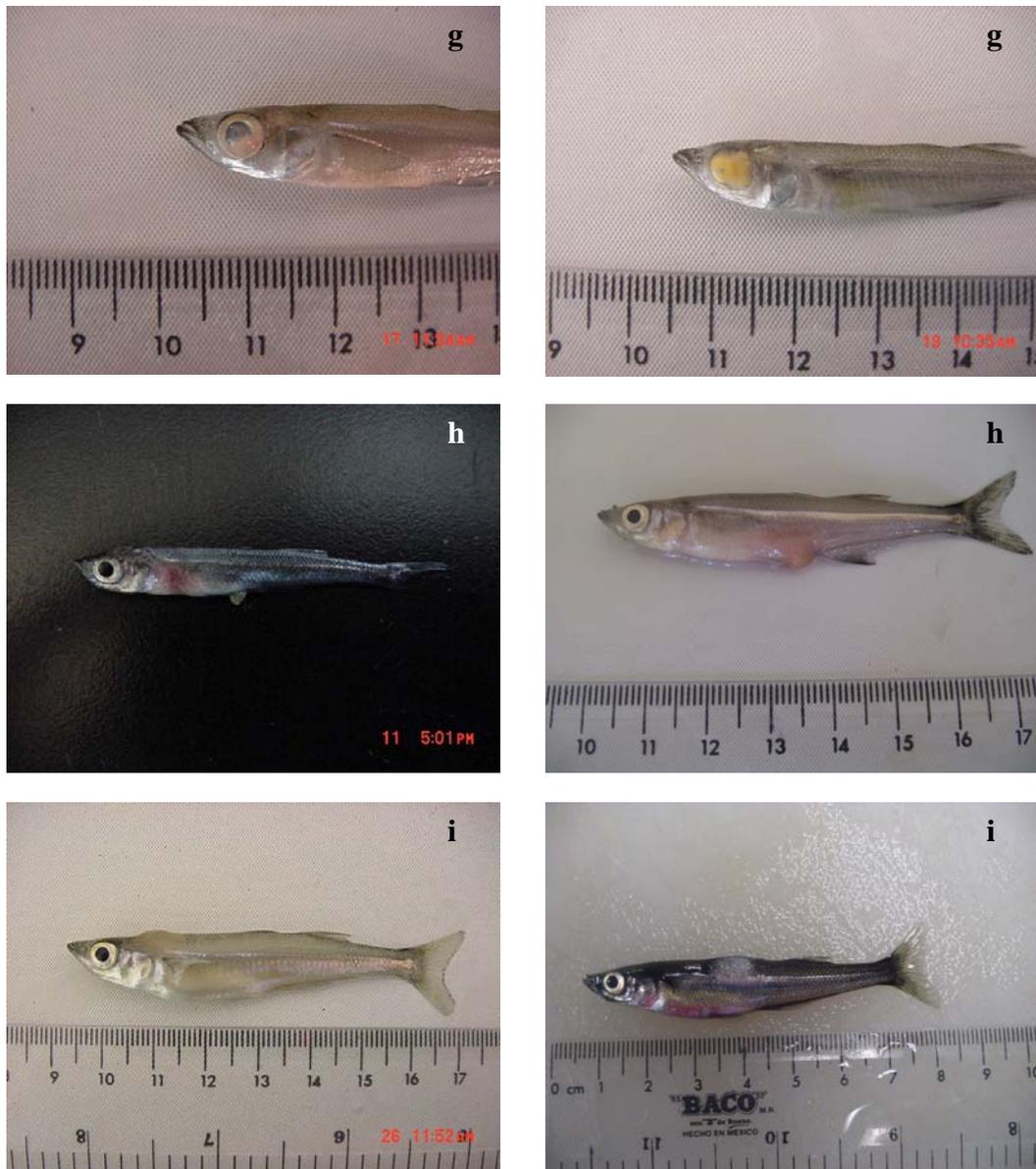


Figura 3. Signos externos de deficiencia encontrados en los juveniles de *M. estor*: Hemorragias (a); erosión de aletas (b); lordosis (c); escoliosis (d); malformaciones óseas (e), exoftalmia (f); cataratas (g); protrusión de intestino (h); heridas sin sanar con desarrollo de hongos (i).

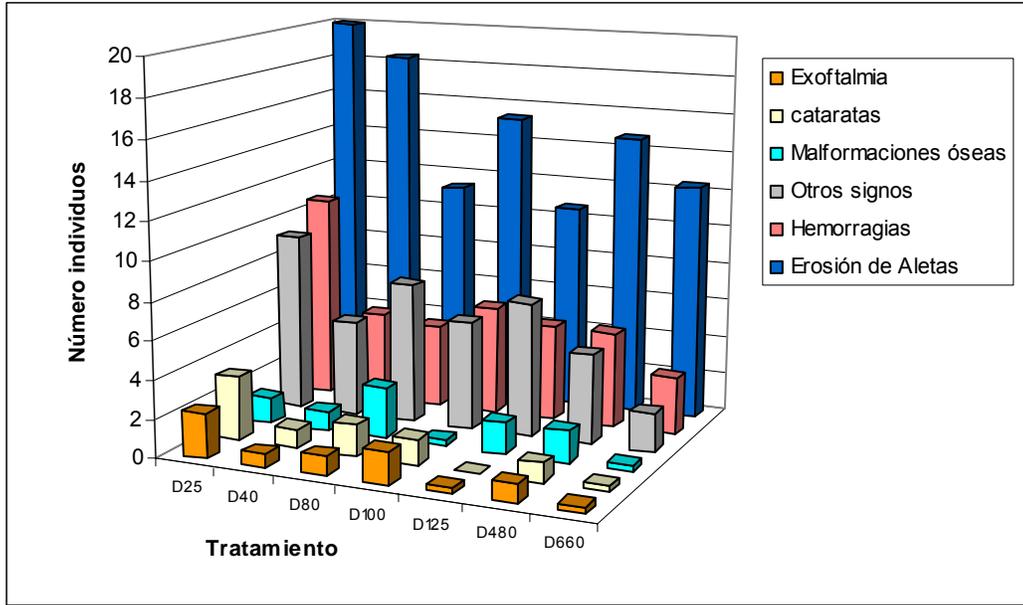


Figura 4. Número de individuos promedio por signo de deficiencia en los diferentes tratamientos (Diets con diferentes niveles de de vitamina C: 25, 40, 80, 100, 125, 480 y 660 mg Kg⁻¹).

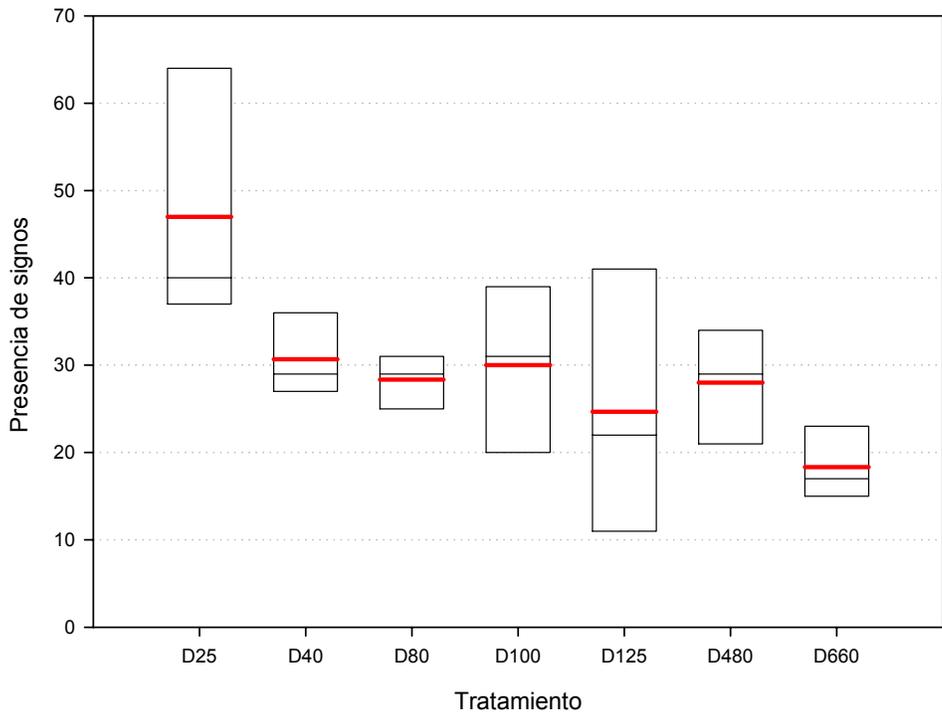


Figura 5. Presencia de signos de deficiencia externos (número de individuos promedio) en los peces alimentados con las dietas a diferentes niveles de vitamina C (25, 40, 80, 100, 125, 480 y 660 mg Kg⁻¹). (Las líneas rojas dentro de cada caja indican el promedio, mientras que las líneas negras indican la mediana)

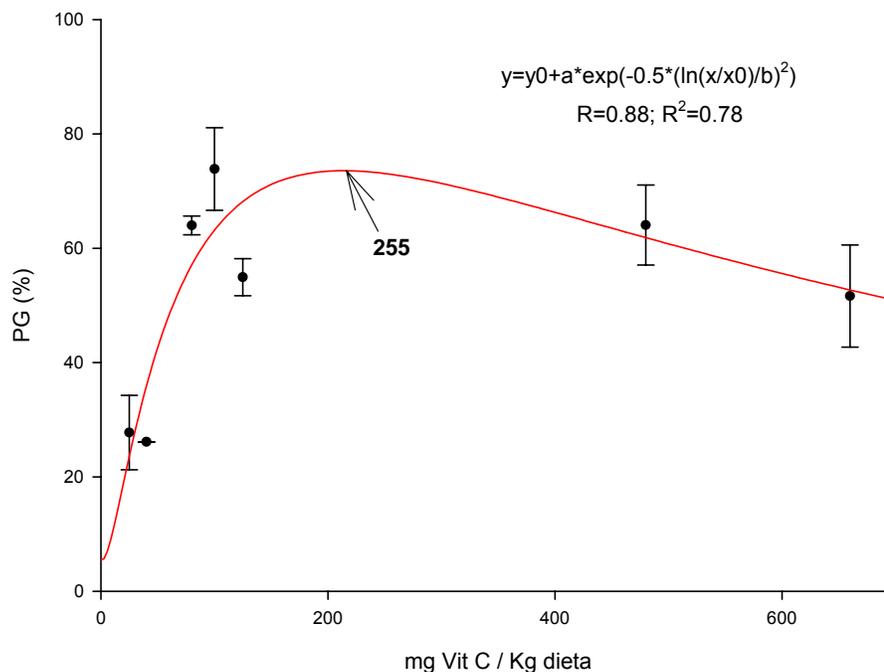


Figura 6. Curva de dosis-respuesta usada para determinar el requerimiento de vitamina C de los juveniles de pez blanco *Menidia estor*, aplicando un modelo de regresión Log Normal de 4 parámetros, del Peso ganado (%) contra el nivel de vitamina C de la dieta (mg Kg^{-1}) (Los puntos representan valores promedio de tres grupos de peces \pm S.E.).

Discusión

El crecimiento de los peces en general fue bajo (tasas específicas de crecimiento entre 0.26 y 0.6 $\% \text{ día}^{-1}$), comparado con los peces alimentados con nauplios de *Artemia* (tasas de crecimiento entre 0.91 y 1.29 $\% \text{ día}^{-1}$) (capítulo 3). Considerando que los peces fueron mantenidos a las mismas condiciones de temperatura, salinidad y densidad, e incluso en el mismo sistema de recirculación, además de que los experimentos iniciaron con peces de tallas similares, es evidente que las dietas preparadas, no suplen los requerimientos para un máximo crecimiento y supervivencia de los juveniles de pez blanco. Sin embargo, el nivel de vitamina C de la dieta si tuvo influencia en el crecimiento y la supervivencia de los peces.

Como se observa, el nivel de vitamina C de la dieta tiene un efecto en el crecimiento de los juveniles de *M. estor*, el cual se incrementa hasta un nivel de 80 mg Kg⁻¹, a partir del cual no presenta diferencias significativas, hasta el punto en que a 660 mg Kg⁻¹ se reduce. Este comportamiento se ha observado en otros peces como el híbrido de tilapia (*Oreochromis niloticus* X *O. aureus*), cuyo crecimiento se incrementa con el nivel de vitamina C hasta un nivel de 67.7 mg Kg⁻¹, después del cual, se reduce significativamente, cuando se utiliza L-ascorbil-2-monofosfato-Mg como fuente de ácido ascórbico (Shiau & Hsu, 1999). Como se mencionó anteriormente, el ácido ascórbico tiene un efecto específico sobre el crecimiento de los peces; esto se ve reflejado en el menor crecimiento que presentaron los peces alimentados con las dietas con más bajos niveles de vitamina C. Se han reportado resultados similares para una importante variedad de especies de peces marinos como el lenguado (*Paralichthys olivaceus*), el pez roca (*Sebastes schlegelii*), la corvina (*Sciaenops ocellatus*), la perca gigante (*Lates calcarifer*), el mero (*Epinephelus malabaricus*) y la anguila (*Anguilla japonica*), entre otras (Phromkunthong *et al.*, 1997; Aguirre & Gatlin, 1999; Wang *et al.*, 2003a; Wang *et al.*, 2003b; Kojima & Tokumitsu, 2005).

De acuerdo a los resultados obtenidos de crecimiento, se obtuvo un requerimiento de vitamina C de 255 mg Kg⁻¹ para un mejor crecimiento de los juveniles de *Menidia estor*. Dicho requerimiento es superior al encontrado para otras especies de peces marinos como el lenguado, *Paralichthys olivaceus*, que es de 93 mg/Kg (Wang *et al.*, 2002), el de *Sebastes schlegelii* que es de 106 mg/Kg (Wang *et al.*, 2003) y el del pez loro (*Oplegnathus fasciatus*), que requiere niveles de vitamina C de 118 mg/Kg para un máximo crecimiento (Wang *et al.*, 2003a). Otras especies de peces marinos, requieren niveles más bajos en la dieta; tal es el caso de la corvina (*Sciaenops ocellatus*) que tiene un requerimiento mínimo de vitamina C de 15 mg/Kg (Aguirre & Gatlin, 1999), el mero (*Epinephelus malabaricus*) que requiere 17.8 mg/kg (Lin & Shiau, 2005) y la perca gigante (*Lates calcarifer*) cuyo requerimiento es de 30 mg/Kg (Phromkunthong *et al.*, 1997). Cabe aclarar que los modelos

utilizados para el análisis del requerimiento de vitamina C en las otras especies han sido diferentes¹.

Aunque los peces fueron alimentados a saciedad aparente y durante el proceso de alimentación se tuvo el cuidado de que el alimento no se sedimentara al fondo y fuera siempre consumido por los peces, los valores obtenidos de consumo de alimento tuvieron gran variabilidad y no se observó una tendencia clara entre el alimento consumido individual (ACI) (mg día^{-1}) y el nivel de vitamina C de la dieta; sin embargo, la tasa de conversión alimenticia (TCA) si se vio influenciada por el contenido de vitamina C del alimento. Como se observa en la tabla 4, los valores de TCA en general fueron altos, lo que evidencia una pobre eficiencia en la conversión del alimento en todos los tratamientos, sin embargo, esto es mucho más evidente en los tratamientos D25 y D40.

Los peces empezaron a exhibir signos patológicos externos a partir del día 10 de alimentación con las diferentes dietas, independientemente del contenido de vitamina C, resultados que distan de parecerse a los obtenidos en otras especies de peces. Como ejemplos se encuentran la trucha arco iris, cuyos juveniles empiezan a mostrar síntomas de deficiencia a las 6 semanas de alimentación con dietas escorbúticas (Dabrowski *et al.*, 1990); la corvina, *Sciaenops ocellatus*, que empieza a acusar signos de deficiencia como lordosis y escoliosis, después de 8 semanas de alimentación con dietas sin vitamina C (Aguirre & Gatlin, 1999) y el pez roca *Sebastes schlegeli*, que comienza a mostrar síntomas de deficiencia tales como anorexia, nado errático y crecimiento reducido entre otros, después de 9 semanas (Wang *et al.*, 2003b). Por otro lado, en juveniles del lenguado *Paralichthys olivaceus*, Wang *et al.* (2002) observaron la aparición de signos de deficiencia tales como anorexia, escoliosis, cataratas, exoftalmia y hemorragias después de 12 semanas de alimentación con dietas deficientes de vitamina C, mientras que en otras especies como el pez loro (*Oplegnathus fasciatus*) los peces empiezan a mostrar síntomas a las 3 semanas (Wang *et al.*, 2003a). En híbridos de tilapia también se ha observado que al

¹ Según Shearer (2000) el modelo estadístico utilizado puede influir notablemente en la estimación de requerimientos nutricionales; cuando este no es el más apropiado se pueden subestimar tales requerimientos.

alimentar los peces con dietas sin vitamina C, empiezan a aparecer signos patológicos de deficiencia después de 8 semanas (Shiau & Hsu, 1999).

Aunque al inicio, la aparición de signos de deficiencia se dio independientemente del nivel de vitamina C de la dieta, al final del experimento, si se observó una influencia del nivel de esta vitamina en la incidencia de síntomas. Así, se observa una incidencia significativamente mayor de signos en los peces alimentados con niveles bajos de ácido ascórbico, la cual se va reduciendo con el incremento del mismo en la dieta.

Si bien los juveniles de pez blanco mostraron signos de deficiencia similares a las demás especies mencionadas, estos se presentaron mucho antes que en los otros peces, incluso en aquellos alimentados con los niveles más altos de vitamina C. Podría pensarse, que quizás el pez blanco no utilizara efectivamente el L-Ascorbil-2-Polifosfato (AsPP) y que esta fuera la causa de la presencia de estos signos patológicos en los peces de todos los tratamientos. Sin embargo, como se demostró en el capítulo 3, el pez blanco si tiene la capacidad de utilizar efectivamente el AsPP como fuente de ácido ascórbico; por tanto esta razón quedaría descartada. Esto indica posibles deficiencias de otros nutrientes importantes en las dietas elaboradas o quizás exceso de algunos nutrientes que pudieran causar tales efectos.

Si se observa la composición proximal de las dietas elaboradas (tabla 2) los niveles de carbohidratos (ELN) están alrededor del 35% del peso seco, que probablemente pudo ser una cantidad excesiva de estos nutrientes para los juveniles de pez blanco, que tiene hábitos carnívoros y cuyos requerimientos son desconocidos. Las especies de peces difieren grandemente en su habilidad para digerir carbohidratos. Esta variabilidad refleja las diferencias anatómicas y funcionales en el tracto gastrointestinal y órganos asociados. Así, los peces herbívoros y omnívoros han desarrollado funciones digestivas capaces de hidrolizar gran variedad de alimentos que contienen carbohidratos, en contraste con los peces carnívoros, que no poseen las mismas capacidades (Krogdahl *et al*; 2005).

