



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**Centro Interdisciplinario De Ciencias Marinas**

**Departamento de Desarrollo de Tecnologías**



**Evaluación de métodos para determinar la condición nutricional  
de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*  
(Percoidei:Serranidae) en cultivo.**



**TESIS**

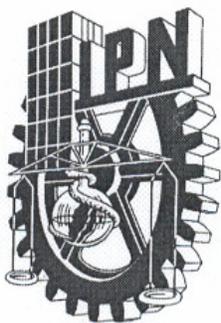
Que para obtener el grado de  
**Maestro en Ciencias**  
con Especialidad en Manejo de Recursos Marinos.

Presenta

**Biol. Mar. Hugo Skyol Pliego Cortés**

La Paz, BCS.

Noviembre, 2005.



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 17 del mes Octubre del año 2005, el (la) que suscribe HUGO SKYOL PLEIGO CORTÉS alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro A030417 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: DRA. SILVIE DUMAS y cede los derechos del trabajo titulado: “EVALUACIÓN DE MÉTODOS PARA DETERMINAR LA CONDICIÓN NUTRICIONAL DE LARVAS DE CABRILLA ARENERA *Paralabrax maculatofasciatus* (PERCOIDEI:SERRANIDAE) EN CULTIVO” al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: skyolness@msn.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
**HUGO SKYOL PLEIGO CORTÉS**

*nombre y firma*



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
*ACTA DE REVISION DE TESIS*

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 10:00 horas del día 10 del mes de Octubre del 2005 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

**“EVALUACIÓN DE MÉTODOS PARA DETERMINAR LA CONDICIÓN NUTRICIONAL DE LARVAS DE CABRILLA ARENERA *Paralabrax maculatofasciatus* (PERCOIDEI:SERRANIDAE) EN CULTIVO”**

Presentada por el alumno:

**PLIEGO**

Apellido paterno

**CORTÉS**

materno

**HUGO SKYOL**

nombre(s)

Con registro: 

A	0	3	0	4	1	7
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis  
PRIMER VOCAL

*[Signature]*  
DRA. SILVIE DUMAS

PRESIDENTE

*[Signature]*  
DRA. LAURA SÁNCHEZ VELASCO

SECRETARIO

*[Signature]*  
DR. GERARDO ACEVES MEDINA

SEGUNDO VOCAL

*[Signature]*  
DR. BENJAMÍN H. ANGUAS VÉLEZ

TERCER VOCAL

*[Signature]*  
DR. RENATO PEÑA MARTÍNEZ

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

*[Signature]*  
DR. RAFAEL CÉRVANTES DUARTE



**L. P. N.**  
**CICIMAR**  
**DIRECCION**

**DEDICATORIA**

*AB IMO PECTORE*

*A mi amado Padre*

*Fermín Pliego Díaz*

*In memoriam.*

*Aunque no estés aquí físicamente para ver concluido este trabajo,  
te lo dedico y sé que estarás orgulloso.*

## **A G R A D E C I M I E N T O S**

Durante la realización de este ejercicio han sido numerosas las personas que, de una u otra forma, colaboraron para llevarla al final. A todos ustedes mi más sincero agradecimiento.

Por las becas otorgadas, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

Por tu invaluable aportación profesional y personal.

Por compartir tus conocimientos y amplia experiencia, por tu confianza y entusiasmo, pues tú animo para realizar este trabajo nunca decayó y gracias a ellos, me ayudaron a pasar sobre las piedritas del duro camino recorrido para realizar esta tesis, en verdad que fue duro, de principio a fin. Fue demasiado tiempo, pero espero que valga la pena.

Por tu amistad.

Dra. Silvie Dumas.

Por tu ingenio compartido, asesoramiento y aliento continuo, gracias a ellos el presente trabajo fue sumamente enriquecido y además, porque tu esfuerzo y dedicación me han servido de guía durante estos tres largos años.

*Por la tesis del destino...*

Dr. Renato Peña Martínez.

Mi más sincero reconocimiento, Silvie y Renato.

Por sus muchos acertados comentarios que me han servido en lo laboral y en lo personal.  
M.C. Dora Esther Hernández Ceballos.

Por su gran apoyo.

M.C. Mauricio Contreras, Cone, Ciro, Tigre, Pablo, Biol. Laura Flores, Dr. Iván Murillo. Y del CIBNOR, M.C. Carmen Jaramillo (Laboratorio de Histología e Histoquímica), Biol. Mar. Adriana Rojas, M.C. Manuel Moreno, Dra. Celia Vázquez y los compas del Lab. De Biotoxinas Marinas (Itzel, Lupita, Alfonso, etc.), a Adrián, Eber y Francisco, por facilitarme el uso de las instalaciones de su laboratorio.

Por las correcciones y sugerencias para enriquecer esta tesis, mi comité revisor.

Drs. Laura Sánchez, Benjamín Anguas y Gerardo Aceves.

Por el valor de la amistad.

SPOCK. Adriana Guevara, Bere nice Hernández, Olga Marcela, Paula Tarelo, Arminda Mejia, Eleonora, Luci, Gloria (mi Chilena), Manuel Calderon, Jorge Rios, Luis Burnes, Raul (Cocho), Juliancito, Alfonso Alcántar, Nicolas Metodo, Benja, Rene Pérez, Gaby Galindo, Damaris, Shelley, Manuel, Iram Zabala, Vladimir, Mario Galaviz... y muchos más que por las prisas no me acuerdo de su nombre pero si de su persona, saben que se les aprecia.

Por mostrarme que la amista está más allá del tiempo y la distancia.

Mis compitas de Toluca.

Saúl Hernández y Jesús Ignacio Consuelo.

Por su incondicional apoyo, por crecer juntos personal y profesionalmente en las buenas y en las malas, mis hermanos del alma.

Heidi Porras, Ulises Méndez, Juan Pablo Alcántar, Mauricio Montoya, Arturo Tecuapetla, Sergio Nigenda. Saben cuanto los quiero.

Por aprender juntos que el amor honesto y verdadero no es utópico.

Huella indeleble en mi vida.

Laura Celis. *Ahi lo vi, harto...*

Por compartir su amor y por mantener unida la familia.

Mi Familia, los Pliego, los Cortés, los Torres, los Mai, los de Huichila.

Por su incondicional apoyo y confianza, por su gran amor,  
pues es el gran motor que mueve mis sueños.

A los seres que me dieron la vida y me predicaron, con el ejemplo,  
a luchar contracorriente, ser honesto y feliz:

MIS PADRES.

Pfrs. Estela Cortés y Fermín Pliego.

Mi más especial y franco agradecimiento y reconocimiento.

A todos ustedes, mil gracias.

## **C O N T E N I D O**

Lista de figuras	<b>iii</b>
Lista de tablas	<b>v</b>
Glosario	<b>vi</b>
Resumen	<b>x</b>
Abstract	<b>xi</b>
1. Introducción	<b>1</b>
1.1 La inanición y sus efectos en las larvas de peces marinos	<b>4</b>
1.2 Condición nutricional en larvas de peces	<b>5</b>
1.2.1 Índice ARN/ADN	<b>6</b>
2. Antecedentes	<b>10</b>
2.1 Métodos de evaluación de la condición nutricional	<b>11</b>
2.2 Cultivo de larvas de cabrilla arenera	<b>14</b>
3. Justificación	<b>17</b>
4. Hipótesis	<b>19</b>
5. Objetivos	<b>20</b>
6. Material y métodos	<b>21</b>
6.1 Experimento I: Primera alimentación	
6.1.1 Obtención y mantenimiento de las larvas	<b>21</b>
6.1.2 Esquema de alimentación	<b>22</b>
6.1.3 Muestreo	<b>22</b>
6.2 Experimento II: Estrategia de destete	
6.2.1 Obtención y mantenimiento de las larvas	<b>23</b>
6.2.2 Esquema de alimentación	<b>23</b>
6.2.3 Muestreo	<b>25</b>
6.3 Herramientas de análisis	
6.3.1 Análisis morfométrico	<b>26</b>

6.3.2 Análisis histológico	27
6.2.3 Análisis bioquímico	29
6.3.3.1 Homogenizado de las muestras	30
6.3.3.2 Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos	30
6.3.3.3 Cuantificación de proteínas totales	31
6.4 Análisis estadístico	32
7. Resultados	33
7.1 Primera alimentación	
7.1.1 Análisis morfométrico	33
7.1.2 Análisis histológico	36
7.1.3 Análisis bioquímico	39
7.2 Estrategia de destete	
7.2.1 Análisis morfométrico	41
7.2.2 Análisis histológico	44
7.2.3 Análisis bioquímico	52
8. Discusión	
8.1 Primera alimentación	54
8.2 Estrategia de destete	62
8.3 Comparación y selección de los indicadores de la condición nutricional	68
9. Conclusiones	73
10. Recomendaciones	75
11. Literatura citada	77
Anexo 1	94
Anexo 2	95
Anexo 3	96

## Lista de figuras.

- Figura 1. Contenido de ARN y ADN en una larva en inanición (izquierda) y una larva alimentada (derecha). 7
- Figura 2. Modelo teórico del índice ARN/ADN en larvas de peces. 8
- Figura 3. Esquema de alimentación empleado para la crianza larvaria de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. 24
- Figura 4. Larva de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, donde se indican las variables morfométricas evaluadas. 26
- Figura 5. Microfotografía de larva de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, donde se muestra los intestinos y el hígado, 2dde (a). Microsecciones del intestino anterior (b) y del hígado (c). 29
- Figura 6. Peso seco y longitud notocordal de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* en la primera alimentación. 33
- Figura 7. Morfometría de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* en la primera alimentación. 35
- Figura 8. Microsecciones del tubo digestivo de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, día 4dde. 37
- Figura 9. Microsecciones del hígado de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, día 4dde. 38
- Figura 10. Altura de los enterocitos y área nuclear de los hepatocitos de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, durante la primera alimentación. 39
- Figura 11. Concentración de ARN, ADN, Índice ARN/ADN y proteínas totales de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* durante la primera alimentación. 40
- Figura 12. Peso seco y longitud notocordal de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, durante el destete. 41
- Figura 13. Morfometría de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, durante el destete. 43

- Figura 14. Microsecciones del hígado de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, día 21dde. 45
- Figura 15. Microsecciones del hígado de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* alimentadas con dieta microparticulada, día 21dde. 46
- Figura 16. Microsecciones del hígado de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, día 27dde. 47
- Figura 17. Microsecciones del hígado de larvas de cabrilla arenera durante *Paralabrax maculatofasciatus*, día 33dde. 48
- Figura 18. Microsecciones del intestino anterior de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, día 21dde. 49
- Figura 19. Microsecciones del intestino anterior de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, día 27dde. 50
- Figura 20. Microsecciones del intestino anterior de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, día 33dde. 51
- Figura 21. Altura de los enterocitos y área nuclear de los hepatocitos de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* durante el destete. 52
- Figura 22. Concentración de ARN, ADN, Índice ARN/ADN y proteínas totales de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* durante el destete. 53

## Lista de tablas.

Tabla 1. Índices ARN/ADN determinados en diversas especies de larvas de peces sometidas a periodos prolongados de inanición. 13

Tabla 2. Formulación y composición química proximal de la dieta microparticulada empleada para el destete de larvas de cabrilla arenera, *Paralabrax maculatofasciatus*. 25

Tabla 3. Tasas de crecimiento de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* durante el destete. 42

Tabla 4. Clasificación de la condición nutricional de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* durante dos etapas del cultivo larvario. 72

## Glosario.

**Ácido desoxirribonucleico (ADN):** macromolécula que normalmente está formada por cadenas polinucleotídicas, unidas por puentes de hidrógeno, en la cual el residuo azúcar es la desoxirribosa. Es la principal molécula de almacenamiento de la información genética (Klug y Cummings, 1999; Wilbraham y Matta, 1989).

**Ácido graso:** cualquier ácido carboxílico (molécula orgánica que contiene un grupo carboxilo R-CO<sub>2</sub>H), de cadena lineal, especialmente aquellos cuyas cadenas contienen 12 o más átomos de carbono, pueden ser saturadas o insaturadas al tener uno o varios enlaces dobles (Lehninger, 1998; Wilbraham y Matta, 1989).

**Ácido nucleico:** polímero de ribonucleótidos (ARN) o desoxirribonucleótidos (ADN) que se encuentra principalmente en las células eucarióticas, desempeña un papel importante en la transmisión de las características hereditarias, la síntesis de proteínas y el control de las actividades celulares (Klug y Cummings, 1999).

**Ácido ribonucleico (ARN):** ácido nucleico caracterizado por el azúcar ribosa y la pirimidina uracilo, generalmente un polinucleótido de cadena sencilla, importante componente en la síntesis de proteínas. Se reconocen varios tipos, como el ARN ribosomal, el ARN mensajero y el ARN de transferencia (Klug y Cummings, 1999)

**Alometría:** tipo de crecimiento resultante de un cambio en las proporciones de las estructuras morfológicas durante la ontogenia, este cambio puede implicar diferencias substanciales en la forma del cuerpo (Strauss, 1984).

**Aminoácido:** cualquiera de las subunidades que se unen covalentemente para formar proteínas (Lehninger, 1998; Klug y Cummings, 1999)

**Anabolismo:** proceso sintético en el metabolismo celular para construir moléculas para el crecimiento y la multiplicación celular, también denominado metabolismo constructivo (Wilbraham y Matta, 1989; Lehninger, 1998).

**Apoptosis:** muerte celular implicada en la regulación del desarrollo y crecimiento, puede ser activada como parte del desarrollo normal ó como consecuencia de un daño inducido (Klug y Cummings, 1999; Diccionario esencial de las ciencias, 2001)

**Autolisis:** degradación de los órganos o de las células por sus propias enzimas (Diccionario esencial de las ciencias, 2001)

**Borde plumoso:** proyecciones de la superficie apical de los enterocitos en el intestino conformado por numerosas microvellosidades (Wilbraham y Matta, 1989)

**Carácter morfométrico:** rasgos de la forma de un organismo que pueden ser obtenidos con de la medición sistemática del cuerpo o de sus estructuras morfológicas (Bookstein *et al.*, 1985)

**Catabolismo:** reacciones que se producen en las células vivas en las que las sustancias se degradan y se produce energía, también denominado metabolismo destructivo (Lehninger, 1998; Eckert *et al.*, 1998).

**Coalimentación:** técnica empleada en la acuicultura que consiste en la combinación de alimento vivo y alimento inerte, permite el acondicionamiento de las larvas al alimento inerte para que lo acepten más rápidamente (Rosenlund *et al.*, 1997).

**Destete:** en acuicultura se refiere a la transición de alimento vivo a alimento inerte (Tucker, 1998).

**Enterocitos:** célula epitelial del intestino, su función es la absorción de nutrientes (Eckert *et al.*, 1998).

**Lípido:** amplia clase de compuestos orgánicos procedentes de fuentes naturales, son solubles en solventes orgánicos e insolubles en agua, se incluyen compuestos como las grasas, aceites, ceras, ácidos grasos, fosfátidos, carotenoides, glicolípidos, lipoproteínas etc. (Wilbraham y Matta, 1989, Diccionario esencial de las ciencias, 2001).

**Malnutrición:** Condición causada por una dieta imperfecta o una defectuosa utilización metabólica de los alimentos. Entre las causas más importantes

que la provocan son la deficiencia de ácidos grasos, carbohidratos, aminoácidos y proteínas, entre otras (Diccionario esencial de las ciencias, 2001).

**Metabolismo:** conjunto de reacciones químicas realizadas por los organismos vivos. Virtualmente todas las reacciones metabólicas son catalizadas por enzimas (Lehninger, 1998).

**Microvellosidades:** microproyecciones alargadas con forma de dedo cubiertas cada una por una membrana plasmática, aumentan el área superficial del intestino incrementando así la eficiencia de la absorción de nutrientes (Wilbraham y Matta, 1989; Diccionario esencial de las ciencias, 2001).

**Nutrición heterotrofa:** tipo de nutrición propia de los animales, en la cual la energía procede de los procesos de digestión de algunas sustancias orgánicas y se utilizan para biosintetizar los materiales requeridos para el desarrollo del organismo, mediante el cual éstos utilizan el alimento para la obtención de la energía relativa al crecimiento, mantenimiento y reparación (Eckert *et al.*, 1998; Diccionario esencial de las ciencias, 2001).

**Nutriente:** elemento, sustancia o compuesto empleado por los organismos para el crecimiento, mantenimiento y reparación (Diccionario esencial de las ciencias, 2001).

**Péptido:** compuesto formado por la unión de dos o más aminoácidos mediante enlaces peptídicos (Lehninger, 1998).

**Proteína:** cualquier péptido con más de 100 residuos de aminoácidos, sus constituyentes principales son el carbón, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre y algunas veces fósforo (Wilbraham y Matta, 1989).

**Ribosoma:** orgánulo celular que participa en la biosíntesis de proteínas. En su estructura figuran proteínas y ARN ribosomal, por lo general se encuentran en el retículo endoplásmico, en las mitocondrias y en los cloroplastos (Eckert *et al.*, 1998; Diccionario esencial de las ciencias, 2001).

**Síntesis de proteínas:** proceso mediante el cual las células sintetizan proteínas a partir de aminoácidos. Tiene lugar en el citoplasma de las células

eucarióticas. La síntesis de todas las proteínas está controlada por los genes (Wilbraham y Matta, 1989; Eckert *et al.*, 1998).

**Stock:** población ó conjunto de individuos de una misma especie, que habitan en un lugar y tiempo dado y permanecen reproductivamente aislados de otras especies próximas (Diccionario esencial de las ciencias, 2001).

**Triacilglicérido:** lípido simple formado por glicerol y tres moléculas de un tipo de ácido graso (triéster), también puede ser un lípido mixto, es decir un triéster con componentes de ácidos grasos diferentes, las grasas animales y vegetales son mezcla de varios triacilglicéridos mixtos diferentes (Wilbraham y Matta, 1989).

**Vacuola digestiva:** lisosoma secundario formado por la acumulación de sustancias de reserva absorbidas por la célula (Eckert *et al.*, 1998, Diccionario esencial de las ciencias, 2001).

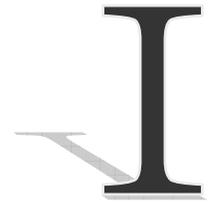
## Resumen.

Se evaluaron y compararon métodos morfométricos, histológicos y bioquímicos para determinar la condición nutricional de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* en dos etapas importantes del cultivo: la primera alimentación y el destete. La primera alimentación se evaluó ofreciendo rotíferos *Brachionus plicatilis* (5/ml) a 3 tanques y restringiendo completamente el alimento a otros 3 tanques. Las muestras se tomaron diariamente a partir del día 2 después de la eclosión (dde) hasta el día 5dde. Se tomaron 30 larvas para la morfometría, 20 para el peso seco, 15 para la histología y 50 para la bioquímica. Para el destete, se siguió el procedimiento del laboratorio para la crianza larvaria de la cabrilla arenera hasta el día 17dde, en ese momento, a 3 tanques se les ofreció alimento vivo (AV) nauplios de *Artemia* (5/ml) y a otros 3 tanques, una dieta microparticulada (DMP) se realizó una coalimentación de 4 días, con proporciones aproximadas de 75:25, 50:50, 50:50 y 25:75 (AV:DMP). Las muestras se tomaron cada 6 días, del día 15dde hasta el día 33dde. Para la morfometría, el peso seco y la histología se tomaron 10 larvas en el día 15dde, 5 larvas en el día 21dde y 3 larvas para los días 27 y 33dde, respectivamente para cada análisis. Para la bioquímica, se tomaron 10 larvas en el día 15dde y 3 larvas a partir del día 21dde. Se evaluaron 8 variables morfométricas: Longitud notocordal (LN), longitud total (LT), diámetro ocular (DO), longitud del premaxilar (LPM), longitud cefálica (LC), longitud céfalo-ano (LCA), altura de la cabeza (AC) y altura del músculo (AM), se determinó el peso seco y para el destete la tasa de crecimiento específica (TCE) y absoluta (TCA). Para el análisis histológico, los cortes se obtuvieron empleando la técnica de inclusión en parafina y tinción con hematoxilina-eosina y se midió la altura de los enterocitos y el área nuclear de los hepatocitos. Para el análisis bioquímico, se cuantificaron los ácidos nucleicos con la técnica de Schmidt-Thannhauser (Munro y Fleck, 1966) adaptada para larvas de peces marinos (Buckley, 1979) y las proteínas totales con la técnica de Lowry *et al.* (1951). En la primera alimentación, el índice ARN/ADN y el peso seco fueron los indicadores más sensibles, al detectar el estado de inanición debido a una pobre condición nutricional en las larvas sin alimento, desde el día 3dde. El tiempo de respuesta fue menor con respecto a la morfometría e histología (4dde). El índice ARN/ADN podría emplearse para evaluar la calidad de las larvas al comenzar una corrida larvaria, previo a la primera alimentación, ya que desde el día 2dde se detectó una condición nutricional intermedia. En el destete, el peso seco, la altura de los enterocitos, el área nuclear de los hepatocitos, el índice ARN/ADN y las proteínas totales fueron los más sensibles, al detectar una deficiente condición nutricional desde el día 21dde en las larvas destetadas. El análisis morfométrico fue el más tardado, ya que mostró diferencias en el día 27dde con 4 variables (LT, LN, LCA y AM) y hasta el día 33dde con las TCE y TCA. Estos resultados nos sugieren que las larvas destetadas presentaron señas de malnutrición. Por la simplicidad del método de extracción de ácidos nucleicos, la objetividad y el tiempo de respuesta, se postuló al índice ARN/ADN como uno de los mejores indicadores para detectar la condición nutricional y la calidad de las larvas de cabrilla arenera.