Varios autores han encontrado cambios histológicos en diferentes especies como resultado del consumo de altos niveles de carbohidratos en la dieta, lo cual sugiere una pobre utilización de los carbohidratos en los peces (Sandholm *et al.*, 1976; Spannhof & Plantikow, 1983). También se ha encontrado en varias especies de peces que altos niveles de carbohidratos en la dieta ocasionan un incremento en el tamaño del hígado (mayores índices hepatosomáticos) y en el contenido de glicógeno (Furuichi & Yone, 1971; Lee & Putnam, 1973; Cowey *et al.*, 1975; Bergot 1979; Hilton & Atkinson, 1982; Mohapatra *et al.*, 2003; Stone *et al.*; 2003a; Krogdahl *et al.*; 2004). En el presente estudio, en todos los peces se encontraron índices hepatosomáticos (IHS) promedio entre 2.67 y 3.47 %, los cuales son significativamente mayores que los IHS promedio de juveniles de pez blanco alimentados con nauplios de *Artemia* (1.08%) (capítulo 3), lo cual puede ser reflejo del alto nivel de carbohidratos en las dietas.

Los carbohidratos de la dieta pueden ejercer una importante influencia indirecta en el metabolismo intermediario de los peces; son uno de los ingredientes de la dieta que afectan en gran medida la utilización del alimento (Hemre *et al.*, 2002). Se ha observado en peces carnívoros estrictos como el Bacalao (*Gadus morhua*), el Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) y el salmón, que incrementos en los niveles de almidón mayores al 10% del contenido en la dieta seca, resultan en una reducida utilización del alimento (Hemre *et al.*, 1993, 1995; Helland & Grisdale-Helland, 1998). Quizás esta puede ser una de las causas del pobre crecimiento en los juveniles de *M. estor*. Según varios autores, los peces carnívoros pueden compensar esto con un mayor consumo de alimento para mantener el crecimiento (Bergot, 1979; Hilton & Atkinson, 1982; Stephan *et al.*, 1996), lo cual podría explicar las altas tasas de conversión alimenticia obtenidas en el pez blanco.

Un exceso de carbohidratos puede causar reducción en el crecimiento y un incremento en la mortalidad debido a que puede haber una sobrecarga metabólica (Hilton *et al.*, 1987; Stone *et al.*; 2003b). Lo anterior puede ser una causa de que, en el presente estudio, se obtuviera un reducido crecimiento y supervivencias menores al 52 % en todos los tratamientos.

Los peces carnívoros alimentados con dietas con altos niveles de almidón parecen tener una pobre habilidad para manejar el exceso de glucosa, y se asume que por ello están bajo

constante estrés metabólico (Pieper & Pfeffer, 1980), lo cual puede causar una supresión de las funciones inmunes. Adicionalmente un incremento en los nutrientes no digeridos como el almidón, puede representar un medio selectivo para el crecimiento de diferentes especies de bacterias, que pueden afectar en detrimento la población natural de microbios en el intestino y puede causar cambios en los mecanismos de virulencia (Hoff, 1989). Es posible que la aparición temprana de signos patológicos en los juveniles de *M. estor* se debiera a un estrés metabólico, adicional al estrés al que están sometidos en cultivo, lo que los pudiera hacer más susceptibles a las enfermedades. Un signo patológico muy común fue la protrusión del intestino y la inflamación e irritación del ano, que podría indicar problemas a nivel intestinal, los cuales, no se descarta, pudieran ser causados por bacterias.

Con lo anterior, se puede pensar que los efectos de la vitamina C de las dietas sobre el crecimiento, la supervivencia y la aparición de signos patológicos, pudieron haber sido “enmascarados” por los efectos de los altos niveles de carbohidratos. A pesar de ello, se pudo obtener, con base en los resultados de crecimiento, el punto de quiebre que indicaría los requerimientos de los juveniles de *M. estor*, para un mejor crecimiento y supervivencia.

Aun no se cuenta con una formulación artificial que substituya completamente la *Artemia* en el cultivo del pez blanco, por ello, es necesario formular dietas que suplan mejor las necesidades de esta especie, para obtener máximos crecimientos, sin depender del uso de alimento vivo. Si bien las dietas formuladas en el presente estudio no mostraron ser idóneas para el reemplazo del alimento vivo en el cultivo de *M. estor*, sirvieron para tener una mayor aproximación al conocimiento de los requerimientos nutricionales de los juveniles de esta especie, contribuyendo así al conocimiento de los requerimientos de otros atherinópsidos, de los cuales existen pocos estudios a nivel nutricional.

Referencias

Aguirre, P. and D.M. Gatlin III. 1999. Dietary vitamin C requirement of red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture Nutrition*, 5: 247-249.

A.O.A.C. 2000. Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 17TH EDITION. Washington, E.U.A. 1018p.

Basabe, B. 2000. Funciones de la vitamina C en el metabolismo del colágeno. Rev. Cubana Aliment. Nutr., 14(1): 46-54.

Bergot, F. 1979. Carbohydrates in rainbow trout diets: effects of the level and source of carbohydrates and the number of meals on growth and body composition. Aquaculture, 18: 157-167.

Cowey, C.B; Adron, J.W; Brown, D.A. and A.M. Shanks. 1975. Studies on the nutrition of marine flatfish. The metabolism of glucose by plaice *Pleuronectes platessa* and the effect of dietary energy source on protein utilization in plaice. Br. J. Nutr., 33: 219-231.

Dabrowski, K; El-Fiky, N; Köck, G; Frigg, M. and W. Wieser. 1990. Requirement and utilization of ascorbic acid and ascorbic sulfate in juvenile rainbow trout. Aquaculture, 91: 317-337.

Ebling, M.E. 1968. The Dumas method for nitrogen in feeds. Journal of Association of Official Analytical Chemists, 51: 766-770.

Furuichi, M. and Y. Yone. 1971. Studies on nutrition of red sea bream. 4. Nutritive value of dietary carbohydrate. Rep. Fish. Res. Lab. Kyushu Univ., 1: 75-81.

Furuichi, M; Kitajima, C; Matsui, S; Yoshimatsu, T. and T. Tanabe. 1990. Vitamin C requirement of the red sea bream. *In:* Abstract of spring meeting of the Japanese Society of Scientific Fisheries. Japanese Society of Scientific Fisheries. Tokio. 39 p.

Gabaudan, J. and V. Verlhac. 2001. Critical review of the requirements of ascorbic acid in cold and cool water fishes (salmonids, percids, plecoglossids and flatfishes). *In:* Dabrowski, K. (Ed.). Ascorbic acid in aquatic organisms. CRC Press. U.S.A. 33-48 pp.

Gouillou-Coustans, M.F; Bergot, P. and S.J. Kaushik. 1998. Dietary ascorbic acid needs of common carp (*Cyprinus carpio*) larvae. *Aquaculture*, 161: 453-461.

Halver, J.E. 1972. The role of ascorbic acid in fish disease and tissue repair. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.*, 38: 79-92.

Helland, B. and S.J. Grisdale-Helland. 1998. Growth, feed utilization and body composition of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed diets differing in the ratio between the macronutrients. *Aquaculture*, 166: 49-56.

Hemre, G.I; Sandnes, K; Lie, Ø; Torrissen, O. and R. Waagbø. 1995. Carbohydrate nutrition in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., growth and feed utilization. *Aquaculture Nutrition*, 26: 149-154.

Hemre, G-I; Mommsen, T.P. and Å. Krogdahl. 2002. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition*, 8: 175-194.

Hemre, G.I; Lie, Ø. and A. Sundby. 1993. Dietary carbohydrate utilization in cod (*Gadus morua*): metabolic responses to feeding and fasting. *Fish Physiol. Biochem.*, 10: 455-463.

Hilton, J.W. and J.L. Atkinson. 1982. Responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to increased levels of available carbohydrate in practical trout diets. *Br. J. Nutr.*, 47: 595-607.

Hilton, J.W; Plisetskaya, E.M. and J.F. Leatherland. 1987. Does oral 3,5,3'-triiodo-L-thyronine affect dietary glucose utilization and plasma insulin levels in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Fish Physiol. Biochem.*, 4: 113-120.

Hoff, K.A. 1989. Survival of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio salmonicida* at different salinities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 1775-1786.

Kaushik, S.J. 2002. European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax*. In: Webster, C.D. and C. Lim (Eds.). Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. CABI Publishing. U.K. 28-39 pp.

Kojima, T. and H. Tokumitsu. 2005. Optimum dietary level of L-ascorbic acid for Japanese Eel, *Anguilla japonica*. J. World Aquaculture Soc., 36(4): 437- 443.

Krogdahl, Å; Sundby, A. and J.J. Olli. 2004. Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) digest and metabolize nutrients differently. Effects of water salinity and dietary starch level. Aquaculture, 229: 335-360.

Krogdahl, Å; Hemre, G-I. and T.P. Mommsen. 2005. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. Aquaculture Nutrition, 11: 103-122.

Lall, S.P; Olivier, G; Weerakoon, D.E.M. and J.A. Hines. 1989. The effect of vitamin C deficiency and excess on immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) In: Proceedings of the Third International Symposium on Feeding and Nutrition in Fish. Japan. 427-441 pp.

Lee, D.J. and G.B. Putnam. 1973. The response of rainbow trout to varying protein/energy ratios in a test diet. J. Nutr., 103: 916-922.

Lin, M.-F. and S.-Y. Shiau. 2005. Requirements of vitamin C (L-ascorbyl-2-sulphate and L-ascorbyl-2-polyphosphate) and its effects on non-specific immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. Aquaculture Nutrition, 11: 183-189.

Masumoto, T; Hosokawa, H. and S. Shimeno. 1991. Ascorbic acid's role in aquaculture nutrition. In: Akiyama, D.M. and R.K.H. Tan (Eds.). Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop. Thailand and Indonesia. 42-48 pp.

Mohapatra, M; Sahu, N.P. and A. Choudhari. 2003. Utilization of gelatinized carbohydrate in diets of *Labeo rohita* fry. *Aquaculture Nutrition*, 9: 189-196.

NRC. 1993. Nutrient Requirements of fish. Nutrient requirements of domestic animals. Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture, National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C. 114p.

Papp, Zs. Gy; Saroglia, M and G. Terova. 1998. An improved method for assay of vitamin C in sample series of fish feed and tissues. *Chromatographia*, 48(1/2): 43-47.

Pieper, A. and E. Pfeffer. 1980. Studies on the comparative efficiency of utilization of gross energy from some carbohydrates, proteins and fats by rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture*, 20: 323-332.

Phromkunthong, W; Boonyaratpalin, M. and V. Storch. 1997. Different concentrations of ascorbyl-2-monophosphate-magnesium as dietary sources of vitamin C for seabass, *Lates calcarifer*. *Aquaculture*, 151: 225-243.

Robinson, E.H. and M.H. Li. 2002. Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*. In: Webster, C.D. and C. Lim (Eds.). Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. CABI Publishing. U.K. 293-318 pp.

Rønnestad, I; Hamre, K; Lie, Ø. and R. Waagbø. 1999. Ascorbic acid and α -tocopherol levels before and after exogenous feeding. *Journal of Fish Biology*, 55: 720-731.

Sato, P. and S. Udenfriend. 1978. Scurvy-prone animals, including man, monkey and guinea pig, do not express the gene for gulonolactone oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 187: 158-162.

Sandholm, M; Smith, R.R; Shih, J.C.H. and M.L.Scott. 1976. Determination of anti-trypsin activity on agar plates: relationship between antitrypsin and biological value of soybean for trout. *J. Nutr.*, 106: 761-766.

Sato, M; Kondo, T; Yoshinaka, R. and S. Ikeda. 1983. Effect of water temperature on the skeletal deformity in ascorbic acid-deficient rainbow trout. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.*, 49: 443-446.

Shearer, K.D. 2000. Experimental design, statistical analysis and modeling of dietary nutrient requirement studies for fish: a critical review. *Aquaculture Nutrition*, 6: 91-102.

Shiau, S-Y. and T-S. Hsu. 1999. Quantification of vitamin C requirement for juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*, with L-ascorbyl-2-monophosphate-Na and L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg. *Aquaculture*, 175: 317-326.

Soliman, A.K; Jauncey, K. and R.J. Roberts. 1994. Water-soluble vitamin requirements of tilapia: ascorbic acid (Vitamin C) requirement of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture and Fisheries Management*, 25: 269-278.

Spannhof, L. and H. Plantikow. 1983. Studies on carbohydrate digestion in rainbow trout. *Aquaculture*, 30: 95-108.

Stephan, G; Dreanno, C; Guillaume, J. and J. Arzel. 1996. Incidence of different amounts of proteins, lipids and carbohydrates in diets on the muscle lipid composition in the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Ichthyophysiol. Acta*, 19: 11-30.

Stone, D.A.J; Allan, G.L. and A.J. Anderson. 2003a. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bydanus bydanus* (Mitchell). II. Digestibility and utilization of starch and its breakdown products. *Aquaculture Research*, 34: 109-121.

Stone, D.A.J; Allan, G.L. and A.J. Anderson. 2003b. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bydanus bydanus* (Mitchell). III. The protein-sparing effect of wheat starch-based carbohydrates. *Aquaculture Research*, 34: 123-134.

Wang, X; Kim, K; and S.C. Bai. 2002. Effects of different dietary levels of L-ascorbyl-2-polyphosphate on growth and tissue vitamin C concentrations in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture Research*, 33: 261-267.

Wang, X; Kim, K-W; Bai, S.C; Huh, M-D. and B-Y. Cho. 2003a. Effects of the different levels of dietary vitamin C on growth and tissue ascorbic acid changes in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Aquaculture*, 215: 203-211.

Wang, X; Kim, K-W; and S.C. Bai. 2003b. Comparison of L-ascorbyl-2-monophosphate-Ca and L-ascorbyl-2-monophosphate-Na/Ca on growth and tissue ascorbic acid concentrations in Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquaculture*, 225: 387-395.

Xie, Z. and C. Niu. 2006. Dietary ascorbic acid requirement of juvenile ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture Nutrition*, 12: 151-156.

CAPITULO 5

**EFFECTOS DEL NIVEL DE VITAMINA C DE LA DIETA SOBRE LAS
CONCENTRACIONES DE ACIDO ASCORBICO DEL HIGADO EN
JUVENILES DE PEZ BLANCO *Menidia estor* (Jordan 1880) SOMETIDOS A
ESTRÉS POR HIPOXIA AGUDA**

Resumen

Se elaboraron cuatro dietas isoenergéticas (≈ 2224 KJ/100g) en hojuelas, con diferentes niveles de vitamina C (L-Ascorbil-2-Polifosfato: AsPP) (15, 80, 100 y 650 mg Kg⁻¹) y se proporcionaron a juveniles de pez blanco de 1.3 ± 0.08 g de peso inicial. Los peces fueron alimentados a saciedad seis veces al día con las diferentes dietas, durante 90 días. Al cabo de los 90 días de alimentación, los peces de cada tratamiento se dividieron en dos grupos: un grupo problema y un grupo control, y se trasladaron a un sistema cerrado de recirculación donde los grupos problema se sometieron a hipoxia aguda ($\approx 40\%$ de saturación de oxígeno) y los grupos control a condiciones de normoxia durante una hora. Al cabo de este tiempo se restablecieron las condiciones de saturación de oxígeno (retorno a normoxia) en 35 minutos para los grupos problema, mientras que los grupos control permanecieron en condiciones de saturación de oxígeno, anotando la supervivencia de los peces durante este proceso. Al inicio y al final del experimento se tomaron muestras de peces para realizar mediciones de vitamina C en el hígado y determinar el índice hepatosomático (IHS). No se presentaron diferencias significativas de supervivencia entre los tratamientos ($p > 0.05$), después de someterlos a las condiciones de normoxia e hipoxia aguda. En los dos grupos de peces, a medida que se incrementó el nivel de vitamina C en la dieta, hubo mayor acumulación de ácido ascórbico total (AAT) en el hígado. Existe una tendencia a incrementar el contenido de vitamina C (AAT) hepática cuando los peces son sometidos a estrés por hipoxia aguda. Se presentó un cambio significativo en los valores del índice hepatosomático después de alimentar los peces con las diferentes dietas, pero no se presentaron diferencias significativas en estos valores entre los peces alimentados con las diferentes dietas, ni entre los peces de los grupos control y los de los grupos problema (estresados). Se concluye que el estrés por hipoxia aguda durante una hora y el retorno a normoxia durante 35 minutos, influyen en las concentraciones de ácido ascórbico total del hígado en juveniles de *M. estor*.

Palabras Clave: *Menidia estor*; estrés por hipoxia aguda; niveles de ácido ascórbico en hígado, índice hepatosomático.

Introducción

En la acuicultura existen muchas situaciones estresantes para los organismos cultivados tales como el manejo, transporte, confinamiento, y en algunos casos, una deteriorada calidad del agua, que pueden ocasionar respuestas al estrés. Por otro lado, en la acuicultura intensiva pueden ocurrir disminuciones agudas en las concentraciones de oxígeno disuelto en el agua, especialmente cuando los peces son mantenidos a altas densidades. Estos factores estresantes tienen influencia en el estado de salud de los peces y ocasionan que las reservas de micronutrientes del cuerpo dejen de cumplir las funciones fisiológicas esenciales, pues se hacen necesarias para la supervivencia inmediata. Uno de los principales efectos secundarios en las respuestas de un organismo al estrés es la inmunodepresión. Ante una situación de estrés, el pez reacciona secretando altos niveles de corticosteroides y catecolaminas (hormonas responsables de las respuestas al estrés), las cuales, además de ocasionar cambios fisiológicos importantes, son inmunodepresivas. Estas hormonas son producidas en las células interrenales y cromafines del riñón y normalmente su liberación está acompañada de un alto consumo de ácido ascórbico, por lo que se sugiere que esta vitamina participa en la síntesis de tales hormonas (Gabaudan and Verlhac, 2001).

Las bajas concentraciones de oxígeno (hipoxia) pueden afectar el crecimiento, el consumo de alimento y el estado fisiológico de los peces (Jobling, 1994). Las condiciones de hipoxia también afectan severamente la supervivencia de los peces, debido a que se afecta negativamente el metabolismo energético en el cerebro, hígado y tejido muscular (Van Raaij *et al.*, 1994). Se ha encontrado en la trucha que la hipoxia aguda ocasiona cambios fisiológico severos, comparados con peces mantenidos bajo condiciones de normoxia (Van Raaij *et al.*, 1996); dentro de estos cambios fisiológicos se encuentran una disminución en el CO₂ sanguíneo y un incremento en el nivel de glucosa de la sangre (Smit and Hattingh, 1978).

La hipoxia en el ambiente ocasiona en los peces reflejos ventilatorios y cardiovasculares inmediatos, para mantener la saturación del oxígeno arterial en su nivel óptimo, a pesar del

reducido gradiente de oxígeno a nivel de las branquias (Fritsche & Nilsson, 1993). La respuesta típica de un pez a la hipoxia consiste en un incremento en la tasa y amplitud de ventilación, además de bradicardia (disminución del ritmo cardiaco), procesos controlados por las catecolaminas (Maxime *et al.*, 1995). Cambios en los niveles de catecolaminas resultan en numerosos efectos fisiológicos, directos e indirectos, para permitir el incremento o el mantenimiento del flujo de energía y suministro de oxígeno (Randall & Perry, 1992). Las catecolaminas también actúan directamente sobre el hígado para estimular la glicogenólisis. Estas junto con el cortisol son responsables de la movilización de las reservas de energía mediante la activación de la glicogenólisis en el hígado y la inhibición de la glicólisis, lo cual resulta en un incremento moderado de la concentración de glucosa en el plasma (Donaldson, 1981; Maxime *et al.*, 1995). En humanos se ha demostrado que la vitamina C actúa como un donador de electrones para enzimas que participan en la biosíntesis de hormonas como las catecolaminas y que también está involucrada en la biosíntesis de corticosteroides (Levine *et al.*, 1996); al parecer en los peces también esta vitamina está involucrada en estos procesos de biosíntesis durante los períodos de estrés.

En algunos estudios se ha reportado la relación entre el estrés en los peces y los nutrientes de la dieta (Thompson *et al.*, 1993; Montero *et al.*, 1998). Montero *et al.*, (1999) concluyeron que la suplementación con vitaminas como el ácido ascórbico parece influir sobre las repuestas de juveniles de dorada (*Sparus aurata*) sometidos a estrés de confinamiento, al prevenir la inmunodepresión que conlleva este estrés. Se ha encontrado que bajo condiciones de hipoxia, el ácido ascórbico cumple un papel preventivo contra el daño mitocondrial y consecuentemente en el mantenimiento de la integridad de la membrana (Dabrowski *et al.*, 2004). Al proporcionar altas dosis de vitamina C en la dieta, las reservas de ácido ascórbico son suficientes para satisfacer los cambios hormonales durante una situación de estrés, mantener la inmunocompetencia y permitir un crecimiento normal, por ello se ha sugerido que la vitamina C tiene un papel positivo en las respuestas al estrés (Fletcher, 1997; Gabaudan and Verlhac, 2001). También se ha reportado que la vitamina C mejora la resistencia a concentraciones bajas de oxígeno y a condiciones de estrés e infecciones bacterianas en camarones (Wang *et al.*; 1996; Merchie *et al.*, 1997).

Los factores ambientales que pueden causar una respuesta fisiológica, pueden afectar el requerimiento de ácido ascórbico. Thomas (1990) demostró que varios factores ambientales causan cambios en el estatus de ácido ascórbico de la lisa rayada (*Mugil cephalus*). Después de que los peces fueron sujetos a cambios en factores ambientales como la temperatura, salinidad y niveles de contaminantes, se observaron cambios en las concentraciones de ácido ascórbico de diferentes tejidos como las branquias, el riñón, el hígado y el cerebro. Sin embargo, según el autor, estos cambios fueron tejido-específicos, debido a que en unos tejidos puede incrementarse el nivel de vitamina C, en otros puede reducirse y en otros parece no haber cambios significativos.

El contenido de ácido ascórbico del hígado es usualmente considerado como un indicador del estatus de vitamina C (Hilton *et al.*, 1977; Gabaudan *et al.*, 1991; White *et al.*, 1993) y se ha descrito como un indicador fisiológico de estrés (Wedemeyer & Yasutake, 1977; Wedemeyer & McLeay, 1981; Thomas *et al.*, 1982; Thomas, 1990), debido a que se incrementa la demanda de esta vitamina durante las situaciones estresantes. Aún no es bien conocida la influencia del estatus del ácido ascórbico sobre la magnitud de los cambios en las concentraciones de ascorbato en tejidos vitales como el hígado, debido al estrés.

El presente estudio se llevó a cabo con el fin de evaluar las concentraciones de ácido ascórbico en el hígado de juveniles de pez blanco, *Menidia estor*, alimentados con diferentes niveles de vitamina C y su posible variación después de someterlos a estrés por hipoxia aguda.

Metodología

Peces experimentales

Se obtuvieron juveniles de pez blanco, *Menidia estor*, a partir de huevos en el Laboratorio de Nutrición y Acuicultura del Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo), Morelia, Michoacán, México.

Después de la eclosión, las crías fueron mantenidas con rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y nauplios de *Artemia franciscana* durante los primeros 30 días, al cabo de los cuales fueron destetadas y mantenidas con una dieta estándar (40% proteína, 10% lípidos) y *Artemia* hasta 15 días antes del experimento. Durante los 15 días previos al experimento, los peces fueron aclimatados al sistema experimental y se alimentaron con *Artemia* únicamente.

Dietas experimentales

Se elaboraron cuatro dietas isoenergéticas (≈ 2224 KJ/100g) en hojuelas, con diferentes niveles de vitamina C (L-Ascorbil-2-Polifosfato: AsPP) (15, 80, 100 y 650 mg Kg⁻¹), utilizando filetes de jurel (*Caranx* sp.) y huachinango (*Lutjanus* sp.), gónada de atún (*Thunnus* sp.) y calamar (*Loligo* sp.) como fuentes de proteína (Tabla 1). Para enriquecer las dietas se utilizó vitamina C estabilizada: L-Ascorbil-2-Polifosfato (AsPP), Rovimix® Stay-C® 35 (DSM Nutritional Products).

Los filetes, el calamar y las gónadas se molieron separadamente en un Molino de carne (Torrey®), y se homogenizaron con agua en una licuadora (Osterizer®). Posteriormente se pasaron por un homogenizador Power Gen® (Fisher Scientific®) hasta obtener una pasta líquida sin fibras. Aparte se preparó una emulsión con los aceites de maíz y de pescado, lecitina de soya y BHT (antioxidante), a la que se añadió posteriormente una mezcla de aglutinantes (goma arábica, suero de leche, alginato de sodio y carragenina, 5:1:1:1) disueltos en agua. Más tarde se mezcló la pasta con los demás ingredientes (emulsión de aceites con los aglutinantes, almidón, vitaminas, minerales) usando una mezcladora Hobart®, después de lo cual se obtuvo una pasta suave para obtener hojuelas. Las hojuelas se elaboraron manualmente, esparciendo la pasta en capas finas sobre papel plastificado con ayuda de una espátula y luego se secaron a 35° C durante 12 horas en un secador de aire forzado. Las hojuelas obtenidas de esta manera se quebraron manualmente, se pasaron por tamices de diferentes tamaños y se almacenaron en un congelador a -20° C hasta su uso. Se llevaron a cabo análisis de la composición proximal y del contenido de vitamina C de cada dieta (tablas 2 y 3).

Protocolo experimental

El experimento se llevó a cabo en dos etapas: la primera correspondió a la etapa de alimentación con las diferentes dietas y en la segunda, se sometieron los peces a estrés por hipoxia aguda.

Tabla 1. Composición de las dietas elaboradas. Los datos se expresan en g Kg⁻¹.

INGREDIENTE	D15	D80	D100	D650
Filete de jurel	246.6	246.6	246.6	246.6
Filete de Huachinango	108.6	108.6	108.6	108.6
Calamar	101.8	101.8	101.8	101.8
Gónada de atún	86.1	86.1	86.1	86.1
Almidón de maíz	226.2	225.8	225.6	221.9
Aceite de pescado	61.7	61.7	61.7	61.7
Aceite de maíz	46.9	46.9	46.9	46.9
Lecitina de soya	10.0	10.0	10.0	10.0
BHT	5.0	5.0	5.0	5.0
Premezcla de vitaminas ¹	40.0	40.0	40.0	40.0
Colina	1.0	1.0	1.0	1.0
Vitamina E	1.0	1.0	1.0	1.0
Vitamina C ²	0.11	0.54	0.67	4.40
Premezcla de minerales ¹	15.0	15.0	15.0	15.0
Mezcla de Aglutinantes ³	50.0	50.0	50.0	50.0

¹ Premezclas de vitaminas y minerales (DSM Nutritional Products).

² Vitamina C estabilizada: L-Ascorbil-2-Polifosfato (AsPP), Rovimix® Stay-C® 35 (DSM Nutritional Products).

³ Mezcla de cuatro aglutinantes; Goma arábiga : suero de leche : alginato de sodio : carragenina (5:1:1:1)

Tabla 2. Composición proximal de las dietas. Los datos se expresan en porcentaje del peso seco. (ELN: Extracto libre de nitrógeno).

Dieta	Proteína (%)	Lípidos (%)	Cenizas (%)	ELN* (%)	Humedad (%)	Energía (MJ/Kg)
D15	50.72	10.37	2.67	36.24	9.45	22.31
D80	52.49	10.40	2.81	34.30	9.82	22.40
D100	50.33	9.82	3.01	36.84	10.99	22.10
D650	50.54	10.24	3.44	35.78	10.47	22.13

* $ELN = 100 - (\%proteína + \%lípidos + \%cenizas + \%humedad)$

Tabla 3. Concentración de Vitamina C de las dietas experimentales

Dieta	Concentración de vitamina C (mg /Kg dieta)
D15	16.78
D80	78.25
D100	100.30
D650	658.60

Primera etapa: Alimentación de los peces

La alimentación de los peces se llevó a cabo en un sistema cerrado de recirculación consistente en 12 tanques (3 réplicas por cada dieta) de fibra de vidrio de 50 litros de capacidad (cada uno con aireación constante y un flujo continuo de agua de 1L / min.), un sedimentador y un filtro biológico. La temperatura del agua se mantuvo a $24.6 \pm 0.49^\circ$ C y la salinidad a 5.9 ± 0.95 g L⁻¹, con un fotoperíodo de 12L:12O. Los valores promedio de oxígeno disuelto, pH y nitritos fueron 6.2 ± 0.77 mg L⁻¹, 7.8 ± 0.25 y 0.05 ± 0.02 mg L⁻¹ respectivamente, mientras que los valores de amonio fueron no detectables.

Juveniles de pez blanco de 1.3 ± 0.08 g de peso promedio fueron colocados al azar en cada tanque, a una densidad de 1 pez/L y se alimentaron a saciedad seis veces al día con las cuatro diferentes dietas, durante 90 días. Al inicio del experimento se tomaron muestras de peces para medición de vitamina C en el hígado.

Segunda etapa: Tratamiento de hipoxia aguda

Al cabo de los 90 días de alimentación, se mezclaron los peces alimentados con las mismas dietas (es decir, se mezclaron los peces de las tres repeticiones de cada tratamiento), para tener un total de cuatro tanques, correspondientes a las cuatro dietas proporcionadas. Los peces de cada tanque se dividieron al azar en dos grupos: un grupo control y un grupo que sería sometido a hipoxia aguda, teniendo un total de 8 grupos (4 grupos control y 4 grupos de hipoxia aguda).

El sistema diseñado para evaluar el estrés por hipoxia constó de 8 tanques de 50 L de capacidad, con flujo continuo de agua de $1.5 \text{ L} / \text{min}$ ¹, un tanque elevado y un reservorio con aireación fuerte para mantener el agua a saturación de oxígeno; una bomba para agua marina de 0.5 caballos de fuerza, para mantener el sistema en recirculación y un tanque de Nitrógeno gaseoso conectado por mangueras a los tubos de alimentación de agua de los tanques (Figura 1).

Los ocho grupos se trasladaron al sistema cerrado de recirculación, donde permanecieron 3 semanas más en condiciones de saturación de oxígeno disuelto y se continuaron alimentando 3 veces al día con las diferentes dietas, para aclimatarlos al nuevo sistema experimental.

¹ Cuatro de los tanques correspondieron a los grupos control alimentados con las diferentes dietas y los otros cuatro a los grupos de hipoxia aguda alimentados con las diferentes dietas.

48 horas antes de someter los peces a la condición de estrés se dejaron de alimentar. Se sometieron luego 4 de los grupos a hipoxia aguda^{II} durante 1 hora. Al cabo de este tiempo se restablecieron las condiciones de saturación de oxígeno (retorno a normoxia) en 35 minutos. Mientras tanto, los grupos control permanecieron en condiciones de saturación de oxígeno (figura 2). Se anotó la supervivencia de los peces durante este proceso.

Posteriormente, una hora después del retorno a la normoxia, se tomaron muestras de peces, tanto de los grupos estresados, como de los grupos control, y se congelaron en nitrógeno líquido (-196° C), para realizar mediciones de vitamina C en el hígado. Las muestras se almacenaron en un ultracongelador a -80° C, hasta el momento del análisis.

Métodos analíticos

Análisis proximales (bromatológicos) de las dietas

Los análisis proximales de las dietas se llevaron a cabo utilizando métodos estándar (AOAC, 2000). La humedad se analizó mediante el secado de muestras a 105° C por 24 horas en una estufa de aire forzado; la proteína cruda (N x 6.25) por el método de Dumas (Ebling, 1968), utilizando un analizador de Nitrógeno (Leco FP-528); el extracto etéreo (lípidos) por extracción, utilizando una unidad de extracción automática Foss Tecator (2050 Soxtec Avanti); las cenizas por calcinación en una mufla a 550° C y el extracto libre de nitrógeno (carbohidratos) se calculó mediante la fórmula: $ELN = 100 - (\%proteína + \%lípidos + \%cenizas + \%humedad)$. Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

^{II} Las condiciones de hipoxia aguda se lograron inyectando nitrógeno gaseoso a un flujo de 1.4 L/min, con lo cual se bajó el Oxígeno disuelto de los tanques de 6.23 mg L⁻¹ (valor de saturación de oxígeno a una altitud de 1800 m.s.n.m.) a 2.46 mg L⁻¹ (≈40% de saturación).

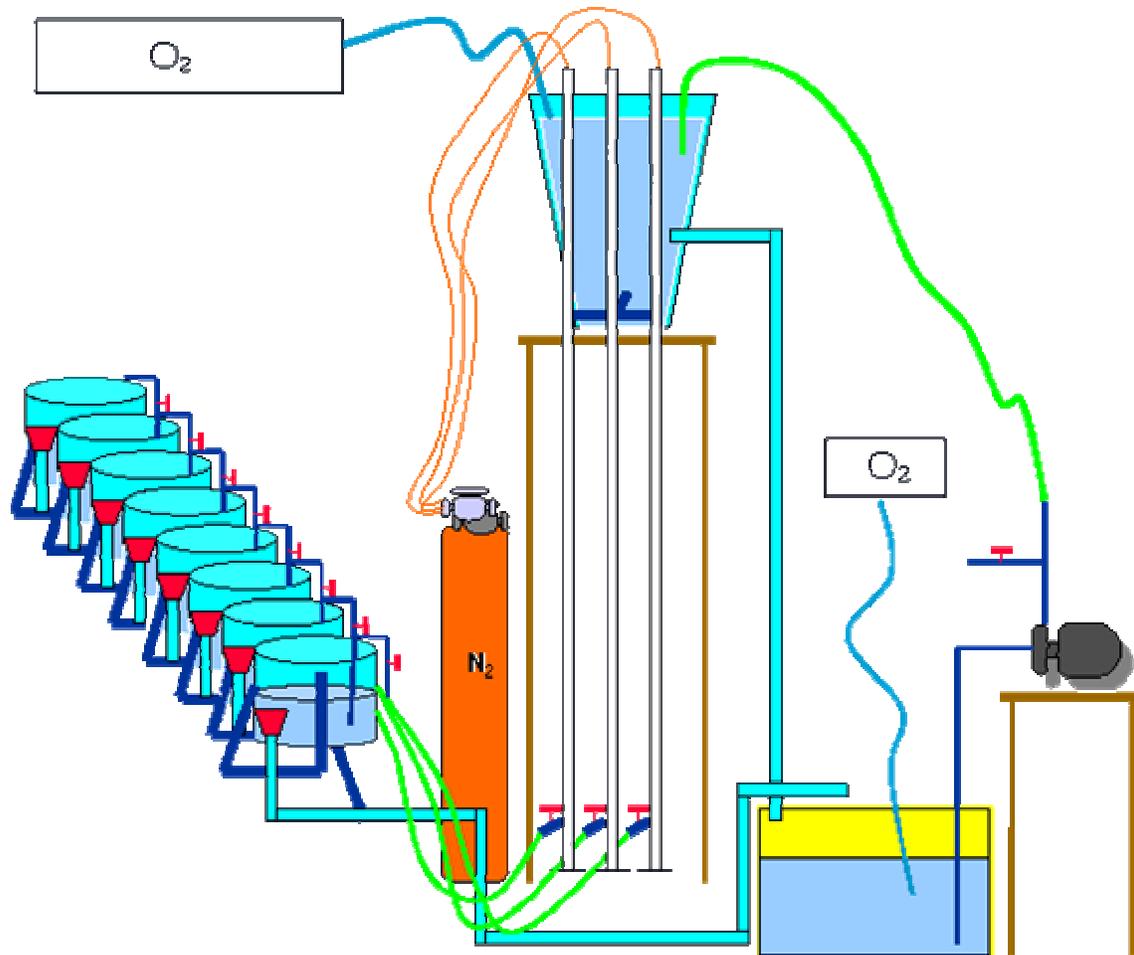


Figura 1. Sistema cerrado de recirculación de agua donde se sometieron los juveniles de *Menidia estor* a hipoxia aguda y normoxia.

La estimación de la energía de las diferentes dietas se calculó utilizando los valores típicos de energía para proteínas (23.60 kJ g^{-1}), lípidos (36.23 kJ g^{-1}) y carbohidratos (17.2 kJ g^{-1}) (NRC, 1993), multiplicándolos por el contenido de proteína, lípidos y carbohidratos de la dieta respectivamente.

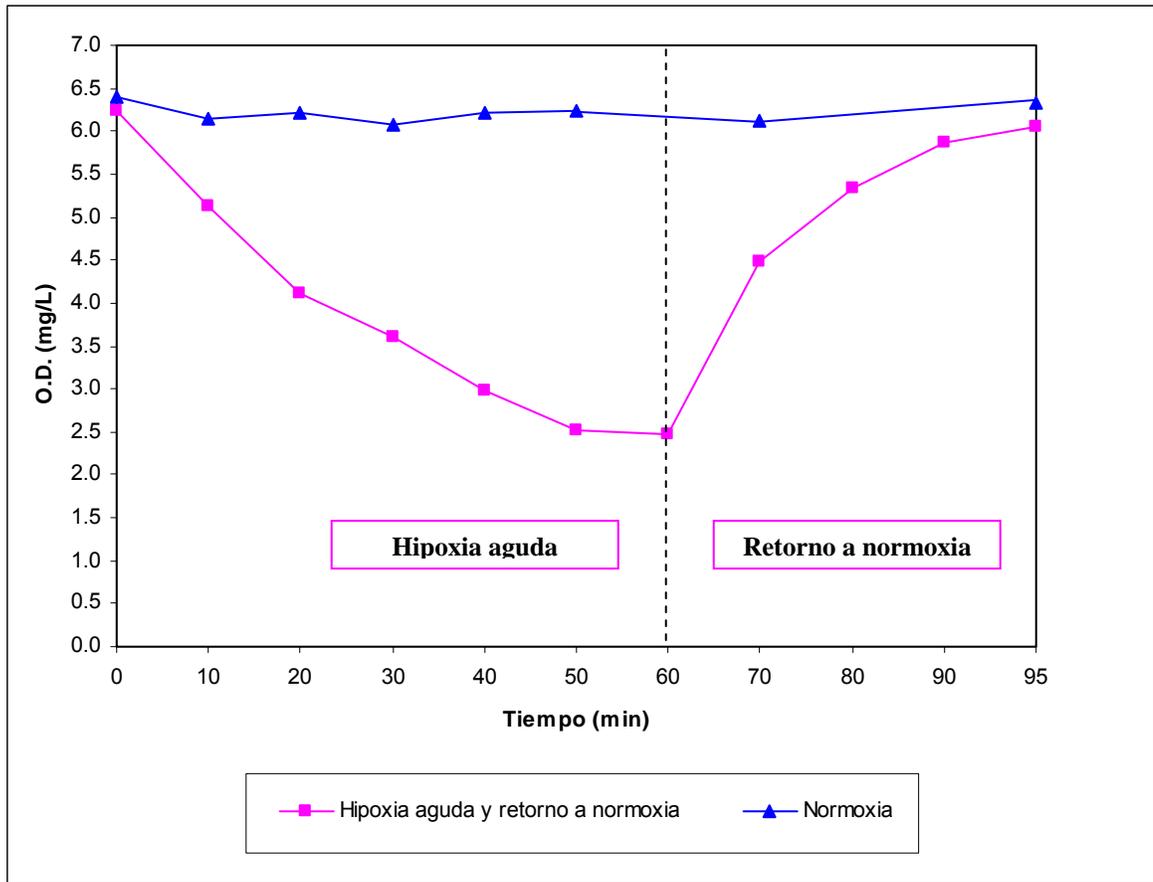


Figura 2. Tratamiento de hipoxia aguda a la que fueron sometidos los grupos problema, comparado con las condiciones de normoxia a las que fueron sometidos los grupos control.