## Abstract.

Morphometrical, histological and biochemical methods were used to determine nutritional condition in spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae in two important culture stages: first feeding and weaning. The first feeding was evaluated offering rotifers *Brachionus plicatilis* (5/ml) to 3 tanks and restricting the food completely to other three ones. The samples were taken daily starting on day 2 after hatching (dah) until 5dah. 30 larvae were taken for morphometry, 20 for dry weight, 15 for histology and 50 for biochemistry. For weaning, the feeding schedule was as follow: until day 17dah, the normal procedure used in the laboratory for spotted sand bass larval rearing were followed for all tanks. On this day, live food (LF) were offered to 3 tanks, *Artemia* nauplii (5/ml) and a microparticulate diet (MPD) to the other three tanks. In these three last tanks, a cofeeding period of 4 days was applied with the following proportions of 75:25, 50:50, 50:50 and 25:75 (LF:MPD). The samples were taken every 6 days, from 15dah until 33dah. Ten larvae were sampled for morphometry, dry weight and histology on 15dah, 5 on 21dah and 3 on 27 and 33dah. For biochemical analysis, 10 larvae were sampled on 15dah. From 21dah until 33dah, three larvae were sampled. For the morphometrical analysis, 8 characters were evaluated: notochordal length (NL), total length (TL), eye diameter (ED), mandible length (ML), cephalic length (CL), cephalic-anus length (CAL); head depth (HD) and body depth (BD). Dry weight, specific and absolute growth rates were also determined. For the histological analysis, samples were embedded in paraffin and stained in hematoxylin-eosin. The enterocyte height and the nuclear hepatocyte area were measured using a Image analysis system. For biochemical analysis, the nucleic acids were quantified with Schmidt-Thannhauser method adapted for marine fish larvae (Buckley, 1979) and the total proteins, with Lowry *et al.*, method (1951). In the first feeding, the RNA/DNA ratio and dry weight were the most sensitive indicators, they detected the starving state due to a poor nutritional condition in food restricted larvae, from 3dah. The time of answer was smaller respect to the morphometrical and histological methods (4dah). In weaning experiment, dry weight, enterocyte height, nuclear hepatocyte area, RNA/DNA ratio and total proteins were the most sensitive indicators to detecte a deficient nutritional condition in larvae weaned from 21dah. Differences were detected later on day 27dah with the morphometric analysis. These differences appeared in 4 characters (NL, TL, CAL, BD). Differences in the specific and absolute growth rates appeared only on 33dah. These results suggest that the weaned larvae showed signals of malnutrition. In spite of good results obtained with different indicators, RNA/DNA appears the most promising indicator to detect the nutritional condition and quality of the spotted sand bass larvae for the simplicity of nucleic acids extraction method and the objectivity in the determination.

## INTRODUCCIÓN



Las pesquerías de organismos marinos enfrentan una creciente presión social, originada por el crecimiento demográfico, el deterioro de las condiciones económicas y la alta demanda de alimentos, lo que ha traído como consecuencia la persistencia de prácticas pesqueras dirigidas a especies de alto valor comercial y por ende, en muchos casos la estabilización en sus volúmenes de captura. Frente a esta demanda de productos de origen marino, el cultivo de peces marinos representa una buena fuente para generar alimentos con alto valor proteínico (Bernabé, 1998).

En las últimas décadas la producción acuícola de peces marinos ha mostrado tendencias al aumento y, por esto, la demanda de semilla también se ha incrementado año tras año. La base principal para un cultivo exitoso, es el abastecimiento en número suficiente, constante y de buena calidad de semilla. Es por ello, que el cultivo de larvas de peces marinos ha recibido gran interés, dado que el abastecimiento de semilla del medio natural no asegura un aporte constante y pone en riesgo a las poblaciones naturales y a los esquemas de producción.

Sin embargo, la producción de semilla de peces marinos es muy complicada, ya que la gran mayoría de éstas especies presentan una ontogenia indirecta, es decir que atraviesan por un periodo larvario (Balon, 1984). La dificultad de éste periodo, radica en que las larvas eclosionan sin estar completamente formadas, carecen de un estómago morfológicamente funcional y un sistema visual poco desarrollado. Una vez que absorben las reservas maternas (vitelo y gota de aceite), requieren de una fuente exógena de alimento, en este momento la larva deberá estar capacitada para ingerir (acción que implica la

búsqueda y captura del alimento) y procesar (digestión, absorción y metabolismo) el alimento nuevo para evitar morir por inanición (Govoni, 1980; Segner, *et al.*, 1993).

Las especies con ontogenia indirecta son las que presentan una problemática más compleja para su alimentación. Este periodo es el más complicado y se convierte en un punto clave debido a que se han reportado las tasas más altas de mortalidad (Hunter, 1981). Estudios de larvicultura han detectado dos etapas críticas en este periodo originadas por la inanición y la presencia de un alimento artificial: la primera alimentación exógena y el destete, en las cuales, la supervivencia y el crecimiento de las larvas está determinada por la calidad, la disponibilidad del alimento y la habilidad para consumirlo (Blaxter, 1988). Es por ello que se deberá seleccionar un alimento adecuado que cubra las necesidades nutricionales y se adapte a las características morfofisiológicas de las larvas (Dabrowski, 1984; Tucker, 1998).

Los dos tipos principales de alimento suministrado durante el cultivo larvario son el alimento vivo y el alimento artificial. En la mayoría de los casos, la dieta inicial de las larvas son las presas vivas (microzooplacton), ya que proporcionan tamaño adecuado y movilidad reducida, calidad nutricional, digestibilidad y aceptabilidad; entre estos figuran los rotíferos, la *Artemia* y los copépodos.

Los rotíferos *Brachionus plicatilis* (small) y *B. rotundiformis* (super small), generalmente son empleados como primera dieta, por su variedad de tallas, desde 60  $\mu\text{m}$  (neonatos) hasta 300  $\mu\text{m}$  (adultos) de acuerdo con la cepa y las condiciones de cultivo, sus altas tasas de crecimiento poblacional permiten mantener su cultivo en densidades altas (Lubzens, 1987). La *Artemia*, que comúnmente representa el alimento sucesivo al rotífero y el nexo con el alimento inerte, puede emplearse en distintos tiempos por su tamaño (300-500  $\mu\text{m}$ ) y sus estadios de vida (nauplio, metanauplio, juvenil y adulto) (Sorgeloos, 2001). Ambos organismos carecen de ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs), los cuales son esenciales para un crecimiento normal y una buena supervivencia de las

larvas (Watanabe, 1988), por ello deben de enriquecerse con emulsiones ricas en HUFAs (elaboradas o comerciales) antes de ser ofrecidos a las larvas.

Los copépodos presentan un alto contenido de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA's) y una gran variedad de tallas (desde 50 micras) y estadios de vida (6 estadios naupliares y 6 copepoditos) que permite su amplio uso de acuerdo a la edad y el tamaño de boca de la larva, sin embargo, su uso masivo es limitado debido a que resulta complicado cultivarlos y obtener densidades suficientes para soportar un cultivo. Algunas especies que se cultivan son *Acartia tonsa*, *Paracalanus sp.*, *Euterpina acutifrons*, *Tigriopus japonicus* y *Tisbe furcata* (Tucker, 1998).

El otro tipo de alimento suministrado durante el cultivo larvario, es el alimento artificial ó inerte y se ofrece para sustituir el alimento vivo, a esta sustitución se le denomina destete. Ofrecer alimento artificial es una alternativa que ofrece menores costos de producción, fácil disponibilidad en el mercado y una amplia gama de formulación nutricional (Lazo, 2000). Los tipos principales de dietas artificiales son los microparticulados, los microencapsulados y las partículas complejas (Tucker, 1998; Chu y Ozkizilcik, 1999; Cahu y Zambonino-infante, 2001).

No obstante, en la mayoría de los casos no se ha logrado igualar la supervivencia ni el crecimiento de las larvas alimentadas con presas vivas, en comparación con las larvas alimentadas con dietas artificiales. El éxito limitado de este tipo de alimento puede atribuirse a factores diversos, tanto de las dietas (tamaño, homogeneidad y densidad de partículas, balance nutritivo, estabilidad en el agua, atractabilidad, palatabilidad y digestibilidad) como bióticos y abióticos dentro del sistema de cultivo (Tucker, 1998), así como a las particularidades del sistema digestivo característico de la etapa larval, mismas que implican cambios inherentes a una diferenciación estructural y funcional y que están relacionados con los procesos enzimáticos y con los mecanismos de absorción de nutrientes (Lazo, 2000).

Adicionalmente, se ha empleado la técnica denominada coalimentación, la cual consiste en la combinación de alimento vivo con alimento inerte e ir agotando el alimento vivo hasta que únicamente se proporcione alimento inerte. Esta técnica sirve de acondicionamiento a las larvas para que acepten la dieta inerte (Rosenlund *et al.*, 1997).

Cualquiera que sea el alimento, es imprescindible conocer el efecto que tiene sobre el organismo, ya que la carencia de alimento o las deficiencias en la ingestión, digestión y/o asimilación de los alimentos puede causar periodos de inanición que, de acuerdo a la especie y el tiempo en inanición, afectará significativamente el crecimiento y la sobrevivencia de las larvas, e incluso, puede provocar la muerte.

### **1.1. La inanición y sus efectos en las larvas de peces marinos.**

La muerte por inanición para las larvas ocurre después de estar sometidas a periodos sin alimento, mas o menos prolongados según la especie (Clemmesen, 1987). En el medio marino es poco probable encontrar condiciones de inanición absoluta, incluso estudios de campo han revelado que la proporción de larvas en inanición es relativamente baja (Elliott y Lagget, 1997, Ramírez *et al.*, 2004). Más que la muerte directa por inanición, las larvas son removidas selectivamente de la población como consecuencia de su debilitamiento y por la disminución del grado de crecimiento, debido a la baja disponibilidad de presas. Es así como las larvas permanecen mas tiempo en las clases de talla más vulnerables a los depredadores, causando, por consiguiente, una reducción en la sobrevivencia (Rooker y Holt, 1996). Esto afecta fuertemente el reclutamiento de juveniles que se incorporan a un stock, pues se han reportado tasas de mortalidad mayores al 90% para este periodo (O'Connell, 1976; Theilacker, 1978).

En los sistemas de cultivo larvario, aún y cuando se tratan de proporcionar las mejores condiciones (bióticas y abióticas) para favorecer la ingesta de los alimentos, pueden presentarse periodos de inanición. Si este periodo es

relativamente corto las larvas pueden recuperar su condición. Contrariamente, si el periodo de inanición se prolonga demasiado, la larva puede alcanzar el denominado punto de no retorno, tras el cual, aunque se facilite el alimento, la larva es incapaz de alimentarse y muere debido a que sufre un severo deterioro físico y fisiológico (Blaxter y Hempel, 1963; Hunter, 1981; Yin y Blaxter, 1987).

Los efectos de la inanición en las larvas, ya sea en el medio natural o en sistemas de cultivo, pueden ser detectados por medio de indicadores de la condición nutricional, como son los morfométricos, histológicos ó bioquímicos (O'connell, 1976; Bulow, 1987; Buckley, 1979; Theilacker y Watanabe, 1989).