Análisis de vitamina C

La cuantificación de ácido ascórbico total (AAT) en las muestras se llevó a cabo por HPLC, utilizando el método modificado por Papp *et al.* (1998). Los peces congelados fueron disectados en frío para extraer los hígados, utilizando como base una lámina de acero inoxidable sobre hielo. Los tejidos hepáticos extraídos se pesaron y homogenizaron en un buffer de acetato de sodio frío (pH 4.8). Los extractos se dividieron en dos partes: la primera para la detección de la línea base, tratándola con enzima ascorbato-oxidasa durante 30 minutos; la segunda para la detección de ácido ascórbico total, añadiendo 1,4-Ditioeritritol. Después de deproteinizar los extractos con ácido perclórico al 10%, se

inyectaron al cromatógrafo. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos (isocratic single column system, Agilent 1100 series) con un detector UV-visible y una columna Lichrosorb RP-18 (4.6 x 200mm, Agilent), utilizando la misma fase móvil. Las condiciones cromatográficas fueron: Flujo= 0.5 ml/min; Presión= 65 bar; Longitud de onda (Detector UV)= 254 nm; Temperatura= 23°C; Volumen de inyección= 2 µL. Los cromatogramas fueron evaluados utilizando el software ChemStation Plus (Agilent).

El análisis de ácido ascórbico del alimento utilizado se llevó a cabo de la misma manera descrita anteriormente, pero añadiendo la enzima fosfatasa ácida (Fosfohidrolasa Ortofosfórica-monoéster) para romper los enlaces fosfato.

Para todos los análisis se utilizaron reactivos ultrapuros de J.T. Baker (EUA), Fluka (Suiza), SIGMA (Alemania) y Aldrich (EUA), y para la filtración de buffers y homogenados se utilizaron filtros de membrana Durapore (Millipore) de 0.45 µm.

Análisis de datos

Con los datos de peso de peces e hígados se determinó el índice hepatosomático (IHS) de los peces sometidos cada tratamiento, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IHS (\%)} = [\text{peso del hepatopáncreas (g)} / \text{peso del pez (g)}] * 100$$

Los resultados obtenidos de supervivencia se sometieron a una prueba de Friedman^{III}, al no cumplir los supuestos de normalidad. Los datos del contenido de vitamina C de los hígados tampoco cumplieron los supuestos de normalidad por lo que se analizaron mediante una prueba de Scheirer-Ray-Hare^{IV}. Los valores de índice hepatosomático (IHS) sometieron a un análisis de varianza de dos vías con repetición. Los factores que se combinaron en cada análisis fueron el tratamiento de alimentación (contenido de vitamina C de la dieta) y el

^{III} Equivalente a un análisis de varianza de dos vías sin replicación (una observación para cada combinación de factores) (Dytham, 1999).

^{IV} Equivalente a un análisis de varianza de dos vías con replicación (varias observaciones para cada combinación de factores) (Dytham, 1999).

tratamiento de estrés (condiciones de hipoxia y normoxia). Todos los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico MINITAB (versión 13.32) (MINITAB INC).

Resultados

No se presentó mortalidad tanto en ninguno de los grupos control como en ninguno de los estresados, con excepción del grupo estresado del tratamiento D100, que presentó una mortalidad de 5.88% después de someter los peces a la condición de hipoxia aguda. Sin embargo no se presentaron diferencias significativas de supervivencia entre los tratamientos ($p > 0.05$).

Se observó un efecto marcado del nivel de vitamina C de la dieta sobre las concentraciones de la misma en el hígado de los juveniles de *M. estor*. Se presentaron diferencias significativas en el contenido de vitamina C del hígado entre los peces al inicio y al final del experimento ($p < 0.05$). A medida que se incrementó el nivel de esta vitamina en la dieta, hubo mayor acumulación de ácido ascórbico total (AAT) en el hígado (Figura 3), patrón que se observa tanto en los peces sometidos a normoxia como en los peces sometidos a hipoxia aguda. En general, se observa una tendencia a incrementar el contenido de vitamina C (AAT) hepática cuando los peces son sometidos a estrés por hipoxia aguda, sin embargo, si se observan la barras de error en la figura 3, parecería que estos cambios sólo fueran significativos en los peces alimentados con las dietas D80 y D100 ($p < 0.05$). Así, las concentraciones de AAT en el hígado pudieron haber sido afectadas por el nivel de vitamina C de la dieta y por los cambios en el nivel de oxígeno disuelto. No hubo una interacción entre los dos parámetros sobre la concentración de AAT en el hígado de los peces ($p > 0.05$).

Se presentó un cambio significativo en los valores del índice hepatosomático (IHS) después de alimentar los peces con las diferentes dietas. Como se puede observar en la tabla 4, existen diferencias significativas en estos valores entre los peces iniciales y los peces al final del experimento (tanto los grupos control como los estresados). No se presentaron

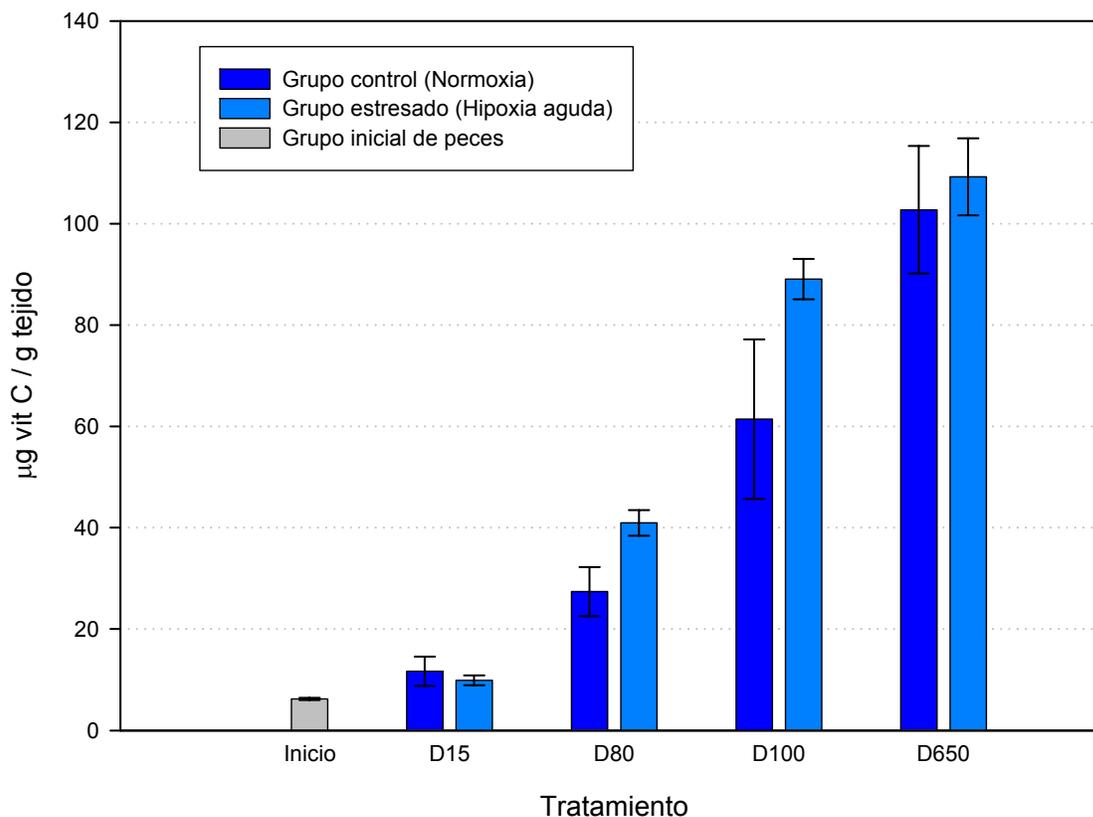


Figura 3. Concentraciones de ácido ascórbico total (AAT) ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (valores promedio \pm E.S., $n = 7$) en el hígado de los juveniles de *M. estor* al inicio (grupo inicial de peces) y al final del experimento (después de ser alimentados con las dietas a diferentes niveles de vitamina C (D15, D80, D100 y D650) y sometidos a condiciones de normoxia e hipoxia aguda.)

Tabla 4. Índices hepatosomáticos (IHS) de los peces sometidos a los diferentes tratamientos. Los datos se expresan como valores promedio \pm E.S. ($n = 7$).

Tratamiento	IHS (%)		
	Peces iniciales	Grupo Control	Grupo estresado
	1.08 \pm 0.04 ^b		
D15		2.67 \pm 0.40 ^a	3.38 \pm 0.56 ^a
D80		2.91 \pm 0.62 ^a	3.09 \pm 0.41 ^a
D100		2.94 \pm 0.32 ^a	3.53 \pm 0.33 ^a
D650		3.47 \pm 0.58 ^a	3.59 \pm 0.24 ^a

Valores con el mismo superíndice no presentan diferencias significativas entre grupos.

diferencias significativas en estos valores entre los peces alimentados con las diferentes dietas, ni entre los peces del grupo control y los del grupo estresado. Tampoco hubo una interacción significativa entre el nivel de vitamina C de la dieta y el tratamiento de estrés sobre el IHS de los peces.

Discusión

Como se observa, las concentraciones de ácido ascórbico (AA) en el hígado de los juveniles de pez blanco están relacionadas positivamente con las concentraciones de AA de la dieta, al igual que se ha encontrado en otras especies (Lim & Lovell, 1978; Sato *et al.*, 1978; Dabrowski *et al.*, 1990; Dabrowska *et al.*, 1991; Cho & Cowey, 1993; Thompson *et al.*; 1993; Henrique *et al.*, 1998; Shiau & Hsu, 1999; Wang *et al.*, 2003; Dabrowski *et al.*, 2004). Estos niveles de AA incorporados en el hígado evidencian claramente la biodisponibilidad del L-Ascorbil-2-Polifosfato (AsPP) para el pez blanco.

Los resultados indican que la hipoxia aguda a la que fueron sometidos los juveniles de *M. estor* pudo haber sido un factor estresante que ocasionó una respuesta fisiológica, evidente en el cambio de las concentraciones de ácido ascórbico del hígado de los peces alimentados con las dietas D80 y D100, lo cual sugiere que esta vitamina puede cumplir un papel en relación a la respuesta fisiológica al estrés en estos peces. La reducción en las concentraciones de vitamina C, particularmente en el hígado y el riñón se ha descrito como un indicador de estrés fisiológico (Wedemeyer & Yasutake, 1977; Wedemeyer & McLeay, 1981; Thomas *et al.*, 1982; Thomas, 1990). Sin embargo, en el presente estudio el ácido ascórbico hepático mostró una tendencia incrementarse en los peces estresados en comparación con el grupo control.

Al someter a *S. aurata* a hipoxia durante 6 horas Henrique, *et al* (1998) encontraron incrementos en los niveles de ascorbato del bazo. Según los autores, dichos incrementos se deben a la captura y liberación de leucocitos por parte del bazo, los cuales son las células con mayor contenido de ácido ascórbico del cuerpo. Es posible que una de las causas del

incremento en los niveles de ascorbato del hígado de los juveniles de *M. estor* se deba a un mayor flujo de sangre, y con esto un mayor flujo de leucocitos hacia este órgano, como una respuesta fisiológica al estrés. Como se mencionó anteriormente, ante situaciones de estrés como la hipoxia, existen cambios en los niveles de catecolaminas, que resultan en numerosos efectos fisiológicos, directos e indirectos, para permitir el incremento o el mantenimiento del flujo de energía y suministro de oxígeno (Randall & Perry, 1992). Las catecolaminas pueden tener efectos sobre las arterias que distribuyen la sangre a los tejidos; estos vasos sanguíneos responden a variedad de estímulos contráctiles y están controlados en parte por nervios catecolaminérgicos, lo cual puede afectar el flujo sanguíneo entre los tejidos y dentro de los mismos (Olson, 1998). Por otro lado, los peces tienen centros melanomacrófagos a lo largo de todo el cuerpo, pero están concentrados en el bazo, el hígado y los riñones, y se supone que son sitios de presentación de anticuerpos. Muchos tipos de estrés (ya sea agudo o crónico), en general causan un incremento rápido en los neutrófilos circulantes (Wendelaar-Bonga, 1997). Así el incremento del flujo sanguíneo hacia el hígado podría verse acompañado de un mayor flujo de neutrófilos, y consecuentemente de un aporte de vitamina C. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren entonces que la hipoxia aguda puede inducir una movilización de vitamina C hacia el hígado.

Bajo ciertas situaciones de estrés, tanto el cortisol como las catecolaminas se incrementan concurrentemente. Las catecolaminas tienen dos tipos de receptores: los α -adrenoceptores y los β -adrenoceptores. Cuando las catecolaminas actúan sobre los primeros causan vasoconstricción, mientras que al actuar sobre los segundos causan vasodilatación. El aumento de los niveles de cortisol en el plasma, incrementa la respuesta de las células sanguíneas y vasculares a las catecolaminas circulantes, debido a que el número de β -adrenoceptores de la superficie de estas células se incrementa. Se ha demostrado que durante la hipoxia aguda, el número de β -adrenoceptores en las células se incrementa rápidamente, las cuales responden al nivel de catecolaminas, ocasionando vasodilatación (Perry and Reid, 1993).

Existe evidencia de vasodilatación en las branquias y el tejido muscular debida al incremento en el nivel circulante de catecolaminas bajo situaciones de estrés como la hipoxia aguda (Bergman *et al.*, 1974; Payan and Girard, 1977; Kiessling *et al.* 1983) y recientemente se ha identificado una elevación similar de los β -adrenoceptores por el cortisol y un aumento en la respuesta a las catecolaminas en los hepatocitos de la trucha (Perry and Reid, 1993). Así, en el presente estudio, el incremento de vitamina C encontrado en el hígado después de someter a los peces a hipoxia aguda, pudo deberse a que hubiera vasodilatación hepática y con ello un incremento del flujo sanguíneo hacia el hígado, como respuesta a las catecolaminas.

En estudios de las respuestas *in vivo* del hígado a estrés crónico por hipoxia, llevados a cabo en la carpa común (*Cyprinus Carpio*), Randall *et al.* (2007) encontraron daño extensivo del ADN durante los primeros días de exposición a tales condiciones, después de los cuales el daño empezó a reducirse debido a la reparación del ADN mediante mecanismos celulares. Varios autores sugieren que la vitamina C cumple un papel en la regulación de las enzimas responsables de la reparación del ADN y en la prevención del daño oxidativo del material genético, demostrando su efecto antioxidante (Cooke *et al.*; 1998; Attri, 2003; Franke, 2005). Como se ha observado en la carpa común, en el hígado, las repuestas a la hipoxia pueden ocurrir rápidamente, en términos de horas (Hung *et al.*; 2007); esto nos hace pensar que el estrés por hipoxia aguda podría causar tales efectos de daño en el ADN en el hígado de *M. estor* y que el incremento en los niveles de vitamina C hepáticos pudieran responder a la necesidad de esta vitamina para prevenir el daño oxidativo y la reparación del ADN dañado en el hígado. Sin embargo para poder afirmarlo, se requiere realizar más estudios que confirmen esta hipótesis.

Henrique *et al.* (1998) no obtuvieron cambios notables en los niveles de ascorbato del hígado en juveniles de dorada (*Sparus aurata*), sometidos a estrés por hipoxia durante 24 horas. Según los autores, la participación del ácido ascórbico hepático en las respuestas al estrés depende del tipo de estrés al cual están sujetos los peces. Por ejemplo, en peces de la misma especie, sometidos a estrés por confinamiento agudo durante tres horas en aguas poco profundas, se observó un decrecimiento en las concentraciones de AA hepáticas,

mientras que peces sometidos a un ambiente hiposalino durante 24 horas, no presentaron cambios significativos en los niveles de ascorbato del hígado (Henrique *et al.*, 1996). Thomas *et al.* (1982) también observaron reducción en los niveles de ascorbato hepáticos de la lisa rayada (*Mugil cephalus*) sometida a estrés por altas concentraciones de cadmio. Otros tipos de estrés agudo como el manejo y el confinamiento parecen no estar relacionados con los cambios en las concentraciones de vitamina C del hígado, como lo han encontrado Dabrowska *et al.* (1991) y Thompson *et al.* (1993) en la carpa común (*Cyprinus Carpio*) y el salmón atlántico (*Salmo salar*).

Cuando se sometieron individuos de *M. estor* a estrés agudo por transporte (Capítulo 1) se observó una tendencia similar a la encontrada en el presente estudio. Aunque dicha tendencia a incrementar los niveles de ácido ascórbico total (AAT) en el hígado después del estrés no fue significativa, existió un incremento significativo en los niveles hepáticos de ácido L-ascórbico (AA) en los machos sometidos a estrés (en las hembras este incremento no fue significativo). Estos resultados sugieren que bajo condiciones de estrés agudo de transporte e hipoxia, la vitamina C se moviliza hacia el hígado a través del torrente sanguíneo, pero aún no es claro, si el incremento de ascorbato hepático se deba a una necesidad mayor de la vitamina en este órgano o al mayor flujo de Leucocitos en si. Adicionalmente, es importante tener en cuenta que estos cambios pueden variar de acuerdo al sexo de los peces.

Wang *et al.* (2002) encontraron diferencias significativas en los valores del índice hepatosomático (IHS) del lenguado *Paralichthys olivaceus*, después de 12 semanas de alimentación con dietas a diferentes niveles de vitamina C; el IHS se incrementó significativamente con el nivel de vitamina C de la dieta. Henrique, *et al* (1996) y Bai (2001) encontraron resultados similares en la dorada (*Sparus aurata* L.) y el pez roca (*Sebastes schlegeli*). Sin embargo, en el presente estudio, a pesar de que los valores de IHS de los juveniles de pez blanco alimentados con los diferentes niveles de vitamina C mostraron una ligera tendencia a incrementarse con el nivel de ascorbato de la dieta, no se presentaron diferencias significativas.