## 1.2 Condición nutricional en larvas de peces.

La condición nutricional ha sido considerada como un indicador del estado de salud o fisiológico del organismo. Algunos autores se refieren a la fortaleza física, estado sanitario o potencial biológico del organismo que puede reflejarse mediante el crecimiento y la sobrevivencia (Murphy *et al.*, 1991; Pope y Kruse, 2001). La condición nutricional ha sido determinada por diferentes métodos, los cuales pueden agruparse con base a los niveles de organización biológica que integran: a nivel del organismo, de los tejidos y de las biomoléculas.

A nivel del organismo, el interés se enfoca en detectar cambios morfológicos, en la forma y tamaño del cuerpo de tal manera que se puedan expresar diferencias por medio de tasas, vectores y ecuaciones de las medidas corporales. La relación peso/longitud, el tipo de crecimiento y diversos caracteres morfométricos (longitud total y notocordal, altura de la cabeza, diámetro del ojo, altura del cuerpo, etc) se han empleado como indicadores de la condición nutricional, dado que implican que el uso de las reservas energéticas de los tejidos se reflejan en el aumento ó disminución en longitud y peso (Theilacker, 1978; Pope y Kruse, 2001). Sin embargo, los resultados de estas estimaciones no siempre resultan lo suficientemente explícitos ni sensitivos a cambios específicos en la condición, debido a factores como la pérdida concurrente de peso y longitud

durante periodos de inanición, por efectos del crecimiento alométrico y la osificación del esqueleto (Yin y Blaxter, 1987).

A nivel histológico, la condición de las larvas ha sido identificada mediante comparaciones en las modificaciones en el arreglo, la apariencia y el tamaño de las células. Así, en larvas mal alimentadas y en inanición se observan alteraciones en los epitelios, desorganización celular y necrosis en tejidos (O'Connell, 1976; Theilacker, 1978; Hopher, 1993).

A nivel bioquímico, la cuantificación de biomoléculas y constituyentes químicos utilizados como sustratos energéticos han permitido identificar la condición en larvas de peces (Buckley y Bulow, 1987; Pope y Kruse, 2001). Por ejemplo, los lípidos, las proteínas, los aminoácidos, los ácidos nucleicos y las proteasas digestivas (tripsina y quimiotripsina) (Dabrowski *et al.*, 1986; Govoni *et al.*, 1986; Weber *et al.*, 2003). Entre ellos, la determinación de ácidos nucleicos en los tejidos de los individuos durante las diferentes etapas de su desarrollo, sirve para obtener una mejor comprensión de la fisiología de los organismos (Bulow; 1987), particularmente la relación ARN/ADN, representa una herramienta de alto desempeño y fácil empleo, debido a que se pueden inferir funciones relacionadas con la formación de los tejidos y de la condición nutricional del individuo.

Otros estudios sugieren que el comportamiento alimenticio en las larvas de peces, puede ser un indicador de la condición. Sin embargo, su uso aun está limitado debido a que no representan una medida constante y universal para estimar con precisión las diferencias en el desarrollo del organismo, ya que no establecen una relación directa con los procesos celulares determinantes del crecimiento (Fuiman *et al.*, 1998).

### 1.2.1 Índice ARN/ADN.

El contenido de ácido desoxiribonucleico (ADN) en una célula, organismo o especie determinada es virtualmente constante en los tejidos somáticos normales y no puede ser alterado por circunstancias ambientales, ni por cambios nutricionales o del metabolismo celular, de tal manera que las concentraciones de

ADN en los tejidos reflejan una referencia estándar para determinar el número de células en un tejido (Bulow, 1987).

Por el contrario, la cantidad de ácido ribonucleico (ARN) celular, principalmente el ribosomal, que está disponible en los tejidos es directamente proporcional al nivel de síntesis de proteínas, y sí puede ser afectado por la condición nutricional. Así, la proporción entre el contenido de los ácidos nucleicos ARN/ADN en los tejidos de los individuos durante las diferentes etapas de desarrollo, permite inferir funciones relacionadas con la formación de los tejidos y de la condición fisiológica del organismo, debido a que refleja la intensidad metabólica celular y su crecimiento potencial (Fig. 1) (Bulow, 1987; Buckley y Bulow, 1987).

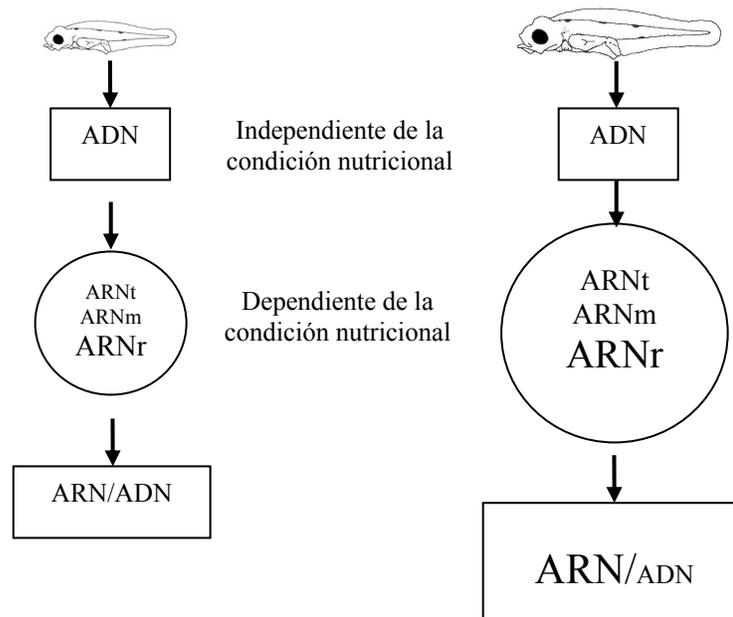


Figura 1. Contenido de ARN y ADN en una larva en inanición (izquierda) y una larva alimentada (derecha). El tamaño de las letras representa la cantidad de ácidos nucleicos. Un alto índice ARN/ADN refleja una mejor condición nutricional. ARNt-ARN de transferencia, ARNm-ARN mensajero, ARNr-ARN ribosomal (Tomado de Clemmesen, 1996).

Clemmesen (1996) propone un modelo teórico para entender el papel del ARN/ADN como indicador de la condición nutricional (Fig. 2). El modelo está constituido por 3 fases. En una larva bien alimentada la cantidad de ARN y la actividad de los ribosomas es alta. Sin embargo, cuando el alimento es retirado, la actividad de los ribosomas decrece (fase I); si este periodo sin alimento se prolonga, alcanzará un nivel en que los ribosomas comienzan a degradarse y a perderse ARN (fase II). Finalmente, el número de ribosomas y el contenido de ARN disminuyen fuertemente, hasta el grado en donde el contenido de ARN es similar o igual al de ADN, entonces el índice ARN/ADN alcanza el valor mínimo necesario para sobrevivir (fase III). Este valor es de 1.0 independientemente de la especie (Tabla 1). La escala de tiempo de la reacción para cada fase depende de la especie, edad y temperatura. Así, las larvas más grandes serán más resistentes a la inanición y requieren de mayor tiempo para llegar a la fase III (Buckley 1979; Clemmesen, 1996).

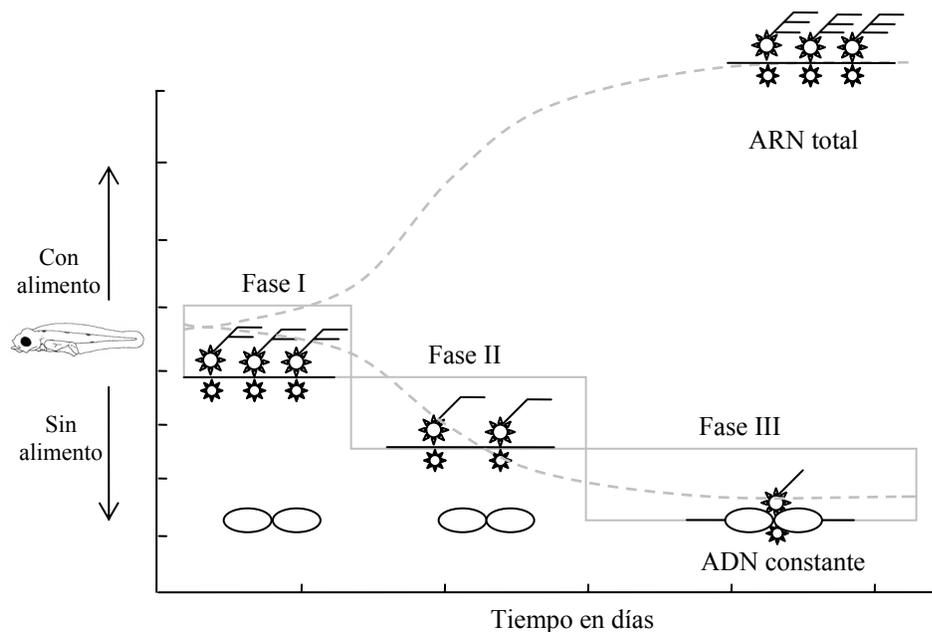
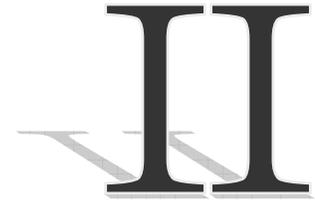


Figura 2. Modelo teórico del índice ARN/ADN en larvas de peces. Los óvalos representan el ADN, los asteriscos a los ribosomas y las barras sobre los asteriscos a la actividad de los ribosomas. Un mayor número de barras representa una alta actividad ribosomal. Conforme se incrementa el tiempo en inanición, primero disminuye la actividad ribosomal (Fase I) y luego el número de ribosomas (Fase II). Mientras que el ADN se mantiene constante, así la cantidad total de ARN y ADN se igualan (Fase III) y se obtiene un índice de 1.0 (Modificado de Clemmesen, 1996).

Actualmente, los esfuerzos de investigación se dirigen a determinar las condiciones que permitan incrementar la sobrevivencia y el crecimiento larvario. Considerando que gran parte del crecimiento larval está determinado por la calidad, cantidad y disponibilidad del alimento y sus efectos pueden ser detectados por medio de indicadores morfométricos, histológicos y bioquímicos. Esta tesis pretende contribuir en la implementación de un indicador lo suficientemente explícito y objetivo de la condición nutricional, que permita estimar el potencial de crecimiento y detectar alteraciones nutricionales (i.e. inanición, malnutrición) en el menor tiempo posible en las larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, los cuales puedan afectar el crecimiento en esta etapa y las subsiguientes.