No obstante, si hubo incrementos significativos en los valores de IHS entre los peces al inicio del experimento y los peces después de ser alimentados con las dietas (Tabla 4). También se observó una marcada diferencia en la coloración y la textura del hígado en todos los peces al final del experimento, con respecto a los peces iniciales. Los peces al inicio tenían hígados normales de coloración rojiza y de textura suave, mientras que los peces sometidos a los diferentes tratamientos mostraron hígados muy grandes, de coloración pálida y textura dura, que dificultaba la preparación de muestras para la evaluación del ácido ascórbico. Esto pudo deberse al alto contenido de carbohidratos de las dietas. Varios estudios muestran que altos niveles de carbohidratos en la dieta ocasionan un debilitamiento en la función del hígado, además de que se observan un hígado pálido o amarillento y un incremento en el tamaño del mismo. (Austreng *et al.*, 1977; Hilton, 1982; Bæverfjord, 1992).

Henrique, *et al* (1998) encontraron cambios leves en el IHS con el estrés, más aparentes en peces alimentados con dietas no suplementadas con vitamina C, pero no fueron significativamente diferentes. Estos cambios pueden explicarse por los cambios transitorios del flujo sanguíneo del hígado, como consecuencia de la respuesta fisiológica al estrés. Un patrón similar se obtuvo con los juveniles de pez blanco en el presente estudio, aunque los peces sometidos a estrés presentaron variaciones leves en los valores de IHS, estas no fueron significativas.

Dabrowska *et al.* (1991) encontraron en la carpa común, *Cyprinus Carpio*, que la forma de ácido ascórbico utilizada como suplemento en las dietas, juega un papel crítico en la respuesta al estrés, por ejemplo en la reducción o el incremento de la concentración de ascorbato en los tejidos. En el presente estudio sólo se utilizó como fuente de ácido ascórbico la forma estable L-Ascorbil-2-Polifosfato (AsPP), para comprobar si en *M. estor* la forma de ácido ascórbico utilizada en la dieta ofrece diferentes respuestas en las concentraciones de vitamina C del hígado, sería necesario realizar estudios posteriores con diferentes formas de la vitamina.

Se concluye que el estrés por hipoxia aguda durante una hora causa respuestas fisiológicas en los juveniles de pez blanco, evidentes en los cambios en las concentraciones de ácido ascórbico del hígado. Es evidente la necesidad de realizar más evaluaciones de las respuestas fisiológicas al estrés del pez blanco, en las cuales se tengan en cuenta más indicadores que permitan tener una idea más clara de las reacciones de estos peces ante situaciones de estrés comunes en la acuicultura.

Referencias

A.O.A.C. 2000. Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 17TH EDITION. Washington, E.U.A. 1018 p.

Attri, J; Dhawan, V; Mahmood, S; Pandhi, P; Parwana, H.K. and N. Ravinder. 2003. Effect of Vitamin C Supplementation on Oxidative DNA Damage in an Experimental Model of Lead-Induced Hypertension. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 47: 294-301.

Austreng, E; Risa, S; Edwards, D.J. and H. Hvidsten. 1977. Carbohydrate in rainbow trout diets. II. Influence of carbohydrate levels on chemical composition and feed utilisation of fish from different families. *Aquaculture*, 11: 39-50.

Bæverfjord, G. 1992. Digestible and indigestible carbohydrates in rainbow trout diets. III: Effects on growth, digestibility, pancreatic hormones, liver glycogen deposition and liver morphology. Ph D Thesis. Norwegian College of Veterinaty Medicine. Oslo, Norway.

Bai, S.C. 2001. Requirements of L-ascorbic acid in viviparous marine teleost, Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). In: Dabrowski, K. (Ed.). *Ascorbic acid in aquatic organisms*. CRC Press. U.S.A. 69-85 pp.

Bergman, H.L; Olson, K.R. and P.O. Fromm. 1974. The effects of vasoactive agents on the functional surface area of isolated perfused gills of rainbow trout. *J. Comp. Physiol.*, 94: 267-286.

Cooke, M.S; Evans, M.D; Podmore, I.D; Herbert, K.E; Mistry, N; Mistry, P; Hickenbotham, P.T; Hussieni, A; Griffiths, H.R. and J. Lunec. 1998. Novel repair action of vitamin C upon *in vivo* oxidative DNA damage. FEBS Letters, 439(3): 363-367.

Dabrowska, H; Dabrowski, K; Meyer-Burgdorff, K; Hanke, H. and K.-D. Gunther. 1991. The effect of large doses of vitamin C and magnesium on stress responses in common carp, *Cyprinus carpio*. Comp. Biochem. Physiol., 99A(4): 681-685.

Dabrowski, K; Lee, K.-J; Guz, L; Verlhac, V. and J. Gabaudan. 2004. Effects of dietary ascorbic acid on oxygen stress (hypoxia or hyperoxia), growth and tissue vitamin concentrations in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 233: 383-392.

Dytham, C. 1999. Choosing and using statistics. A biologist's guide. Blackwell Science. U.K. 218 p.

Ebling, M.E. 1968. The Dumas method for nitrogen in feeds. Journal of Association of Official Analytical Chemists, 51: 766-770.

Fletcher, T.C. 1997. Dietary effects on stress and health. *In: Iwama, G.K; Pickering, A.D; Sumpter, J.P. and C.B. Schreck (Eds.). Fish stress and health in aquaculture.* Cambridge Univ. Press. Cambridge. 223-246 pp.

Franke, S.I; Pra, D; da Silva, J; Erdtmann, B. and J.A. Henriques. 2005. Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ and CuSO₄ in mouse blood cells *in vivo*. Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 583(1): 75-84.

Fritsche, R. and S. Nilsson. 1993. Cardiovascular and ventilatory control during hypoxia. *In:* Rankin, J.C. and F.B. Jensen (Eds.). Fish ecophysiology. Chapman & Hall, London. 180-206 pp.

Gabaudan, J; Meier, W; Verlhac, V. and T. Wahli. 1991. Influence of the dietary source and dosage of vitamin C in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) metabolism, histology and immunity. *In:* Wenk, C; Fenster, R. and L. Völker (Eds.). Ascorbic acid in domestic animals. Kartause Ittigen, Switzerland. 357-377 pp.

Gabaudan, J. and V. Verlhac. 2001. Critical review of the requirements of ascorbic acid in cold and cool water fishes (salmonids, percids, plecoglossids and flatfishes). *In:* Dabrowski, K. (Ed.). Ascorbic acid in aquatic organisms. CRC Press. U.S.A. 33-48 pp.

Henrique, M.M.F; Morris, P.C. and S.J. Davies. 1996. Vitamin C status and physiological response of the gilthead seabream, *Sparus aurata* L., to stressors associated with aquaculture. *Aquaculture Research*, 27: 405-412.

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

Hilton, J.W. 1982. The effect of pre-fasting diet and water temperature on liver weight on rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, during fasting. *J. Fish. Biol.*, 20: 69-78.

Hilton, J. W; Cho, C.Y. and S.J. Slinger. 1977. Evaluation of the ascorbic acid status of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board Can.* 34: 2207-2210.

Hung, C.C.Y; Cossins, A.R; Gracey, A.Y. and D.J. Randall. 2007. Gene expression profiles of common carp, *Cyprinus carpio*, during prolonged starvation and hypoxia reflect differences in hypometabolism. *In:* Brauner, C; Suvajdzic, K; Nilsson, G. and D. Randall (Eds.). Fish physiology, toxicology and water quality. Proceedings of the Ninth International Symposium, Capri, Italy, April 24-28, 2006. Ecosystems Research Division. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC. 139-150 pp.

Jobling, M. 1994. Fish Bioenergetics. Chapman & Hall. Fish and Fisheries Series 13. First Edition. Great Britain. 309 p.

Kiessling, A; Pärt, P; Ring, O. and K. Lindahl-Kiessling. 1983. Effects of PCB on the adrenergic response in perfused gills and on levels of muscle glycogen in Rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 31: 712-718.

Levine, M; Rumsey, S; Wang, Y; Park, J; Kwon, O. Xu, W. and N. Amano. 1996. Vitamin C. In: Ziegler, E.E. and Filer, L.J. (eds.). Present knowledge in nutrition. 7th edition. Washington D.C. ILSI Press. 149-159 pp.

Maxime, V; Nonnotte, G; Peyraud, C; Williot, P. and J.P. Truchot. 1995. Circulatory and respiratory effects of an hypoxic stress in the Siberian sturgeon. Respiration Physiology, 100: 203-212.

Merchie, G; Lavens, P. and P. Sorgeloos. 1997. Optimization of dietary vitamin C in fish and crustacean larvae: a review. Aquaculture, 155: 165-181.

Montero, D; Tort, L; Izquierdo, M.S; Robaina, L. and J.M. Vergara. 1998. Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead seabream caused by α -tocopherol and *n*-3 HUFA dietary deficiencies. Fish Physiol. Biochem., 18: 399-407.

Montero, D; Marrero, M; Izquierdo, M.S; Robaina, L; Vergara, J.M. and L. Tort. 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. Aquaculture, 171: 269-278.

NRC. 1993. Nutrient Requirements of fish. Nutrient requirements of domestic animals. Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture, National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C. 114 p.

Olson, K.R. 1998. The cardiovascular system. *In:* Evans, D.H. (Ed.). The physiology of fishes. Second edition. CRC Press, USA. 129-154 pp.

Papp, Zs. Gy; Saroglia, M and G. Terova. 1998. An improved method for assay of vitamin C in sample series of fish feed and tissues. *Chromatographia*, 48(1/2): 43-47.

Payan, P and J.P. Girard. 1977. Adrenergic receptors regulating patterns of blood flow through the gills of trout. *Am. J. Physiol.*, 232: 18-23.

Perry, S.F. and S.D. Reid. 1993. β -adrenergic signal transduction in fish: interactive effects of catecholamines and cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry*, 11(1-6): 195-203.

Smith, G.L. and J. Hattingh. 1978. The effect of respiratory stress on carp haemoglobin. *Comp. Biochem. Physiol.*, 59A: 369-374.

Randall, D.J. and S.F. Perry. 1992. Catecholamines. *In:* Hoar, W.S; Randall, D.J. and A.P. Farrell (Eds.). *Fish Physiology*, Vol. XII, part B. Academic Press, San Diego. 255-300 pp.

Randall, D.J; Poon, W.L. Hung, C.C.Y. and T.K.N. Tsui. 2007. Hipoxia in fish. *In:* Brauner, C; Suvajdzic, K; Nilsson, G. and D. Randall (Eds.). *Fish physiology, toxicology and water quality. Proceedings of the Ninth International Symposium, Capri, Italy, April 24-28, 2006.* Ecosystems Research Division. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC. 133-137 pp.

Shiau, S.-Y. and T.-S. Hsu. 1999. Quantification of vitamin C requirement for juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*, with L-ascorbyl-2-monophosphate-Na and L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg. *Aquaculture*, 175: 317-326.

Thomas, P; Bally, M. and J.M. Neff. 1982. Ascorbic acid status of mullet, *Mugil cephalus* Linn., exposed to cadmium. *J. Fish. Biol.*, 20: 183-196.

Thomas, P. 1990. Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring. *Am. Fish. Soc. Symp.*, 8: 9-28.

Thompson, I; White, A; Fletcher, T.C; Houlihan, D.F. and C.J. Secombes. 1993. The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets containing different amounts of vitamin C. *Aquaculture*, 114: 1-18.

Van Raaij, M.T.M; Bakker, E; Nieven, M.C; Zirkzee, H. and G.E.E.J.M. van den Thillart. 1994. Energy status and free fatty acid patterns in tissues of common carp (*Cyprinus Carpio* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.) during severe oxygen restriction. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109A: 755-767.

Van Raaij, M.T.M; Pit, D.S.S; Balm, P.H.M; Steffens, A.B. and G.E.E.J.M. van den Thillart. 1996. Stress response in rainbow trout exposed to severe hypoxia. *Horm. Behav.*, 30: 85-92.

Wang, A.L; Mu, X.Q. and L.Y. Li. 1996. The study of optimization of dietary vitamin C in *Penaeus chinensis*. *Oceanol. Limnol. Sinia*, 27: 272-368.

Wang, X; Kim, K. and S.C. Bai. 2002. Effects of different dietary levels of L-ascorbyl-2-polyphosphate on growth and tissue vitamin C concentrations in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture Research*, 33: 261-267.

Wang, X; Kim, K.-W. and S.C. Bai. 2003. Comparison of L-ascorbyl-2-monophosphate-Ca with L-ascorbyl-2-monohosphate-Na/Ca on growth and tissue ascorbic acid concentrations in Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquaculture*, 225: 387-395.

Wedemeyer, D.A. and D.A. McLeay. 1981. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. *In: Pickering, A.D. (Ed.). Stress and Fish.* Academic Press, London. 247-275 pp.

Wedemeyer, D.A. and W.T. Yasutake. 1977. Clinical methods for the assessment of the effects of environmental stress on fish health. Technical Paper N° 89. US Fish and Wildlife Service, Washington, D.D. 18 p.

Wenderlaar-Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77(3): 591-625.

White, A; Fletcher, T.C; Secombes, C.J. and D.F. Houlihan. 1993. The effect of different dietary levels of vitamins C and E on their tissue levels in the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *In: Kausnik, S.J. and P. Luquet (Eds.). Fish nutrition in practice.* Biarritz, France. INRA Editions, Les Colloques. 203-207 pp.

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

Discusión general

De acuerdo a los resultados obtenidos, se pudo observar que la vitamina C juega un papel importante tanto en el crecimiento y la supervivencia, como en el desempeño reproductivo y las respuestas al estrés en *Menidia estor*. Sin embargo, debido al grado de dificultad del manejo de estos peces, aún quedan muchas preguntas por responder acerca del papel que tiene esta vitamina en el desempeño en cultivo de esta especie.

Con el presente trabajo se tiene una idea de cómo está distribuida la vitamina C en los tejidos del pez blanco al igual del estatus de la misma en los organismos, al cual los peces no muestran signos de deficiencia. En adultos silvestres con niveles hepáticos de AAT de 25.9 $\mu\text{g/g}$ en hembras y 46.2 $\mu\text{g/g}$ en machos, no se encontraron signos de deficiencia (capítulo 1). Sin embargo, al observar los niveles de ascorbato en el hígado de los peces alimentados con *Artemia* enriquecida, concentraciones hepáticas menores a los 10 $\mu\text{g/g}$ tampoco se asociaron signos de deficiencia (capítulo 2). Puede pensarse que la vitamina C proporcionada a través de la *Artemia* con mayores niveles de enriquecimiento, fue suficiente para un crecimiento y supervivencia óptimos, pero no para acumular mayores cantidades de AAT en el hígado, mientras que los adultos silvestres tuvieron una fuente de vitamina C suficiente para el crecimiento y para una acumulación mayor de la vitamina en este órgano. Por otro lado, en juveniles alimentados con dietas artificiales si se observó una acumulación de AAT en el hígado, que fue en incremento con el aumento de vitamina C en la dieta (capítulo 5). No obstante, en este caso los niveles de ascorbato de la dieta causaron mejoras en el crecimiento y la supervivencia mucho menores a las obtenidas con el alimento vivo. Como se mencionó en el capítulo 3, Hilton *et al.* (1978) encontraron que la trucha arco iris mantiene relativamente constantes los niveles de AA hepáticos al alimentarla con dietas suplementadas con 80 a 320 mg AA Kg^{-1} , pero si se proporcionan niveles de Vitamina C, 12 veces el requerimiento para un crecimiento normal, la vitamina C del hígado se incrementa más del doble. Teniendo en cuenta que los niveles de ascorbato de las dietas artificiales no fueron mucho mayores a los incluidos en la *Artemia*, se evidencia que el alimento vivo ofrece mejores resultados que el artificial. Puede ser que,

debido al exceso de carbohidratos o a posibles deficiencias de las dietas preparadas, la vitamina C no se utilizara en la misma proporción para el crecimiento, ocasionando su acumulación.

Según Moreau & Dabrowski (1998), en peces que no son capaces de sintetizar el ácido ascórbico, los niveles de ascorbato en las gónadas generalmente sobrepasan los del hígado y el riñón, mientras que en peces que sintetizan la vitamina C los niveles de ascorbato en las gónadas son similares o menores que en estos órganos. Como se observa en el capítulo 1, los niveles de AAT de las gónadas tanto de hembras como machos, fueron mucho mayores a los encontrados en el hígado. Estos resultados, aunados a los demás encontrados en este trabajo, sugieren que *Menidia estor* es un pez que no puede sintetizar *de novo* la vitamina C. Sin embargo para poder afirmar esta aseveración sería necesario evaluar si poseen la enzima L-gulonolactona-oxidasa, responsable de la síntesis del ácido ascórbico a partir de la glucosa (Burns *et al*, 1956; Sato and Udenfriend, 1978; Chatterjee, 1978; Webster and Lim, 2002).

Al comparar los niveles de AAT de las gónadas entre hembras y machos silvestres (capítulo 1) no se presentaron diferencias significativas, mientras que en adultos mantenidos en el laboratorio y alimentados con *Artemia* enriquecida (capítulo 2) se observaron concentraciones de AAT significativamente mayores en las gónadas de las hembras que en las de los machos. Es importante anotar que los adultos silvestres estaban inmaduros, mientras que los mantenidos en el laboratorio se encontraban maduros. Este es un aspecto muy importante a tener en cuenta a la hora de hacer comparaciones. Por ello, se hace necesario evaluar las concentraciones de AAT en adultos silvestres maduros y en adultos mantenidos en laboratorio inmaduros, para tener una mejor idea de las diferencias en las concentraciones de AAT de las gónadas entre organismos silvestres y en cautiverio, en relación al estadio de madurez.

Con el trabajo realizado se constató que niveles de vitamina C en la dieta de $117 \mu\text{g g}^{-1}$ (peso seco), no ocasionan signos de deficiencia en los reproductores de pez blanco y fueron suficientes para un crecimiento normal. Al proporcionar niveles de ascorbato de 180

$\mu\text{g g}^{-1}$ (peso seco) se ocasionaron mejoras en el % de huevos oculados y las tasas de eclosión del primer desove, pero no hubo una diferencia significativa en la acumulación de AAT en las gónadas, ni una mejora contundente en el desempeño reproductivo. Es necesario realizar estudios posteriores en los que se incluyan niveles mayores de vitamina C en la dieta de los reproductores para observar si hay mejoras sustanciales en la reproducción de *Menidia estor*.

Con el presente estudio también se pudo observar la importancia que tiene la vitamina C en el desempeño en cultivo de *Menidia estor*, evidente en las respuestas en crecimiento, supervivencia y presencia o ausencia de signos de deficiencia en los individuos juveniles alimentados con nauplios enriquecidos (capítulo 3). El efecto positivo de la vitamina C sobre estos parámetros se observó en menor medida en los peces alimentados con las dietas artificiales (capítulo 4). La evidente la diferencia de crecimiento entre los peces alimentados con las dietas preparadas y aquellos alimentados con *Artemia salina*, confirma que las dietas artificiales proporcionadas tuvieron algún tipo de deficiencia nutricional, diferente a una deficiencia de ácido ascórbico, si se tiene en cuenta que las concentraciones de vitamina C utilizadas en los dos tipos de alimento fueron similares.

Es evidente que las dietas artificiales elaboradas no fueron las idóneas para esta especie, y por ello se presentaron dificultades a la hora de realizar la evaluación nutricional. Los resultados obtenidos sugieren que un el contenido alto de carbohidratos en la dieta, o la deficiencia de otros nutrientes, pudo causar efectos que enmascararan aquellos producidos por el nivel de inclusión de vitamina C. Como se pudo observar, al repetir el experimento con niveles menores de carbohidratos, los signos de deficiencia se redujeron notoriamente; sin embargo, aún había aparición de estos signos incluso en los peces alimentados con los mayores niveles de ascorbato, y el crecimiento y supervivencia no fueron óptimos, comparados con los juveniles que recibieron alimento vivo. Esto indica que aunque el nivel de carbohidratos influyó en las respuestas de los peces, también pudo haber otros factores en las dietas que causaran tales problemas a la hora de la evaluación nutricional. Aunque ya se conoce el requerimiento de algunos nutrientes para la especie, dichos problemas se debieron al desconocimiento de los requerimientos de otros nutrientes importantes para

Menidia estor, los cuales fueron inevitables, puesto que este estudio es uno de los primeros trabajos acerca del conocimiento de sus necesidades nutritivas.

A pesar de que se utilizaron ingredientes de primera calidad y de que los peces fueron mantenidos bajo condiciones ambientales controladas no fue posible obtener dietas artificiales que no mostraran algún síntoma patológico de deficiencias nutricionales. Aunque se creía que los signos mas frecuentemente observados podían ser causa de niveles deficientes de vitamina C en las dietas artificiales proporcionadas, con los experimentos realizados se pudo observar que estos síntomas pueden ser propios de deficiencias de otros nutrientes. A pesar de que la vitamina C en altos niveles de la dieta logra reducir la incidencia de estos signos, estos siguen apareciendo en los peces evaluados. Además los peces alimentados con dietas a altos niveles de vitamina C presentaron acumulación de la misma en el hígado, lo cual indicaría que no toda la vitamina C proporcionada se estuviera utilizando. Aunque bajo las condiciones del experimento, se obtuvo un requerimiento de 255 mg Kg^{-1} , para tener mejores crecimientos y supervivencias en los juveniles de *Menidia estor* (capítulo 4), debido a lo anterior, no se pudo saber la cantidad mínima necesaria de vitamina C para que los peces no presenten signos patológicos por deficiencia de esta vitamina. De esta manera aún falta realizar más estudios para poder dilucidar cuáles son las causas de los signos patológicos presentes en los peces alimentados con las dietas artificiales.

Si bien en este trabajo no se estudiaron los efectos de la vitamina C sobre algunas respuestas fisiológicas al estrés ampliamente estudiadas en otras especies, si se pudo observar que esta vitamina cumple un papel importante en este tipo de respuestas y que hay una movilización de la misma a través de los tejidos bajo situaciones de estrés. Si se observan las respuestas al estrés agudo por transporte en las concentraciones de vitamina C del hígado y se comparan con aquellas obtenidas en los peces sometidos a hipoxia aguda, se observa una tendencia similar a incrementar los niveles de ascorbato en este órgano después del estrés. Sería necesario evaluar otros tipos de estrés agudo, así como de diferente duración, para determinar si estos cambios varían de acuerdo al tipo de estrés. Por otro lado, también es necesario llevar a cabo estudios más profundos acerca de las

respuestas fisiológicas al estrés en *M. estor* y del papel que cumple la vitamina C en las mismas.

De acuerdo a lo encontrado en el presente estudio, los signos de deficiencia observados en los peces cultivados de *Menidia estor* no son un claro indicativo de deficiencias de vitamina C en la dieta, lo cual hace imperativa la realización de nuevos estudios acerca de los requerimientos nutricionales de esta especie, para así lograr dietas artificiales que puedan reemplazar totalmente el alimento vivo en el cultivo de *M.estor*.

Conclusiones

Estatus de la vitamina C en *Menidia estor* y efectos del estrés agudo por transporte sobre las concentraciones de esta vitamina en los tejidos

- De acuerdo a los tejidos evaluados, tanto en hembras como en machos adultos silvestres de *Menidia estor* las concentraciones más altas de TAA se presentan en el cerebro, seguido de gónadas, hígado y músculo.
- Tomando en cuenta el contenido de ácido ascórbico del hígado como un indicador confiable del estatus de vitamina C, se puede concluir que en adultos silvestres de *Menidia estor*, niveles de ascorbato hepáticos superiores a 25.9 µg/g en hembras y 46.2 µg/g en machos, no reflejan signos de deficiencia. Debido a que estos niveles no se vieron significativamente afectados al ser sometidos a estrés agudo por transporte, sugiere que este estrés físico no influencia significativamente el estatus de vitamina C de esta especie, cuando es capturada del medio natural. De la misma manera, el estrés causado por tres horas de transporte no es suficiente para causar cambios significativos en las concentraciones de ácido ascórbico total de los demás tejidos evaluados de *M. estor*; sin embargo, si es suficiente para cambiar significativamente la proporción de AA y DHAA en las gónadas de las hembras, órganos donde la protección contra el estrés oxidativo es sumamente importante.

Efectos de la concentración de vitamina C de la dieta sobre la primera reproducción de *M. estor*

- Al evaluar la primera reproducción del pez blanco, tanto en peces alimentados con suplemento de vitamina C como en los alimentados sin el suplemento, la producción de huevos, al igual que el % de huevos viables no varió significativamente entre los primeros siete desoves consecutivos; lo que sugiere que se puede tener una producción continua de huevos sin que se reduzca su viabilidad, por lo menos durante siete desoves consecutivos. La calidad de los huevos con respecto a los porcentajes de oculación y eclosión tampoco varió significativamente entre los tres primeros desoves consecutivos. Es necesario evaluar la calidad de los huevos durante más desoves, para poder determinar el número de desoves consecutivos en los que se puedan obtener huevos viables y de buena calidad.
- No se observó un efecto significativo de la vitamina C sobre la fecundidad del pez blanco, en términos de número promedio de desoves y número de huevos producidos por desove, así como tampoco sobre el porcentaje de fertilización. Sin embargo, estos parámetros si se vieron afectados por la proporción sexual, siendo la proporción 1:1 la que ofreció mejores resultados. Sin embargo para poder establecer la influencia de la proporción sexual sobre las tasas de fertilización se requieren estudios más profundos. El nivel de ascorbato en la dieta de los reproductores influye positivamente en el % de huevos oculados y las tasas de eclosión en los huevos producidos durante la primera reproducción de *Menidia estor*. No obstante, el nivel de vitamina C proporcionado a los reproductores en la *Artemia* suplementada no fue suficiente para observar cambios significativos en las concentraciones de AAT en las gónadas y mejorar notoriamente el desempeño reproductivo.

Efecto del uso de nauplios de *Artemia franciscana* enriquecidos con diferentes niveles de vitamina C sobre el crecimiento y supervivencia de los juveniles del pez blanco

- Al evaluar el efecto del enriquecimiento de nauplios de *Artemia* con vitamina C sobre el crecimiento y la supervivencia de juveniles de *M. estor* se observó una relación positiva entre el nivel de ácido ascórbico y estos dos parámetros. Aunque se presentaron algunos signos de deficiencia en los juveniles alimentados con los más bajos niveles de vitamina C, su incidencia no fue significativa. Por otro lado, no se observó una influencia de los niveles de vitamina C de la dieta sobre la incorporación de ascorbato en el hígado de los juveniles. Niveles de vitamina C entre 345.82 y 509.45 $\mu\text{g g}^{-1}$ (base seca) en los nauplios de *Artemia* enriquecidos, serían apropiados para obtener un crecimiento y supervivencia óptimos en los juveniles de *M. estor*.

Requerimiento dietético de vitamina C para juveniles de *M. estor*, mediante el uso de dietas artificiales

- Al estudiar los requerimientos de vitamina C de juveniles de *M. estor*, mediante el uso de dietas artificiales también se observó un efecto positivo del nivel de vitamina C sobre el crecimiento y la supervivencia, aunque se pudo ver enmascarado por los efectos del alto nivel de carbohidratos y otras posibles deficiencias nutricionales en las dietas elaboradas. Se observaron signos de deficiencia de vitamina C como erosión de aletas, hemorragias, exoftalmia, lordosis, escoliosis y malformaciones óseas, entre otros, las cuales tuvieron una mayor incidencia en los peces alimentados con los más bajos niveles de vitamina C. Bajo las condiciones del experimento, se obtuvo un requerimiento de 255 mg Kg^{-1} , para tener mejores crecimientos y supervivencias.

Efectos del nivel de vitamina C de la dieta sobre las concentraciones de ácido ascórbico del hígado en juveniles de *M. estor* sometidos a estrés por hipoxia aguda

- Al utilizar dietas artificiales, las concentraciones de ácido ascórbico (AA) en el hígado de los juveniles de pez blanco están relacionadas positivamente con las concentraciones de AA de la dieta. No hubo una relación significativamente positiva entre el nivel de vitamina C de la dieta y los valores del índice hepatosomático (IHS); sin embargo, las dietas causaron un incremento notorio en el IHS de todos los peces, posiblemente debido al alto nivel de carbohidratos. La hipoxia aguda a la que después fueron sometidos los juveniles de *M. estor* fue un factor estresante que ocasionó una respuesta fisiológica, evidente en el cambio de las concentraciones de ácido ascórbico del hígado. El ácido ascórbico hepático mostró una tendencia incrementarse en los peces estresados en comparación con los peces no sometidos a estrés; estos resultados sugieren que la hipoxia aguda puede inducir una movilización de vitamina C hacia el hígado. No es claro si el incremento de ascorbato en el hígado se debe a una necesidad mayor de la vitamina en este órgano o a un mayor flujo de sangre, y con esto un mayor flujo de leucocitos hacia el mismo, como una respuesta fisiológica al estrés.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

Bibliografía general

Agrawal, N.K. and C.L. Mahajan. 1980. Comparative tissue ascorbic acid studies in fishes. *J. Fish. Biol.*, 17: 135-141.

Armijo, O.A. y Y.L. Sasso. 1976. Observaciones preliminares en acuarios sobre incubación y alevinaje de aterínidos (*Chirostoma* spp.) del lago de Pátzcuaro, Michoacán. Fideicomiso para el desarrollo de la Fauna Acuática (3). 13pp.

Avalos, A.M. 2006. Digestibilidad *in Vitro* de dietas con diferentes combinaciones de ligantes diseñadas para larvas y juveniles de pescado blanco del lago de Pátzcuaro *Chirostoma estor estor* (Jordan, 1879). Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, México. 52 p.

Barbour C.D. 1973. The systematics and evolution of the genus *Chirostoma swainson* (Pisces:Atherinidae). *Tulane Studies in Zoology and Botany*, 18(3):97-141.

Basabe, B. 2000. Funciones de la vitamina C en el metabolismo del colágeno. *Rev. Cubana Aliment. Nutr.*, 14(1): 46-54.

Blom, J.H. and K. Dabrowski. 1995. Reproductive success of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to graded dietary ascorbyl monophosphate levels. *Biol. Reprod.*, 52: 1073-1080.

Boonyaratpalin, M; Boonyaratpalin, S. and K. Supamataya. 1994. Ascorbyl-phosphate-Mg as a dietary vitamin C sources for sea bass (*Lates calcarifer*). *In: Chou, L.M; Munro, A.D; Lam, T.J; Chen, T.W; Cheong, L.K.K; Ding, J.K; Hooi, K.K; Phang, V.P.E; Shim, K.F. and C.H. Tan (Eds.). The third Asian Fisheries Forum. Asian Fisheries Society, Manila, Philipines. 725-728 pp.*

Boonyaratpalin, M. and K. Williams. 2001. Asian Sea Bass, *Lates calcarifer*. *In: Webster, C.D. and C. Lim (Eds.). Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. CABI Publishing. U.K. 40-50 pp.*

Burns, J.J; Peyser, P. and A. Moltz. 1956. Missing step in guinea pigs required for the biosynthesis of L-ascorbic acid. *Science*, 124: 1148-1149.

Chatterjee, I.B. 1973. Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. *Science*, 182: 1271-1272.

Chaterjee, I.B. 1978. Ascorbic acid metabolism. *World Rev. Nutr. Diet.:* 30: 69-87.

Chatterjee, I.B; Chatterjee, G.C; Ghosh, N.C. and B.C. Guha. 1960. Biological synthesis of L-ascorbic acid in tissues: conversion of L-gulonolactone into L-ascorbic acid. *Biochem. J.*, 74: 193-203.

Cho, Y.S; Douglas, S.E; Gallart, J.W; Kim, K.Y; Kim, D.S. and Y.K. Nam. 2007. Isolation and characterization of cDNA sequences of L-gulono-gamma-lactone oxidase, a key enzyme for biosynthesis of ascorbic acid, from extant primitive fish groups. *Comparative Biochemistry and Physiology*, doi: 10.1016/j.cbpb.2207.01.001.

Ciereszko, A. and K. Dabrowski. 1995. Sperm quality and AA concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. *Biol. Reprod.*, 52: 982-988.

Dabrowski, K; Matusiewicz, M. and J.H. Blom. 1994. Hydrolysis, absorption and bioavailability of ascorbic acid esters in fish. *Aquaculture*, 124: 169-192.

De Silva, S. S. and T. A. Anderson. 1995. *Fish nutrition in aquaculture*. Chapman & Hall. Chapman & Hall Aquaculture Series 1. First Edition. Great Britain. 319 p.

FAO. 2007. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2006*. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. 176p.

Gabaudan, J. and V. Verlhac. 2001. Critical review of the requirements of ascorbic acid in cold and cool water fishes (salmonids, percids, plecoglossids and flatfishes). *In: Dabrowski, K. (Ed.). Ascorbic acid in aquatic organisms. Status and perspectives*. CRC Press. U.S.A. 33-48 pp.

Guarnaccia, M.M; Takami, M. And E.E. Jones. 2000. Luteinizing hormone depletes ascorbic acid in preovulatory follicles. *Fertility and sterility*, 74: 959-963.

Gouillou-Constans, M.F. and S.J. Kaushik. 2001. Ascorbic acid requirement in freshwater and marine fish. Is there a difference? *In: Dabrowski, K. (Ed.). Ascorbic acid in aquatic organisms. Status and perspectives.* CRC Press. U.S.A. 49-68 pp.

Ha, M.N; Graham, F.L; D'Souza, C.K; Muller, W.J; Igdoura, S.A. and H.E. Schellhorn. 2004. Functional rescue of vitamin C synthesis deficiency in human cells using adenoviral-based expression of murine L-gulono- γ -lactone oxidase. *Genomics*, 83: 482-492.

Halver, J.E. 1972. The role of ascorbic acid in fish disease and tissue repair. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 38: 79-92.

Hassan, M. and A.L. Lehninger. 1956. Enzymatic formation of ascorbic acid in rat liver extracts. *J. Biol. Chem.*, 223: 123-138.

Hilton, J.W; Cho, C. and S.J. Slinger. 1978. Effect of graded level of supplemental ascorbic acid in practical diets fed to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 35: 431.

Hilton, J.W; Brown, R.G. and S.J. Slinger. 1978. The half-life and uptake of ^{14}C -L-ascorbic acid in selected organs of rainbow trout. *Comp Biochem. Physiol.*, 62A: 427-432.

Jobling, M. 1994. *Fish Bioenergetics.* Chapman & Hall. Fish and Fisheries Series 13. First Edition. Great Britain. 309 p.

Johnson, L.R. 2001. Digestion and absorption. *In: Johnson, L. R. (Ed.). Gastrointestinal physiology. The Mosby Physiology Monograph Series.* Mosby. Sixth Edition. U.S.A. 119-141 pp.

- Kaushik, S.J.** 2002. European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax*. In: Webster, C.D. and C. Lim (Eds.). Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. CABI Publishing. U.K. 28-39 pp.
- Lall, S.P; Olivier, G; Weerakoon, D.E.M. and J.A. Hines.** 1989. The effect of vitamin C deficiency and excess on immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) In: Proceedings of the Third International Symposium on Feeding and Nutrition in Fish. Japan. 427-441 pp.
- Lara, V.A.** 1974. Aspectos del cultivo extensivo e intensivo del pescado blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor estor*, Jordan 1879. Actas del Simposio sobre Acuicultura en América Latina. Documentos de Investigación. Montevideo, Uruguay. Informes de Pesca, FAO, Roma. 159(1): 113-116.
- Li, Y. and R.T. Lovell.** 1984. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. J. Nutr., 115: 123-131.
- Lim, C. and R.T. Lovell.** 1978. Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). J. Nutr., 108: 1137-1146.
- Lovell, T.** 1998. Nutrition and Feeding of Fish. Kluwer Academic Publishers. Second Edition. U.S.A. 267p.
- Lyons, J; González-Hernández, G; Soto-Galera, E. and M. Guzmán-Arroyo.** 1998. Decline of freshwater fishes and fisheries in selected drainages of best-central Mexico. Fisheries Management, 23(4): 10-18.
- Martínez-Palacios, C.A; Barriga-Tovar, E; Taylor, J.F; Ríos-Durán, G. and L.G. Ross.** 2002a. Effect of temperature on growth and survival of *Chirostoma estor estor*, Jordan 1879, monitored using a simple video technique for remote measurement of length and mass of larval and juvenile fishes. Aquaculture, 209: 369-377.

Martínez-Palacios, C.A; Ríos-Durán, M.G; Campos Mendoza, A; Toledo Cuevas, M; Aguilar-Valdez, M.C. and L.G. Ross. 2002b. Progresos en el cultivo del pescado blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor estor*. Ciencia Nicolaita, 32: 73-90.

Martínez-Palacios, C.A; Comas Morte, J; Tello-Ballinas, J.A; Toledo-Cuevas, M. and L.G. Ross. 2004. The effects of saline environments on survival and growth of eggs and larvae of *Chirostoma estor estor* Jordan 1880 (Pisces: Atherinidae). Aquaculture, 238: 509-522.

Martínez-Palacios, C.A; Racotta, I.S; Ríos-Durán, M.G; Palacios, E; Toledo-Cuevas, M. and L.G. Ross. 2006. Advances in applied research for the culture of Mexican silversides (*Chirostoma*, Atherinopsidae). BIOCELL. 30: (1), 137-148.

Martínez-Palacios, C.A; Ambriz-Cervantes, L; Ríos-Durán, M.G; Ross, L.G. and KJ Jauncey. 2007. Dietary protein requirement of juvenile Mexican Silverside (*Chirostoma estor estor* Jordan 1879), a stomachless zooplanktophagous fish. Aquaculture Nutrition, *In Press*.