## ANTECEDENTES



La disponibilidad del alimento es una de las principales causas de mortalidad de las larvas de peces marinos que afecta al reclutamiento (O'Connell, 1976). Con los indicadores de condición nutricional ha sido posible constatar que las larvas que disponen de bajas cantidades de alimento, presentan una condición nutricional pobre y pueden ser removidas selectivamente de la población a consecuencia de la vulnerabilidad a la depredación, transporte desfavorable, susceptibilidad a enfermedades, tasas de crecimiento reducido y prolongación de la etapa larvaria (Hunter, 1981; Theilacker, 1978; Ferron y Leggett, 1994; Suthers, 1998).

Son abundantes y múltiples los trabajos sobre el uso de indicadores de condición nutricional en larvas de peces, la mayoría de ellos están realizados en campo para determinar la relación entre la condición nutricional y el ambiente e inferir sobre la probabilidad de supervivencia y reclutamiento. Como se ha mencionado, son varias las técnicas que han sido desarrolladas para ello y comúnmente se clasifican de acuerdo al nivel de organización biológica que integran (morfológico, histológico, bioquímico). Estas técnicas también han sido aplicadas a estudios de laboratorio, bajo condiciones controladas, para identificar alteraciones en la condición nutricional de las larvas e inferir sobre el crecimiento y la supervivencia (Catalán, 2003).

## 2.1 Métodos de evaluación de la condición nutricional.

Los indicadores morfométricos son determinados por medio de mediciones del cuerpo, esta técnica fue la fuente primaria de información para detectar diferencias entre individuos de un mismo stock. Autores como Shelbourne (1957), Nakai *et al.* (1969) y Blaxter (1971) observaron que algunas partes del cuerpo se modifican respecto a otras, en respuesta a la cantidad de alimento disponible. Algunas medidas empleadas como indicadores de condición nutricional de larvas de *Engraulis mordax* (O'Connell, 1976) y *Trachurus symmetricus* (Theilacker, 1986), son la longitud total, longitud del intestino, altura de la cabeza, altura del cuerpo, diámetro del ojo y altura del músculo a nivel del ano. Powell y Chester (1985) con larvas de *Leiostomus xanthurus* y Catalán (2003) con larvas de *Dicentrarchus labrax*, coinciden en que la altura del músculo a nivel del ano, es el carácter morfométrico que mejor discriminó entre larvas alimentadas y sin alimentar y detectó estados de inanición y crecimiento. Mientras Yúfera *et al.* (1993) emplearon la longitud total, el diámetro del ojo, altura de la cabeza y altura del tubo digestivo para determinar los efectos de la inanición en la primera alimentación de larvas de *Sparus aurata*. Bernabé y Guissi (1994) encontraron que las diferencias en el crecimiento en peso y longitud de las larvas de *Dicentrarchus labrax*, alimentadas con dietas inertes fueron detectadas hasta que alcanzaron tallas consideradas como juveniles.

Los indicadores histológicos se basan en las variaciones de las células, tejidos u órganos en respuesta al tratamiento alimenticio. Umeda y Ochiai (1975) con larvas de *Seriola quinqueradiata*, O'Connell (1976) con larvas de *Engraulis mordax* y Theilacker (1986) con larvas de *Trachurus symmetricus*, coinciden al encontrar que los primeros órganos en sufrir los efectos de la inanición son el intestino, páncreas, hígado y músculo. De manera general identificaron que las señales de inanición fueron: separación inter e intracelular amplia, textura demacrada de las células, material celular almacenado poco destacado y núcleo pequeño con nucleolo indistinguible. Y de acuerdo al grado de deterioro celular

emplearon diversas clasificaciones para la condición nutricional. O'Connell (1976) clasificó a las larvas de *Engraulis mordax* en condición: pobre, intermedia y buena, empleando 11 variables histológicas. Theilacker (1978, 1986) clasificó a las larvas de *Trachurus symmetricus* en cuatro estados de condición: moribundas, inanición, recuperables y sanas; con base al grado de deterioro celular del cerebro, tracto digestivo, hígado y músculo.

Theilacker y Watanabe (1989) demostraron que medir la altura de los enterocitos de la parte media del intestino anterior, fue una herramienta efectiva para detectar estados de inanición en larvas de *Engraulis mordax* criadas en laboratorio e identificar el historial alimenticio de larvas capturadas en campo. Asimismo se ha reportado que la disminución en el diámetro y el área nuclear de los hepatocitos fueron buenos indicadores de la condición nutricional y el crecimiento de larvas de *Clupea harengus*, *Pleuronectes plateas* (Ehrlich *et al.*, 1976), *Odontesthes bonariensis* (Strüssmann y Takashima, 1990) y *Scophthalmus maximus* (McFadzen *et al.*, 1994).

Entre los indicadores bioquímicos, la determinación de ácidos nucleicos goza de gran popularidad, específicamente el índice ARN/ADN debido a su rápido tiempo de respuesta (Buckley 1979; Clemmesen, 1987; Bergeron 1997; Buckley *et al.* 1999) y su uso para determinar estados de inanición, crecimiento y deficiencias alimenticias (Buckley 1979; Westerman y Holt 1994; Clemmesen, 1996). Autores como Martin y Wright (1987) con larvas de *Morone saxatilis* y Richard *et al.* (1991) con larvas de *Solea solea*, son ejemplo de la rapidez con que el índice ARN/ADN responde a la inanición, ya que detectaron un índice cercano a 1.0 dos días después de restringirles la primera alimentación y Cunha *et al.* (2003) en larvas de *Scophthalmus maximus* detectaron una condición pobre 3 días después de restringirles el alimento. Independientemente de la especie, diversos autores han encontrado que el índice ARN/ADN alcanza valores cercanos a 1.0 en periodos prolongados de inanición y previo a la muerte, esto sugiere que es el valor mínimo necesario para sobrevivir (Tabla 1).

Bulow (1987) encontró que el índice ARN/ADN fue sensible a los cambios a diferentes dietas de alimentación y propuso su empleo como un indicador del crecimiento de larvas, juveniles y adultos de *Notemigonus crysoleucas*. Buckley (1979) determinó periodos de rápido y lento crecimiento en larvas de *Gadus morhua* al alimentarlas con distintas concentraciones de rotíferos y nauplios de copépodos y detectó periodos de inanición en la primera alimentación de larvas de *Pseudopleuronectes americanus* a densidades de 1 rot/ml. Clemmesen (1996) realizó un análisis de las ventajas y desventajas del ARN/ADN como indicador de la condición nutricional, basándose en la experiencia obtenida con larvas de *Clupea harengus*, *Scophthalmus maximus* y *Engraulis anchoita* (Clemmesen, 1987; 1994; Clemmesen *et al.*, 1996). El índice ARN/ADN también ha mostrado buenos resultados para evaluar el crecimiento y las deficiencias alimenticias de larvas de *Sciaenops ocellatum* (Holt, 1993), *Salmo salar* (Sveier *et al.*, 2000) y *Pseudopleuronectes americanus* (Ben-Khemis *et al.*, 2000), alimentadas con dietas artificiales.

Tabla 1. Índices ARN/ADN determinados en diversas especies de larvas de peces sometidas a periodos prolongados de inanición.

<i>Especie</i>	Días en inanición	<u>ARN</u> <u>ADN</u>	Referencia
<i>Ammodytes americanus</i>	7	1.5	Buckley, 1984
<i>Morone saxatilis</i>	12	1.2	Wright y Martin, 1985
<i>Scophthalmus maximus</i>	7	1.3	Clemmesen, 1987
<i>Pleuronectes platessa</i>	14	1.0	Hovenkamp, 1990
<i>Solea solea</i>	9	1.1	Richard <i>et al.</i> , 1991
<i>Clupea harengus</i>	9	1.3	Ueberschrär y Clemmesen, 1992
<i>Clupea harengus</i>	6	1.2	Clemmesen, 1994
<i>Theragra chalcogramma</i>	7	1.0	Canino <i>et al.</i> , 1991
<i>Paralichthys olivaceus</i>	10	1.16	Gwak y Tanaka, 2001
<i>Dicentrachus labrax</i>	17	1.7	Catalán, 2003

Es común la combinación de varios indicadores de condición nutricional. Segner *et al.* (1988 y 1993) se apoyaron en indicadores histológicos (altura de los

enterocitos y área nuclear de los hepatocitos) y bioquímicos (ARN/ADN y actividad de proteasas) para detectar el estado de nutrición de larvas de *Clarias gariepinus*, *Coregonus lavaretus*, *Scophthalmus maximus* y *Leuciscus idus melanotus*, alimentadas con dietas inertes y encontraron que ambos indicadores detectaron estados de inanición, malnutrición y crecimiento. Weber *et al.* (2003) evaluaron la condición nutricional empleando varios indicadores bioquímicos (ARN/ADN, proteínas totales, lípidos y triglicéridos totales) en *Oncorhynchus mykiss* y *Pimephales promelas*, y sugirieron que el índice ARN/ADN fue el mejor debido al tiempo de respuesta y al tamaño de muestra requerido. Catalán (2003) comparó índices morfométricos, histológicos y bioquímicos para determinar la condición nutricional de larvas de *Dicentrarchus labrax* en inanición, ayuno-realimentación y alimentación continua; el autor encontró que de acuerdo al tiempo de respuesta, la bondad de clasificación, la relación con la supervivencia, los tiempos de procesado, costos y requerimientos específicos. Para la inanición y el ayuno-realimentación a corto plazo, la variable histológica separación de las fibras musculares y el ARN/ADN fueron similares y propone que la SFM fue más adecuada para distinguir larvas en estado nutricional intermedio y el ARN/ADN fue más útil para la detección del crecimiento.

## 2.2 Cultivo de larvas de cabrilla arenera.

Los estudios realizados con larvas de cabrilla arenera en cultivo durante la primera alimentación son recientes y en ellos se ha observado que las larvas de cabrilla arenera son depredadores visuales, en las cuales la intensidad de luz, el color de tanque y la densidad de presas afecta la eficiencia e incidencia alimenticia al momento de la primera alimentación, los autores sugieren emplear una intensidad de luz de 700 lux, tanques de color negro y 10 rot/ml a fin aumentar la eficiencia e incidencia en la primera alimentación (Peña *et al.*, 2004; Peña *et al.*, 2005). Peña y Dumas (2005) evaluaron el efecto del retraso de la primera alimentación 1, 2 y 3 días después de la primera alimentación, en las larvas de

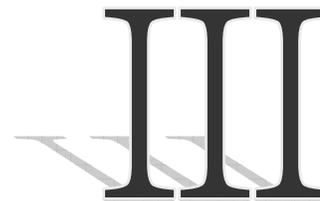
cabrilla arenera por medio de siete variables morfométricas (Longitud total, diámetro del ojo, altura de la cabeza, altura del cuerpo, altura del hígado, altura de la válvula intestinal y altura del músculo a nivel del ano) y tres histológicas (altura de los enterocitos del intestino anterior y del intestino posterior y área nuclear de los hepatocitos). Los autores encontraron diferencias significativas en todas las variables morfométricas en el día 5dde.entre el control y los tratamientos. A nivel histológico se presentaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la primera alimentación entre el control y los tratamientos. A las larvas que se les retrasó la primera alimentación 1 y 2 días lograron recuperarse pero alcanzaron menor LT al final de experimento (20dde), a las larvas que se les retraso 3 días la primera alimentación no lograron recuperarse, mientras que el punto de no retorno se presentó entre los días 4-5dde.

Respecto a la etapa de destete, se cuenta con el trabajo de Anguas-Vélez *et al.* (2000), quienes realizaron un ensayo de destete por coalimentación a los 15, 25 y 30 dde y encontraron que la supervivencia y el crecimiento de las larvas de cabrilla arenera iniciadas con la dieta inerte fueron significativamente menores a los de las larvas que recibieron alimento vivo y sugieren que el destete con una dieta inerte es posible, pero no debe hacerse antes de los 30 dde, aunque no se conocían en ese momento las estructuras histológicas y enzimáticas del sistema digestivo. Posteriormente Peña *et al.* (2003) describieron histológica e histoquímicamente los principales eventos del desarrollo del sistema digestivo y recomiendan iniciar el destete a partir del día 16dde (larvas de 9.3mm de longitud total) cuando observaron la presencia de las glándulas gástricas, mediante una coalimentación de alimento vivo y dieta artificial. Álvarez-González (2003) describió la actividad enzimática digestiva de las larvas de cabrilla arenera y encontró que casi todas las enzimas digestivas se presentan a los 12-25dde, con base a la actividad enzimática descrita, realizó el destete en larvas de cabrilla arenera a los 17 y 22dde, empleando tres dietas microparticuladas (DMP) cada una con diferentes fuentes proteínicas: hidrolizado de proteína pescado, harina de calamar y harina de sangre. El autor encontró que la mejor sobrevivencia y

crecimiento lo presentaron al día 30de las larvas alimentadas con DMP a base de hidrolizado de proteína de pescado, cuando el destete se realizó a los 17dde y hasta el día 40dde con la DMP a base de harina de calamar cuando el destete se realizó en el día 22dde.

Los estudios realizados con larvas de la cabrilla arenera durante el cultivo muestran dos etapas importantes que afectan el crecimiento y la sobrevivencia: la primera alimentación y el destete de las larvas. Bajo este contexto, se pretende evaluar y comparar varios indicadores que nos permitan identificar tempranamente la presencia de alteraciones nutricionales que puedan afectar el crecimiento en estas etapas y así inferir sobre la adecuación de las características bióticas para el cultivo.

## JUSTIFICACIÓN



En el cultivo larvario, el objetivo principal es proporcionar a las larvas las condiciones ambientales óptimas y el alimento adecuado (tamaño, cantidad y calidad) para incrementar la sobrevivencia y el crecimiento. Para lograr que estos parámetros se incrementen, es necesario conocer los efectos del alimento sobre las larvas. El uso de los índices empleados en las pesquerías para detectar inanición en especies que son importantes componentes de la pesca comercial, también ha sido utilizado con éxito para ampliar el conocimiento acerca de la condición de organismos mantenidos en cultivos. Se ha comprobado en diversas especies capturadas en campo y criadas en laboratorio, que la determinación de la condición de las larvas es adecuada para estimar el potencial de crecimiento y detectar periodos de inanición y alteraciones nutricionales.

La cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, si bien no es considerada como relevante en términos pesqueros, debido a que presenta una explotación incipiente y una baja utilización por la pesca comercial debido a que los ejemplares grandes no se capturan con frecuencia, es considerada como pescado de primera calidad. Dado que reúne buenas características biológicas y etológicas para cautiverio, se ha evaluado el desarrollo del cultivo controlado como una alternativa de explotación (SEPESCA-UABCS, 1994; Avilés-Quevedo *et al.*, 1995). Asimismo, es posible emplearla con gran éxito como modelo experimental, a fin de desarrollar nuevas tecnologías que puedan ser transferibles para otras especies que están siendo fuertemente sometidas a prácticas pesqueras, principalmente aquellas de alto valor comercial.

La información generada a través de varios años de investigación con la cabrilla arenera ha permitido desarrollar los aspectos básicos para generar la tecnología de su cultivo. Sin embargo, para lograr la trascendencia a un cultivo exitoso, es necesario contar con una buena producción de semilla. En los últimos años, los estudios realizados con las larvas de cabrilla arenera indican dos etapas importantes en su cultivo, la primera alimentación exógena y el destete; las cuales son un punto clave para el éxito del larvicultivo (Anguas-Vélez *et al.*, 2000; Peña *et al.*, 2003; Álvarez-González, 2003; Peña y Dumas, 2005).

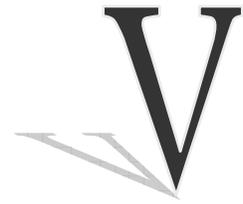
El uso de indicadores para determinar la condición nutricional, como son los morfométricos, los histológicos y los bioquímicos, representan una buena herramienta para detectar alteraciones nutricionales tempranas y estimar el potencial de crecimiento tanto en la primera alimentación exógena, como en el destete de las larvas de cabrilla arenera, de tal manera que se pueda inferir sobre la adecuación de las características bióticas para el cultivo larvario y en un futuro alcanzar una producción de semilla que sustente un cultivo exitoso.

## HIPÓTESIS



Considerando que los indicadores de condición nutricional operan a diferentes escalas temporales, se espera que cuanto menor sea el nivel de organización biológica del organismo (morfológico, celular, molecular), menor tiempo tarde el indicador en detectar cambios en la condición nutricional. El índice ARN/ADN, representará un indicador más sensible y objetivo a la morfometría (tamaño del cuerpo) y a la histología (tamaño de las células de los enterocitos y de los hepatocitos), para determinar la condición nutricional de las larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, ya que permitirá detectar tempranamente la presencia de alteraciones nutricionales debido a la carencia o deficiencia de alimento en dos etapas importantes del cultivo larvario: la primera alimentación y el destete.

## OBJETIVOS



### **General:**

Evaluar y comparar métodos para determinar la condición nutricional de las larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* en cultivo.

### **Específicos:**

Determinar el efecto de la restricción de la primera alimentación en la condición nutricional de las larvas de cabrilla arenera en cultivo, mediante indicadores morfométricos, histológicos (altura de los enterocitos y el área nuclear de los hepatocitos) y bioquímicos (concentración de ácidos nucleicos y proteínas totales).

Determinar el efecto de una dieta microparticulada en una estrategia de destete temprano en la condición nutricional de las larvas de cabrilla arenera, mediante indicadores morfométricos, histológicos (altura de los enterocitos y el área nuclear de los hepatocitos) y bioquímicos (concentración de ácidos nucleicos y proteínas totales).

Determinar cual método (indicador) es el más adecuada para detectar cambios en la condición nutricional de las larvas de cabrilla arenera en cada una de estas etapas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

# VI

Este capítulo está organizado en cuatro secciones principales: las dos primeras incluyen las dos etapas importantes del larvicultivo: la primera alimentación y el destete. La tercera sección incluye a las herramientas de análisis (morfometría, histología y bioquímica), estos análisis se realizaron de la misma manera para cada una de las etapas, sin embargo, cuando se emplearon algunas modificaciones de acuerdo a la etapa del cultivo, se especifican en el apartado correspondiente. Finalmente, la cuarta sección corresponde al análisis estadístico empleado.

### **6.1 Experimento I: Primera alimentación.**

#### **6.1.1 Obtención y mantenimiento de las larvas.**

Los embriones de la cabrilla arenera se obtuvieron por medio de una fecundación artificial de un desove inducido con el análogo del factor de liberación de la hormona Luteinizante (LHRHa) Sigma Chemical [79561-22-1]) en reproductores capturados del medio silvestre en la temporada reproductiva (Pliego y Alcántar, 2002).

La incubación de los embriones se realizó en la Unidad Piloto de Maricultivos (UPIMA-CICIMAR) en tolvas cilindrocónicas de fibra de vidrio con un volumen aproximado de 100 lt a  $25 \pm 0.2$  °C,  $35 \pm 0.5$  ppm, aireación y circulación de agua constante y moderada hasta el momento de la eclosión. Los eleuteroembriones se sembraron aleatoriamente en el sistema de circulación

cerrada para cultivo de larvas de la UPIMA a una densidad de 50 ind L<sup>-1</sup>, temperatura de 25.5 ± 0.3 °C, salinidad de 35.0 ± 0.3 ppm, fotoperiodo de 14:10 (Luz:Oscuridad), aireación constante y recambios de agua solamente durante la noche.

Las condiciones fisicoquímicas del cultivo se monitorearon diariamente, con un dispositivo electrónico YSI modelo 85 para la temperatura, la salinidad y el oxígeno disuelto y con técnicas colorimétricas para el amonio y los nitritos totales (Strickland y Parson, 1972) a fin de mantener una buena calidad de agua.

### **6.1.2 Esquema de alimentación.**

Se formaron dos grupos de larvas por triplicado (6 tanques). A un grupo (3 tanques) se les proporcionó alimento a partir del día 2 después de la eclosión (dde), mientras que al otro grupo (3 tanques) se les restringió el alimento por completo. El bioensayo se realizó hasta el día en el cual sobrevivieron las larvas sin alimento.

A partir del día de siembra se agregaron a los tanques de cultivos microalgas *Nannochloropsis oculata* a una densidad de 3 x 10<sup>5</sup> cel/ml, diariamente hasta el día 5dde. La primera alimentación se inicio en el día 2dde, en el momento en que se observó la pigmentación de los ojos, la apertura de la boca y el ano. Se proporcionaron rotíferos *Brachionus plicatilis* a una densidad de 5 org/ml diariamente hasta el día 5dde.

### **6.1.3 Muestreo.**

Las muestras se tomaron diariamente a partir del día 2dde. Las larvas se capturaron aleatoriamente en cada tratamiento y el muestreo se realizó hasta el día 5dde, un día después al que sobrevivieron las larvas en inanición. Cada muestreo se realizó antes de proporcionar el alimento. Se capturaron 30 larvas para la morfometría y el peso seco, 30 larvas para la histología y 50 larvas para la cuantificación de ácidos nucleicos y proteínas totales.

## 6.2 Experimento II: Estrategia de destete.

### 6.2.1 Obtención y mantenimiento de las larvas.

Los embriones de cabrilla arenera se obtuvieron de un desove espontáneo de reproductores mantenidos en cautiverio en el Sistema de Inducción al Desove del Laboratorio de Biología Experimental del CICIMAR-IPN (Rosales-Velázquez, 1997).

La incubación de los embriones, la siembra de los eleuteroembriones y la medición de las variables fisicoquímicas se realizaron de la misma manera como se explicó en el apartado 6.1.1.

### 6.2.2 Esquema de alimentación.

Se formaron dos grupos de larvas, cada uno por triplicado (6 tanques). A un grupo de ellos (3 tanques) se les proporcionó alimento vivo (AV) durante el desarrollo del bioensayo y hasta el final del mismo (Control). Al otro grupo (3 tanques), se les ofreció una dieta microparticulada (DMP) a partir del día 17dde por medio de una coalimentación.