Masumoto, T; Hosokawa, H. and S. Shimeno. 1991. Ascorbic acid's role in aquaculture nutrition. *In: Akiyama, D.M. and R.K.H. Tan (Eds.). Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition Workshop. Thailand and Indonesia.* 42-48 pp.

Miller, R.R; Minckley, W.L. and S.M. Norris. 2005. Freshwater Fishes of Mexico. Museum of Zoology, University of Michigan. 652p.

Monroy, M. 2006. Influencia de los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) sobre el crecimiento, la supervivencia y la capacidad osmoreguladora en larvas de pez blanco (*Chirostoma estor estor*). Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, México. 102 p.

Moreau, R. and K. Dabrowski. 1998a. Fish acquired ascorbic acid synthesis prior to terrestrial vertebrate emergence. Free Radicals in Biology and Medicine, 25: 989-990.

Moreau, R. and K. Dabrowski. 1998b. Body pool and synthesis of ascorbic acid in adult sea lamprey (*Petromyzon marinus*): an agnathan fish with gulonolactone oxidase activity. Proc. Natl.Acad. Sci. USA, 95: 10279-10282.

Moreau, R. and K. Dabrowski. 2000. Biosynthesis of ascorbic acid by extant actinopterygians. J. Fish. Biol., 57: 733-745.

Moreau, R. and K. Dabrowski. 2001. Gulonolactone oxidase presence in fishes: activity and significance. In: Dabrowski, K. (Ed.). Ascorbic acid in aquatic organisms. Status and perspectives. CRC Press. U.S.A. 13-32 pp.

Nandi, A; Mukhopadhyay, C.K; Ghosh, M.K. Chattopadhyay, D.J. and I.B. Chatterjee. 1997. Evolutionary significance of vitamin C biosynthesis in terrestrial vertebrates. Free Rad. Biol. Med., 22: 1047-1054.

Nishikimi, M; Fukuyama, R; Minoshima, S; Shimizu, N. And K. Yagi. 1994. Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulono- γ -lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. J. Biol. Chem., 269: 13685-13688.

NRC. 1993. Nutrient Requirements of fish. Nutrient requirements of domestic animals. Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture, National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C. 114p.

Null, G. 1994. The antioxidant vitamin – Vitamin C. Townsend letter for Doctors. February/ March.

Orbe-Mendoza, A; Acevedo-García, J. and J. Lyons. 2002. Lake Pátzcuaro fishery management plan. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 12: 207-217.

Palacios, E; Racotta I.S; Aparicio, B; Arjona, O. and C.A. Martínez-Palacios. 2007. Lipid classes and fatty acids during embryogenesis of captive and wild silverside (*Chirostoma estor estor*) from Pátzcuaro Lake. Fish. Physiol. Biochem. *In press*.

Pond, W. G; Church, D.C. and K.R. Pond. 1995. Basic animal nutrition and feeding. John Wiley & Sons. Fourth Edition. U.S.A. 615 p.

Ríos-Durán, M. G., Hernández-Téllez, A. R., Martínez-Palacios, C. A. and L. G. Ross. 2006. The effect of transportation stress on tissue ascorbic acid levels of Mexican silverside (*Chirostoma estor estor* Jordan, 1979). BIOCELL. 30: (1), 149-155.

Rojas, P. M. 2003. Cultivo de pescado blanco del Lago de Pátzcuaro. Una revisión de las investigaciones del Instituto Nacional de la Pesca. *En:* Rojas, P.M; Torres, G; González, E; Cadena, C. y R.E. Báez (Eds.). Historia y avances del cultivo de pescado blanco. Instituto Nacional de la Pesca. Dirección General de Investigación en Acuicultura. México. 15-27pp.

Rønnestad, I; Hamre, K; Lie, Ø. and R. Waagbø. 1999. Ascorbic acid and α -tocopherol levels before and after exogenous feeding. Journal of Fish Biology, 55: 720-731.

Ross, L.G; Martínez-Palacios, C.A; Aguilar Valdez, M.C; Beveridge, M.C.M. and M.C. Chavez Sánchez. 2006. Determination of feeding mode in fish: the importance of using structural and functional feeding studies in conjunction with gut analysis in a selective zooplanktivore *Chirostoma estor estor* Jordan 1880. Journal of Fish Biology, 68: 1-13.

Roy, R.N. and B.C. Guha. 1958. Species difference in regard to the biosynthesis of ascorbic acid. Nature, 182: 319-320.

Sato, P; Nishikimi, M. and S. Underfriend. 1976. Is L-gulonolactone-oxidase the only enzyme missing in animals subject to scurvy? Biochem. Biophys. Res. Commun., 71: 293-299.

Sato, P. and S. Underfriend. 1978. Scurvy-prone animals, including man, monkey and guinea pig, do not express the gene for gulonolactone oxidase. Archives of Biochemistry and Biophysics, 187: 158-162.

Seib, P.A. and B.M. Tolbert. 1982. Ascorbic acid: chemistry, metabolism and uses. Adv. Chem., 200, American Chemical Society. 604 p.

Soliman, A.K; Jauncey, K. and R.J. Roberts. 1994. Water-soluble vitamin requirements of tilapia: ascorbic acid (Vitamin C) requirement of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Aquaculture and Fisheries Management, 25: 269-278.

Stubbs, D.W and D.B. Haufrect. 1968. Effects of actinomycin D and puromycin on induction of gulonolactone hydrolase by somatotrophic hormone. Arch. Biochem. Biophys., 124: 365-371.

Verlhac, V; Gabaudan, J. and W. Schüep. 1995. Immunomodulation in fish: II. Effect of dietary vitamin C. *In:* Kurmaly, K. (Ed.), Proceedings of the 2nd Roche Aquaculture Center Conference on Nutrition and Disease. Bangkok, Thailand.

Webster, C. D. and C. Lim. 2002. Introduction to fish nutrition. *In:* Webster, C.D. and C. Lim (Eds.). Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. CABI Publishing. U.K. 1-27 pp.

Xie, Z. and C. Niu. 2006. Dietary ascorbic acid requirement of juvenile ayu (*Plecoglossus altivelis*). Aquaculture Nutrition, 12: 151-156.

ANEXO

Symposium: BIOLOGY AND CULTURE OF SILVERSIDES (PEJERREYES)

The effect of transportation stress on tissue ascorbic acid levels of Mexican silverside (*Chirostoma estor estor* Jordan, 1979)

M. G. RÍOS-DURÁN*, A. R. HERNÁNDEZ-TÉLLEZ**, C. A. MARTÍNEZ-PALACIOS** AND L. G. ROSS***.

* Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito exterior s/n, Ciudad Universitaria, México, D.F.

** Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Av. San Juanito Itzícuaró s/n, Col. San Juanito Itzícuaró, Morelia, Michoacán, México.

*** Institute of Aquaculture, University of Stirling, FK9 4LA, Scotland, UK.

Key words: Ascorbic acid tissue levels, Mexican silverside, transport stress

The Atherinopsid silverside (*Chirostoma estor estor* Jordan, 1879) is a native freshwater species from the Central Mexican Plate. It is the principal species in an artisanal fishery in Lake Pátzcuaro, one of the altiplano lakes of Central Mexico, where for many years it has been the basis of the subsistence of the riparian P'urépecha Indian people. It has a high market demand and a high commercial value and so is an important income source in the region. However, problems like pollution, introduction of exotic species and overfishing have caused it to become an endangered species.

C. estor estor has a great potential for aquaculture, and although there have been several attempts at culture on experimental scales (Lara, 1974; Armijo and Sasso, 1976), research on the basic requirements for its culture began only recently. Martínez-Palacios *et al.* (2002a) described techniques for measuring and handling *C. estor estor* larvae and determined the optimum

temperature for growth and survival. Other studies have been conducted on physiology, feeding habits, anatomical feeding structures and activity of digestive enzymes of the species (Martínez-Palacios *et al.*, 2002b) and the effects of saline environments on growth and survival of eggs and larvae of whitefish are now well known (Martínez-Palacios *et al.*, 2004). Currently, several studies are in progress on feeding requirements, *in vivo* and *in vitro* digestibility of different food sources, molecular biology and stress responses in order to establish the optimal conditions for aquaculture.

The species is very easily stressed by handling and changes in environmental conditions such as salinity and dissolved oxygen, result in high mortality, low growth, lack of appetite, etc. According to Pankhurst and van der Kraak (1997), stress can inhibit growth because of its effect on metabolism and the endocrine pathways that regulate this process.

It has been shown that vitamin C (ascorbic acid) plays an important role in resistance to environmental stress in fish (Wee, 1996; Papp *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998; Henrique *et al.*, 1998; Montero *et al.*, 1999), as well as acting on numerous physiological processes including growth, bone formation, reproduction, wound healing, and immune responses, amongst others (Lygren

Address correspondence to: M.G. Ríos-Durán. Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Av. San Juanito Itzícuaró s/n, Col. San Juanito Itzícuaró, Morelia, Michoacán, CP 58330, M...XICO. E-mail: riosd@icmyl.unam.mx
Received on January 29, 2005. Accepted on September 15, 2005.

et al., 1999; Lim *et al.*, 2000; Lee and Dabrowski, 2004). One of the most widely accepted functions of vitamin C is that it acts as an antioxidant as it interrupts free radical chain reactions.

Vitamin C occurs at high levels in many vital organs with an active metabolism and its concentration in various tissues is related to the dietary intake of this vitamin. In some tissues, such as the brain, it is accumulated in high concentrations and, compared with other storage organs such as liver and kidney, its levels can be retained for longer. It seems that Vitamin C has a great importance in protecting vital tissues against oxidation processes, and this may explain the high levels found in brain and other organs such as thymus in fish (Gabaudan and Verlhac, 2001). According to Robinson (1989), the best tissue for evaluating ascorbic acid status in fish is debatable. Blood ascorbate levels are rapidly affected by dietary vitamin C intake, thus these levels not appear to be a good indicator of the vitamin C status. Anterior kidney ascorbate levels have been suggested as a good indicator of ascorbic acid reserves in fish, but this tissue is small, which causes problems for vitamin C assays. Some authors consider liver ascorbate levels to be a better indicator of ascorbic acid status than anterior kidney vitamin C levels. Lim and Lovell (1978) found highly variable ascorbate concentrations in anterior kidney of catfish, while concentrations of this vitamin in liver were consistent. In other species like Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) the liver ascorbic acid concentration can be used as an index of the vitamin C status (Hilton *et al.*, 1977).

We evaluated the ascorbic acid concentration in brain, liver, gonad and muscle of several wild *Chirostoma estor estor*¹. Total ascorbic acid (TAA), reduced ascorbic acid (AA) and Dehydro-ascorbic acid (DHAA) concentrations were evaluated by HPLC techniques² (Fig. 1). Tissue ascorbate (TAA, AA and

DHAA) levels were different with brain having the highest values, followed by gonad, liver and muscle in both sexes. No significant difference ($p > 0.05$) exists in TAA concentrations of the evaluated tissues between females and males (Table 1), nor are there significant differences between females and males in AA and DHAA concentrations, except in brain, which has higher levels of AA in males. As shown in Figure 2, both in females and males, vitamin C in the evaluated tissues is found in higher proportion as AA (reduced form) than DHAA (oxidized form), with the exception of female brain although this difference was not significant ($p > 0.05$).

During changes in environmental conditions ascorbic acid fluctuations can occur in fish tissues which suggests that vitamin C is involved in certain physiological adaptation mechanisms. In some species like mullet (*Mugil cephalus* L.), during periods of stress, tissue ascorbate concentrations can be significantly altered (decrease or increase) (Thomas, 1984). However, there is no data on vitamin C status in *C. estor estor* and the effects of stress on AA concentrations in tissues.

TABLE 1.

Total Ascorbic Acid tissue levels ($\mu\text{g/g}$) found in wild *Chirostoma estor estor* females and males. Data are expressed as mean \pm S.E.M.

Tissue	Females	Males
Brain	121.81 \pm 21.68 ^a	110.69 \pm 15.92 ^a
Gonad	38.58 \pm 11.58 ^a	81.43 \pm 24.61 ^a
Liver	25.86 \pm 2.94 ^a	46.21 \pm 14.68 ^a
Muscle	11.23 \pm 3.68 ^a	12.88 \pm 2.80 ^a

Values with the same superscript are not significantly different ($p > 0.05$).

¹ *Chirostoma estor estor*, (Standard length = 14.4 \pm 2.03 cm) were collected in lake Ptzcuaro, Michoacán, México in September 2003. Six males and six females were sacrificed, in order to extract the brain, liver and gonad and take samples of muscle, which were frozen in liquid nitrogen within 1 minute. Frozen tissues were then stored at -80°C until ascorbic acid analysis.

² Frozen tissues were weighed and immediately homogenized in ice-cold buffer (0.2 M Sodium acetate solution, pH 4.8). Samples of each homogenate (100 μL) were added to three tubes, one for the base line (BL), one for reduced ascorbic acid (AA) and the last for total ascorbic acid (TAA) quantification. The scheme of sample preparation is shown in Figure 1. Quantification of ascorbic acid concentration in the prepared samples was carried out by high performance liquid chromatography (HPLC), using the method modified by Papp *et al.* (1998). Then, dehydro-ascorbic acid (DHAA) concentrations were determined by the difference between TAA and AA. Ultrapure chemicals used in the analysis were obtained from J.T. Baker (USA), Fluka (Switzerland), SIGMA (Germany) and Aldrich (USA), and Durapore (Millipore) membrane filters (0.45 μm) were used for the filtration of buffers and homogenates. A Liquid chromatograph (isocratic single column system, Agilent 1100 series) was used with UV-visible detector and a Lichrosorb RP-18 column (4.6 x 200mm, Agilent). The mobile phase was 0.04 M Sodium acetate solution, with EDTA (0.05 mM) and Tetrabutylammonium dihydrogen phosphate (0.5 mM), pH 3.76. The chromatographic conditions were: Flow rate= 0.5 ml/min; Pressure= 65 bar; Wave length (UV detector)= 254 nm; Temperature= 23°C; Injection volume= 2 μL . The chromatograms were evaluated with ChemStation Plus software (Agilent).

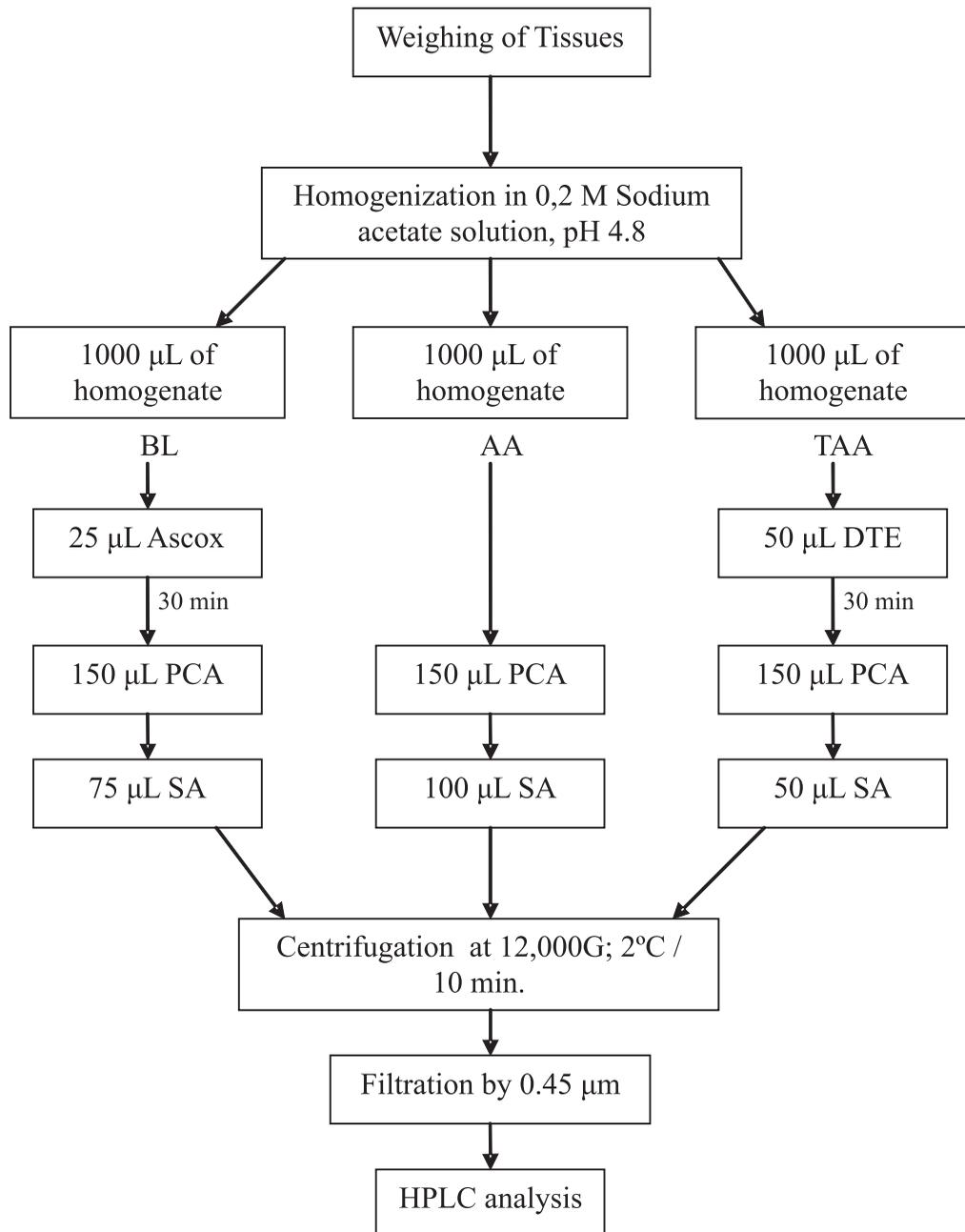


FIGURE 1. Sample preparation for the determination of ascorbic acid by HPLC method. (BL: Base line determination, AA: reduced ascorbic acid quantification, TAA: Total ascorbic acid quantification, Ascoc: Ascorbate oxidase, DTE: 4% Dithioerythritol solution, PCA: 10% Perchloric acid solution, SA: 0.2 M Sodium acetate Buffer).

We monitored variations in ascorbic acid concentrations after transport stress in brain, liver, gonad and muscle of several *C. estor estor* adults. We took these fish as the stressed group and the fish sampled previously, without transport stress, as the control group³. After transport stress, both females and males show the same pattern of tissue ascorbic acid (TAA, AA and DHAA) as the controls, with the highest values in brain and the lowest in muscle. In comparison with pre-stress vitamin C levels there are not significant changes ($p > 0.05$) in tissue ascorbate concentrations (Fig. 3).

No significant difference was found between females and males in tissue TAA concentrations after stress, with the exception of liver which had lower levels in females than males. As in the control group, post-stress vitamin C was higher in both sexes as AA than DHAA. However, there was no significant difference between these two forms in the brain of females. There is a trend of an increase of AA levels and a decrease of DHAA levels in all tissues of both sexes after the transport stress (Fig. 4), although the change in their proportion is only significant ($p < 0.05$) in female gonads. We can conclude that the stress caused by three hours transportation is not enough to cause significant changes in tissue TAA concentrations, but it is sufficient to change significantly the proportion of AA and DHAA in gonad of females.