A partir del día de siembra se agregaron microalgas *Nannochloropsis oculata* a una densidad de  $3 \times 10^5$  cel/ml hasta el día 8dde. La primera alimentación se inició el día 2dde en el momento en que se observó la pigmentación de los ojos, la apertura de la boca y el ano. Diariamente se proporcionaron rotíferos *Brachionus plicatilis* a una densidad de 5 org/ml hasta el día 15dde. A partir del día 5dde los rotíferos fueron enriquecidos durante un tiempo aproximado de 4hrs con la emulsión comercial SELCO (INVE, Bélgica), en las cantidades recomendadas por el productor. A partir del día 15dde, para cada día se proporcionaron nauplios de *Artemia* sin enriquecer a una densidad de 3 org/ml, en el día 17dde hasta el día 22dde los nauplios fueron enriquecidos con SELCO de la misma manera antes descrita. Para el día 22dde se proporcionaron juveniles de *Artemia* enriquecidos en la misma densidad.

Para el grupo de larvas destetadas, se siguió el esquema de alimentación anterior hasta el día 17dde. El destete o la sustitución del alimento vivo se inició en

el día 17<sup>de</sup> por medio de una coalimentación de 4 días. Se proporcionaron nauplios de artemia (3 ind/ml) y DMP (0.1g) con proporciones aproximadas de 75:25, 50:50, 50:50 y 25:75 (AV:DMP) hasta que se alcanzó el 100% de DMP en el día 20<sup>de</sup>. A partir de este día, el alimento se suministró a saciedad aparente cada 4 horas desde las 8:00 hasta las 20:00hrs (Fig. 3).

La DMP fue elaborada en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD, unidad Mazatlán, Sinaloa) con harina de pescado y quistes desencapsulados de *Artemia* como fuente de proteína (García-Ortega *et al.*, 2001) (Tabla 2).

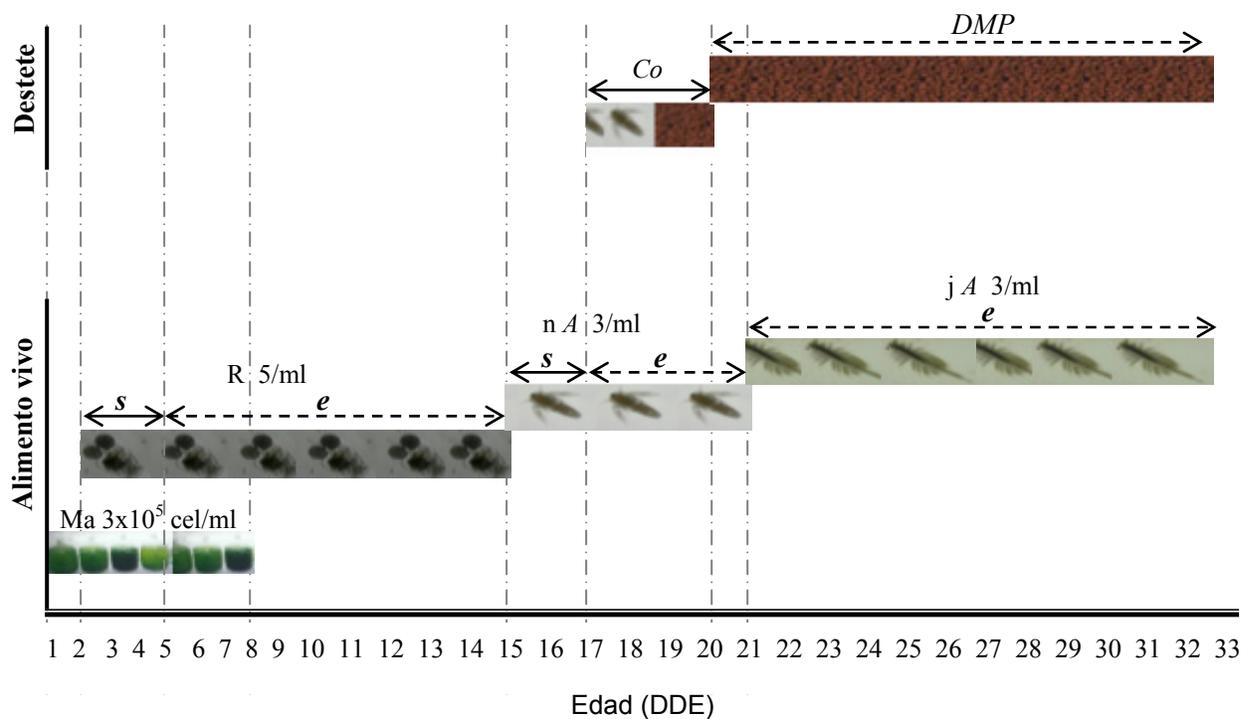


Figura 3. Esquema de alimentación empleado para la crianza larvaria de la cabrilla arenosa *Paralabrax maculatofasciatus*. Ma: microalgas (*Nannochloropsis oculata*); R: Rotíferos (*Brachionus plicatilis*); nA: nauplios de Artemia, jA: juveniles de Artemia; s: sin enriquecer; e: enriquecido. DMP: Dieta microparticulada. Co: Coalimentación (75:25, 50:50, 50:50, 25:75, AV:DMP).

Tabla 2. Formulación y composición química proximal de la dieta microparticulada empleada para el destete de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Nivel de inclusión en % de peso seco.

Ingrediente	% de inclusión
Quistes desencapsulados de Artemia <sup>a</sup>	74.0
Harina de pescado (sardina) <sup>b</sup>	15.7
Aceite de hígado de bacalao <sup>c</sup>	2.6
Premezcla de vitaminas <sup>d</sup>	1.7
Premezcla de minerales <sup>d</sup>	1.0
CMC <sup>e</sup>	5.0
Análisis químico proximal	
Proteínas	48.4
Lípidos	12.3
Cenizas	9.4
Humedad	8.5

<sup>a</sup>Artemia shell free, INVE Aq. Inc. UTA, USA.

<sup>b</sup>Harinas y aceites de occidente S. A., Mazatlán, México.

<sup>c</sup>Droguería Cosmopolita S.A de C.V., México.

<sup>d</sup>Malta Cleyton, Malta toxo de México S.A de C.V.

<sup>e</sup>Carboximetilcelulosa sal de sodio, Fluka CEIME Buscas, Suiza.

### 6.2.3 Muestreo.

Las muestras se tomaron cada 6 días a partir del día 15dde hasta el día 33dde. Las larvas se capturaron aleatoriamente en cada tratamiento antes de proporcionar el alimento. Para evaluar la morfometría, el peso seco y la histología se tomaron 10 larvas en el día 15dde, 5 larvas en el día 21dde y 3 larvas para los días 27 y 33dde, respectivamente para cada análisis. Para la cuantificación de ácidos nucleicos y proteínas totales se tomaron 10 larvas en el día 15dde y 3 larvas a partir del día 21dde.

### 6.3 Herramientas de análisis.

#### 6.3.1 Análisis morfométrico.

Las larvas tomadas de los tanques de cultivo fueron anestesiadas con metilsulfato de tricaina (MS222) en solución (35 mg L<sup>-1</sup>). Se tomaron fotos con una cámara digital (Hitachi KP-D50) integrada a un estereoscopio graduado (0.8x:0.12mm hasta 6x:0.018mm, Olympus) y se realizaron mediciones morfológicas con el software ImagePro Plus v.5.

Las medidas determinadas fueron: Longitud notocordal (LN), para larvas preflexión antes de la aparición de placa hipúrica (de la punta del hocico a la punta del notocordio). Longitud total (LT) para larvas postflexión. Diámetro ocular (DO) (distancia horizontal entre los márgenes de la orbita del ojo). Longitud del premaxilar o mandíbula inferior (LPM). Longitud cefálica (LC) (de la punta del hocico al borde posterior de la cápsula ótica en larvas en preflexión y hasta el borde posterior del opérculo en larvas en postflexión). Longitud céfalo-anal (LCA) (distancia entre la punta del hocico y el ano). Altura de la cabeza (AC) a nivel del ojo. Altura del músculo (AM) a nivel del ano (Fig. 4).

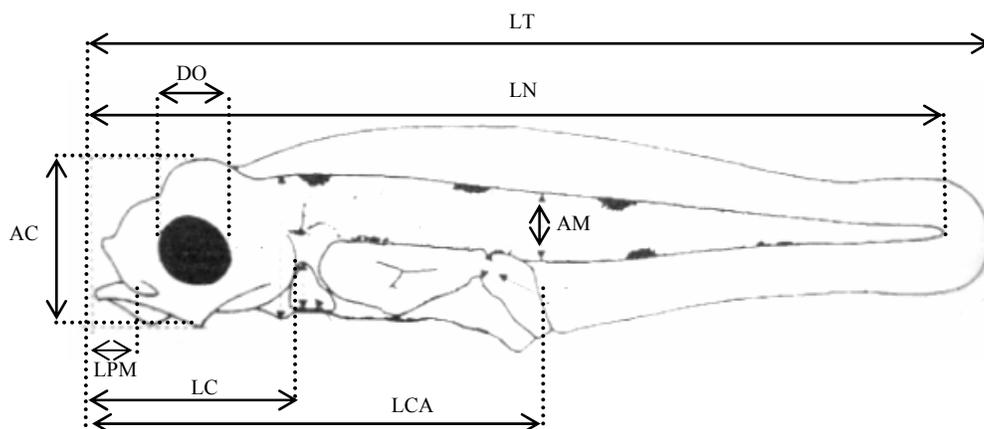


Figura 4. Larva de cabrilla arenosa *Paralabrax maculatofasciatus* donde se indican las variables morfométricas evaluadas. AC: Altura de la cabeza, AM: Altura del músculo, DO: Diámetro del ojo, LCA: Longitud céfalo-ano, LC: Longitud cefálica, LN: Longitud notocordal, LPM: Longitud premaxilar y LT: Longitud total (Imagen modificada de Peña y Dumas, 2005)

El crecimiento se evaluó con base a las relaciones longitud notocordal (mm)-edad (días) y peso seco (ug)-edad (días). Se determinó la tasa de crecimiento específico (TCE) mediante la relación entre el incremento en longitud promedio al tiempo  $x$  ( $L_x$ ) con respecto a la longitud promedio inicial ( $L_i$ ), expresado en forma porcentual:

$$TCE = \frac{(\ln L_x) - (\ln L_i)}{\text{Tiempo (días)}} \times 100$$

La tasa de crecimiento absoluto se determinó mediante la relación entre el incremento en longitud promedio al final del bioensayo ( $L_f$ ) con respecto a la longitud promedio inicial ( $L_i$ ), expresado en forma porcentual:

$$TCA = \frac{(\ln L_f) - (\ln L_i)}{\text{Tiempo (días)}} \times 100$$

### 6.3.2 Análisis histológico.

Las larvas tomadas de los tanques de cultivo fueron anestesiadas con MS222 en solución ( $35 \text{ mg L}^{-1}$ ), se capturaron y se fijaron inmediatamente en formol al 10%. El procedimiento histológico se realizó en el laboratorio de histología e histoquímica del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR).