Context and perspectives

Because the evaluated fishes were taken from the wild, it was inevitable that physical stress was caused during capture; however, it is not known if such stress caused significant changes in the normal tissue ascor-

³ A further six males and six females (Standard length = 17.7 ± 1.7 cm) were packed alive in plastic bags with oxygenated freshwater and then transported for 3 hours at 22-24°C to the laboratory. This group of fish was captured at the same time as the control group and so capture stress was the same for the two groups. After transport, fish were sacrificed and samples of brain, liver, gonad and muscle were taken and frozen in liquid nitrogen within 1 minute. Frozen tissues were then stored at -80°C until ascorbic acid analysis.

For each tissue, the mean and standard error (S.E.) were calculated separately for males and females, before and after transport stress. For each tissue, differences in AA, TAA and DHAA before and after transport and differences between sexes were analysed using Student's t-test and the Minitab Statistical software, version 13.32. The accepted level of significance was 0.05. When data did not have a normal distribution, statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test with a confidence level of 95%. Because the fish were captured from the wild, differences in sizes was unavoidable; in this case the obtained data were reported as micrograms of ascorbate per gram of tissue ($\mu\text{g/g}$).

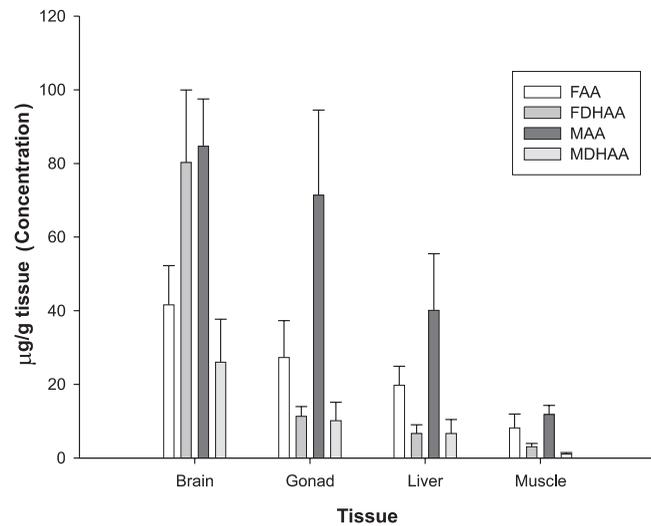


FIGURE 2. Reduced ascorbic acid (AA) and Dehydro-ascorbic acid (DHAA) levels in both females and males of wild *Chirostoma estor estor* (FAA: Females reduced ascorbic acid; FDHAA: Females Dehydro-ascorbic acid; MAA: Males reduced ascorbic acid; MDHAA: Males Dehydro-ascorbic acid).

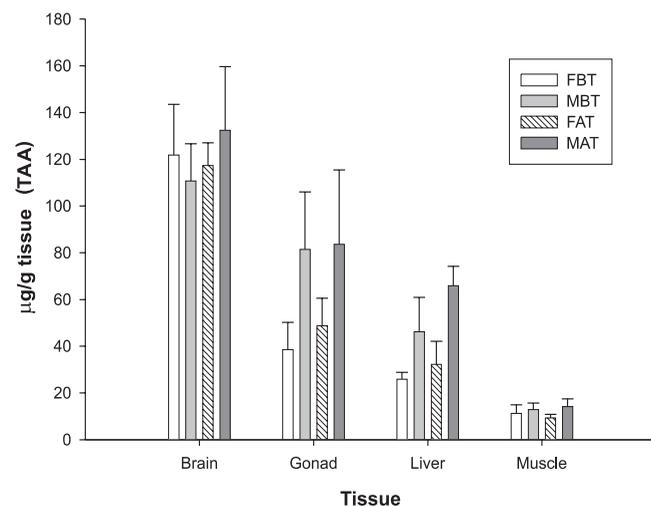


FIGURE 3. Total Ascorbic Acid (TAA) levels found in the evaluated tissues of *Chirostoma estor estor* females and males before (control group) and after transport stress (stressed group) (FBT: Females before transport; MBT: Males before transport, FAT: Females after transport, MAT: Males after transport).

bate levels. Thomas (1984) found that liver and brain ascorbate contents were relatively unaffected by capture stress. It was assumed that capture stress does not alter the vitamin C stores in these tissues in *C. estor estor* and that fish sampled without transport stress were a valid control group.

As has been found in several fish species, highest concentrations of TAA were found in brain tissue in *C. estor estor* and these levels were maintained after the transport stress, confirming that in brain tissue the protection against oxidative damage is very important with vitamin C acting as an electron receptor (Gabaudan and Verlhac, 2001). According to Patro and Patnaik (1979) in *Ophiocephalus punctatus* the ascorbic acid concentrations in brain is unaffected by short-term exposure to physical stress, which agrees with the results of this study. Thomas (1984) also found this pattern in the brain and liver of mullet *Mugil cephalus* L. after short-term capture stress. In *C. estor estor* transport stress of three hours did not alter the ascorbate content of this tissue.

Hilton *et al.* (1977) have proposed liver ascorbic acid content as a reliable indicator of vitamin C status

in fish, and considered liver ascorbate concentrations of 20 µg/g or below to be an indicator of poor vitamin C status in rainbow trout. Lim and Lovell (1978) considered levels of liver ascorbate below 30 µg/g as indicative of vitamin C deficiency in catfish. Robinson (1989) found that levels of ascorbic acid below 30µg/g did not reflect a vitamin C deficiency in channel catfish and that levels of 16.5 and 18.2 µg/g did not show signs of vitamin C deficiency. As shown in Table 1, adult *C. estor estor* had liver ascorbate levels of 25.9 µg/g (females) and 46.2 µg/g (males), which most probably indicates a good vitamin C status. Because the concentration of vitamin C in tissues is related to the dietary intake of the vitamin, the liver ascorbate concentrations found may reflect its natural feeding based on zooplankton, a natural supply of this vitamin. Nonetheless, further data are needed to establish hepatic ascorbic acid levels, which could be used as indicators of vitamin C deficiency in this species. Liver TAA levels in silver-side were not affected by transport, which suggests that this physical stress may not significantly influence the vitamin C status of this fish.

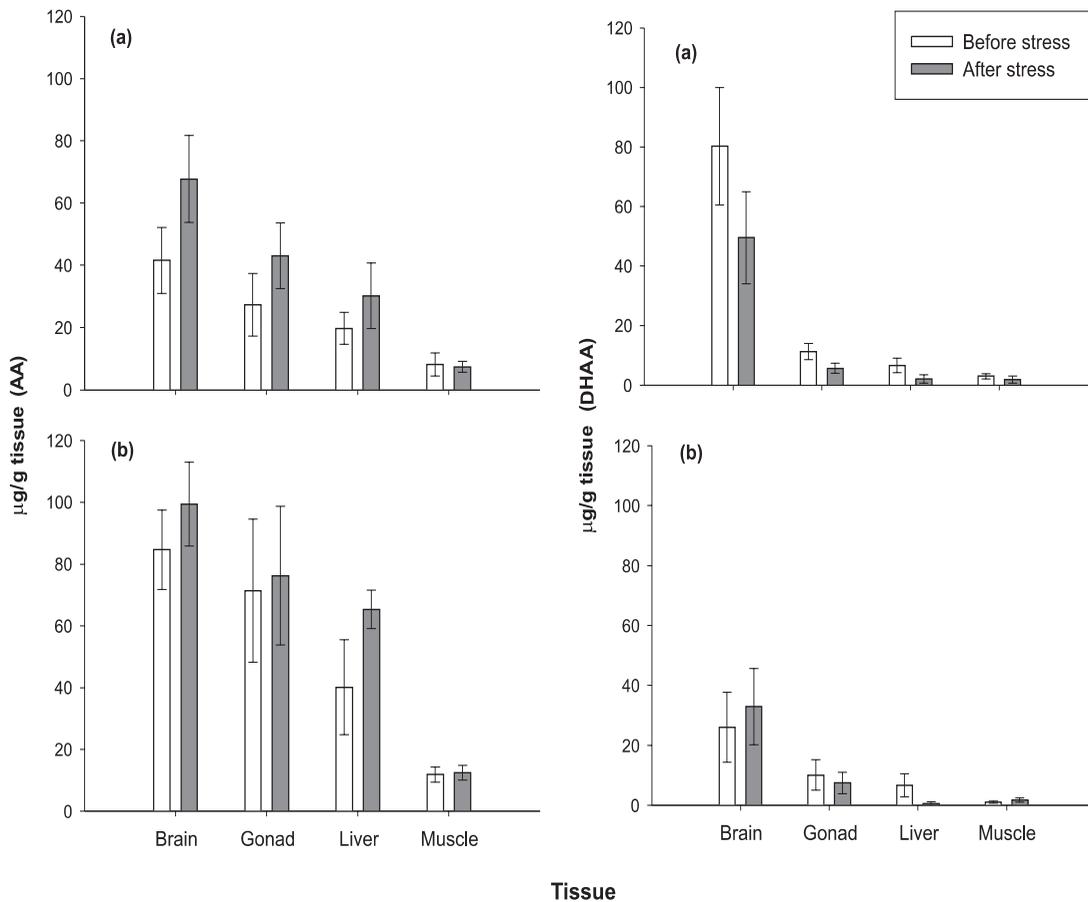


FIGURE 4. Reduced Ascorbic Acid (AA) and Dehydro-ascorbic Acid (DHAA) tissue levels found in *Chirostoma estor estor* (a) females and (b) males before (control group) and after transport stress (stressed group).

As has been reported in other scurvy-prone fish species (Table 2), *C. estor estor* has significant amounts of ascorbic acid in the gonads, to guarantee the high quality of gametes. For the control group, there were no differences of TAA concentrations in gonads between males and females. Most of the ascorbic acid found in testis was in the reduced form, while in ovaries there were no significant differences between reduced and oxidized forms. Although TAA level was not influenced by sex in *C. estor estor*, the proportion of reduced and oxidized forms did vary in gonads. In North Sea dab (*Limanda limanda*) Saborowski *et al.* (1997) found differences in AA concentrations between male and female gonads and, as was found in other species (*Carassius carassius*, *Gadus morhua*, *Perca flavescens*), these levels varied with the reproductive cycle (Seymour, 1981; Sandnes and Braekkan, 1981; Dabrowski and Ciereszko, 1996). In *C. estor estor*, although the evaluated gonads were immature (gonadosomatic indices between 0.11 and 0.25% for males, and between 0.27 to 0.47% for females), these tissues had higher values than liver and muscle. Different concentrations of vitamin C may be

expected in mature individuals, depending on the stage of the reproductive cycle. Transportation stress did not affect the TAA levels in either males or females gonads, but the proportion of AA and DHAA changed significantly in ovaries with AA (reduced form) increasing and DHAA (oxidized form) decreasing. This suggests that vitamin C would have acted as an electron receptor, effectively protecting against oxidative damage in ovaries in a stress situation.

The lowest concentrations of TAA were found in muscle of *C. estor estor*, indicating that this tissue is not an important storage place for vitamin C. Low muscle TAA levels have been observed in other fish such as european sea bass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and rainbow trout (Alexis *et al.*, 1999; Gabaudan and Verlhac, 2001). The stress caused by transport for three hours did not affect muscle ascorbate levels of silverside.

Although the changes in tissue TAA levels after the stress are not significant, low variations did exist and it may be that longer periods of transport stress could result in more significant changes.

TABLE 2.

Ascorbic acid (AA) concentrations in gonads of different wild scurvy-prone fishes

Sex	Species	Size	GSI (% body weight)	AA concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Reference
<u>Females</u>					
	<i>Catla catla</i>	4.66±1.44 Kg	NA	286.34±16.54	Agrawal and Mahajan (1980)
	<i>Labeo rohita</i>	2.45±0.83 Kg	NA	225.30±15.36	
	<i>Cirrhina mrigala</i>	2.75±0.54 Kg	NA	206.81±8.94	
	<i>Gadus morua</i>	NA	0.5-20	100-450	Sandnes & Braekkan(1981)
	<i>Salvelinus alpinus</i>	12-14 cm	7.5-20	200-344	Dabrowski (1991)
	<i>Chirostoma estor estor</i>	13.77±2.46 cm	0.27-0.47	38.58 ± 11.58	This work
<u>Males</u>					
	<i>Catla catla</i>	4.66±1.44 Kg	NA	209.56±20.21	Agrawal and Mahajan (1980)
	<i>Labeo rohita</i>	2.45±0.83 Kg	NA	199±12.64	
	<i>Cirrhina mrigala</i>	2.75±0.54 Kg	NA	135.75±10.24	
	<i>Salvelinus alpinus</i>	12-14 cm	8-10	60-90	Dabrowski (1991)
	<i>Chirostoma estor estor</i>	15.54±1.01 cm	0.11-0.25	81.43 ± 24.61	This work

GSI: Gonadosomatic index

NA: Not analyzed

References

- Agrawal NK, Mahajan CL (1980). Comparative tissue ascorbic acid studies in fishes. *J Fish Biol* 17: 135-141.
- Alexis MN, Nengas I, Fountoulaki E, Papoutsi E, Andriopoulou A, Koutsodimou M, Gabaudan J (1999). Tissue ascorbic acid levels in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fingerlings fed diets containing different forms of ascorbic acid. *Aquaculture*, 179: 447-456.
- Armijo OA, Sasso YL (1976). Observaciones preliminares en acuarios sobre incubación y alevinaje de aterínidos (*Chirostoma* spp.) del lago de Pátzcuaro, Michoacán. Fideicomiso para el desarrollo de la Fauna Acuática (3). 13pp.
- Dabrowski K (1991). Ascorbic acid status in high-mountain charr, *Salvelinus alpinus*, in relation to the reproductive cycle. *Environmental Biology of Fishes*, 31: 213-217.
- Dabrowski K, Ciereszko A (1996). The dynamics of gonad growth and ascorbate status in yellow perch. *Aquaculture Research*, 27: 539-542.
- Gabaudan J, Verlhac V (2001). Critical review of the requirements of ascorbic acid in cold and cool water fishes (salmonid, percids, plecoglossids and flatfishes). *In: Dabrowski K (2001). Ascorbic Acid in aquatic organisms. Status and perspectives. CRC Press. U.S.A. 33-48 pp.*
- Henrique M, Gomes E, Gouillou-Coustans M, Oliva-Tele A, Davies S (1998). Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 161(1-4): 415-426.
- Hilton JW, Cho CY, Slinger SJ (1977). Evaluation of the ascorbic acid status of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Fish Res Board Can* 34: 2207-2210.
- Lara VA (1974). Aspectos del cultivo extensivo e intensivo del pescado blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor estor*, Jordan 1879. Actas del Simposio sobre Acuicultura en América Latina. Documentos de Investigación. Montevideo, Uruguay. Informes de Pesca, FAO, Roma. 159(1): 113-116.
- Lee KJ, Dabrowski K (2004). Long-term effects and interactions of dietary vitamins C and E on growth and reproduction of yellow perch, *Perca flavescens*. *Aquaculture*, 230: 377-389.
- Li MH, Wise DJ, Robinson EH (1998). Effect of dietary vitamin C on weight gain, tissue ascorbate concentration, stress response and disease resistance of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J World Aquacult Soc* 29(1): 1-8.
- Lim C, Lovell RT (1978). Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J Nutr* 108: 1137-1146.
- Lim C, Klesius PH, Li MH, Robinson E (2000). Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture*, 185: 313-327.
- Lygren B, Sveier H, Hjeltnes B, Waagbo R (1999). Examination of the immunomodulatory properties and the effect on disease resistance of dietary bovine lactoferrin and vitamin C fed to Atlantic salmon (*Salmo salar*) for a short-term period. *Fish Shellfish Immunology*, 9: 95-107.
- Martínez-Palacios CA, Barriga Tovar E, Taylor JF, Ríos Durán G, Ross LG (2002a). Effect of temperature on growth and survival of *Chirostoma estor estor*, Jordan 1879, monitored using a simple video technique for remote measurement of length and mass of larval and juvenile fishes. *Aquaculture*, 209: 369-377.
- Martínez-Palacios CA, Ríos-Durán MG, Campos Memdoza A, Toledo Cuevas M, Aguilar-Valdez MC, Ross LG (2002b). Progresos en el cultivo del pescado blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor estor*. *Ciencia Nicolaita*, 32: 73-90.
- Martínez-Palacios CA, Comas Morte J, Tello-Ballinas JA, Toledo-Cuevas M, Ross LG (2004). The effects of saline environments on survival and growth of eggs and larvae of *Chirostoma estor estor* Jordan 1880 (Pisces: Atherinidae). *Aquaculture*, 238: 509-522.
- Montero D, Marrero M, Izquierdo MS, Robaina L, Vergara JM, Tort DL (1999). Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture*, 171: 269-278.
- Pankhurst N, Van der Kraak G (1997). Effects of stress on reproduction and growth of fish. *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Iwama, G., Pickering, A., Sumpter, J., Schreck, C. (eds.). Cambridge UK. Cambridge University Press. 62: 73-93.
- Papp ZS GY, Saroglia M, Jeney ZS, Terova-Saroglia G (1997). Methodological study on the determination of vitamin C requirements of different fish species. Reports of intersessional working parties meetings, 1997. N° 541, suppl., p123.
- Papp ZS GY, Saroglia M, Terova G (1998). An improved method for assay of vitamin C in sample series of fish feed and tissues. *Chromatographia*, 48(1/2): 43-47.
- Patro UKN, Patnaik BK (1979). Change in ascorbic acid, glycogen and protein of muscle and brain of *Ophiocephalus punctatus* Bloch following short-term cold stress. *Indian J exp Biol* 17: (521-522).
- Robinson EH (1989). Vitamin C in catfish nutrition. Delta Branch Experiment Station, Mississippi State University, Takeda, USA.
- Saborowski R, Koprivnjak JF, Sisak MM, Sahling G, Buchholz F, Lum KR, Schneider R (1997). Ascorbic acid in the gonads of North Sea dab (*Limanda limanda*) during the reproductive cycle. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 54: 2847-2852.
- Sandnes K, Braekkan OR (1981). Ascorbic acid and the reproductive cycle of ovaries in cod (*Gadus morhua*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 70A: 545-546.
- Seymour EA (1981). The effects of powdered carp pituitary on ovarian development, ovarian ascorbic acid and ovulation in *Carassius carassius* L. exposed to various photoperiod and temperature regimes. *J Fish Biol*, 19: 675-682.
- Thomas P (1984). Influence of some environmental variables on the ascorbic acid status of mullet, *Mugil cephalus* L., tissues. I. Effect of salinity, capture-stress and temperature. *J Fish Biol*, 25: 711-720.
- Wee KL (1996). The role of vitamin C in aquaculture. Proceedings of the seminar on fisheries multibillion dollar industry held at Madras, India. August 17-19, 1995. Krishnamoorthi, B., Krishnamoorthi, K. Meenakshisundaram, P., K. Nayar (eds.). Madras India Aquaculture Foundation of India. 50-62pp.