Las larvas fueron deshidratadas en alcohol etílico a diferentes graduaciones ( $70^\circ$ ,  $80^\circ$ ,  $90^\circ$  y  $96^\circ$ ), con intervalos de incubación de una hora entre graduación, posteriormente se mantuvieron por 15 minutos en la mezcla de alcohol etílico y xilol (1:1) y 10 minutos en xilol absoluto. Una vez deshidratadas las larvas, se incluyeron en parafina Paraplast-xtra con un punto de fusión de  $56^\circ\text{C}$ .

Los cortes histológicos se realizaron con un microtomo de rotación (Leica 2025), las larvas fueron cortadas en un plano longitudinal con un espesor de  $6 \mu\text{m}$

de grosor cada 200  $\mu\text{m}$  y se tiñeron con Hematoxilina de Harris y Eosina azulosa alcohólica. Las preparaciones histológicas se montaron con resina sintética.

Las laminillas obtenidas se observaron en un microscopio óptico (Olympus BX45). De los cortes más representativos, se tomaron imágenes con una cámara fotográfica integrada al microscopio y se analizaron con el software para análisis de imágenes, ImagePro Plus v.5. El análisis histológico consistió en medir el área nuclear de los hepatocitos en el hígado y la altura de los enterocitos en el intestino (Fig. 5).

El criterio de selección para medir los enterocitos se basó en el reportado por Theilacker y Watanabe (1989) con algunas modificaciones para adaptarlo a las larvas de la cabrilla arenera, con base a lo reportado por Peña y Dumas (2005) en esta especie. Para la primera alimentación se midieron los enterocitos del intestino anterior y los del intestino posterior en su región más anterior, a fin de evitar variaciones debidas al desarrollo normal de tejido, se midieron las células de tipo cilíndrico simple. La medición abarcó desde la membrana basal hasta la región más apical, el borde de cepillo (Fig. 5b). Para el destete solo se midieron los enterocitos del intestino anterior. Se seleccionaron los enterocitos en donde el núcleo, el borde de cepillo, la membrana basal y la delimitación de las células estuvieron claramente identificados. No obstante, no siempre se cubrieron estos requisitos en las larvas con una condición nutricional deficiente. En el hígado se seleccionaron los núcleos que estuvieron bien delimitados (Fig. 5c).

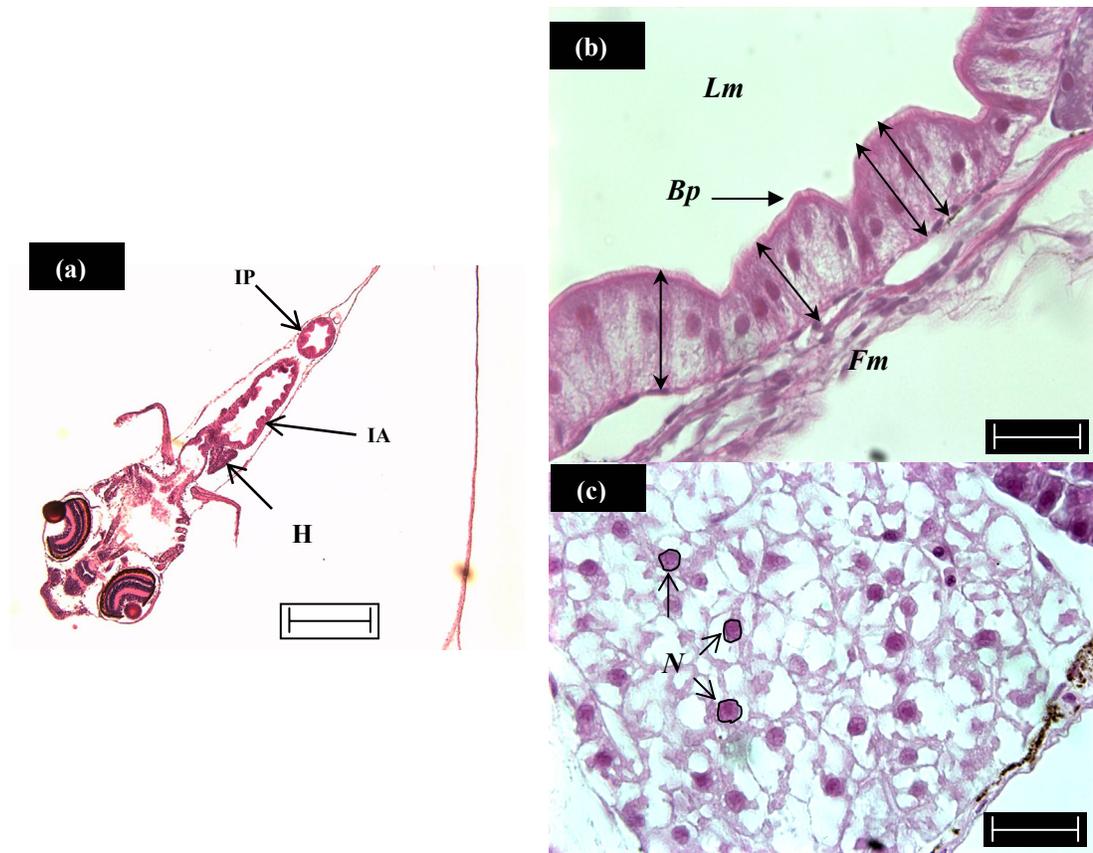


Figura 5. (a) Microfotografía de larva de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, 2dde. H: Hígado, IA: Intestino anterior, IP: Intestino posterior. La barra equivale a 200 $\mu$ m. (b) Microsecciones del intestino anterior, Lm: Lumen, Bp: Borde plumoso, Fm: Fibras musculares. Las flechas con doble cabeza indican la altura de los enterocitos. La barra equivale a 20  $\mu$ m. (c) Microsecciones del hígado N: Núcleo. La barra equivale a 20 $\mu$ m.

### 6.3.3 Análisis bioquímico.

Las larvas se capturaron vivas con ayuda de una pipeta pasteur, se enjuagaron 3 veces con agua de mar esterilizada y filtrada con papel millipor, se colocaron en tubos Eppendorf de 2ml con el menor contenido de agua posible e inmediatamente se congelaron a  $-50^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

Previo y durante al análisis, todo el material empleado se esterilizó para evitar la contaminación con agentes externos. Las muestras se mantuvieron en un ambiente a una temperatura por debajo de los  $8^{\circ}\text{C}$  para evitar la desnaturalización de los ácidos nucleicos (baño de hielo molido).

### 6.3.3.1 Homogenizado de las muestras.

Las muestras se descongelaron sobre una cama de hielo molido, delicadamente se transfirieron a un tubo de ensaye de 10ml de capacidad y se ajustó el volumen a 2ml con agua destilada a una temperatura de 4-6°C. La homogenización se realizó con un roturador de células ultrasónico (Sonicator, Branson 150) a una potencia de 50W y una duración aproximada de 1-4 minutos de acuerdo al tamaño de las larvas. En el caso de las larvas de mayor edad (a partir del día 27dde) previamente fueron maceradas con un homogenizador de tejidos (Politron 1200). El tubo de ensaye se mantuvo en baño de hielo en todo momento. Del homogenizado se tomaron 1.4ml para la extracción y cuantificación de los ácidos nucleicos y 0.1ml para la cuantificación de las proteínas totales.

### 6.3.3.2 Extracción y cuantificación de ARN y ADN.

La extracción de ácidos nucleicos se realizó con una modificación del método de Schmidt-Thannhauser por Munro y Fleck (1966) y la cuantificación se realizó con el método de Buckley (1979) adaptado para larvas de peces marinos (Anexo 1). El método consiste en precipitar el ADN y las proteínas del ARN por medio de una hidrólisis con un agente alcalino y recuperar el ARN en el sobrenadante; la separación del ADN de las proteínas se logra mediante la hidrólisis del ADN con un ácido caliente. Se leyó la absorbancia de ARN y ADN respectivamente, en un espectrofotometro (Beckman DU-640) a una longitud de onda de 260nm con celdas de cuarzo, la lectura de cada muestra se realizó por duplicado.

La concentración de ARN y ADN en el homogenizado original (2ml) se obtuvo de la siguiente manera:

$$ARN = \frac{(A_{260} \text{ fracción de ARN} - A_{260} \text{ blanco})(2 \times 2.52)}{(0.030)(1.4)}$$

$$ADN = \frac{(A_{260} \text{ fracción de ADN} - A_{260} \text{ blanco})(2 \times 2.20)}{(0.030)(1.4)}$$

donde: 2 es el volumen del homogenizado (original), 2.52 y 2.2 corresponden a los volúmenes (ml) de las fracciones de ARN y ADN; 1.4 es el volumen tomado para la extracción y 0.030 es la absorbancia a 260nm de 1µg/ml de una solución hidrolizada de ARN o ADN. El blanco es 1.4ml de agua destilada sometida al tratamiento de extracción.

La concentración de ARN y ADN en las larvas se obtuvo de la relación entre la concentración obtenida en el homogenizado y el número de larvas; y se expresó como microgramos de ARN ó ADN por larva.

### **6.3.3.3 Cuantificación de proteínas totales.**

A partir de dos muestras de 0.1ml del homogenizado original se aplicó el método de Lowry *et al.* (1951) para la extracción de proteínas totales (Anexo 2). La concentración se calculó con base a una curva estándar de albúmina bovina (BSA) [SIGMA A-4503] y se expresó en microgramos de proteína por larva, la cual se obtuvo de la relación entre la concentración de proteínas totales en el homogenizado original y el número de larvas.

#### 6.4 Análisis estadístico.

A todos los datos obtenidos se les aplicaron pruebas de normalidad de variancias de Kolmogorov-Smirnov y de homocedasticidad de variancias de Brown-Forsythe.

En la primera alimentación, los datos de peso seco se transformaron con una raíz cuadrada. Las variables morfométricas con Logaritmo base 10; la altura de los enterocitos, el área nuclear de los hepatocitos, la concentración de ARN y ADN se transformaron con  $1/x$ . Para el índice ARN/ADN se empleó arco seno y para las proteínas totales logaritmo natural. Las diferencias se detectaron con un ANOVA de una vía para las medidas morfométricas, el peso seco y los datos obtenidos de la histología y un ANOVA de dos vías (Factor: día y tratamiento) y *poshoc* de Tukey ( $P < 0.05$ ) para los datos obtenidos del análisis bioquímico.

Para el destete, los datos se transformaron empleando las mismas funciones que en la primera alimentación. Se empleo una prueba *t* para las medidas morfométricas, el peso seco, la concentración de ARN, ADN y proteínas totales. Para los datos obtenidos del análisis histológico se empleo un ANOVA de una vía (Factor: tratamiento).

## RESULTADOS

# VII

### 7.1 Primera alimentación.

#### 7.1.1 Análisis Morfométrico.

El peso seco de las larvas alimentadas ( $2.64 \pm 0.06 \mu\text{g larva}^{-1}$ ) fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) que el de las larvas en inanición ( $1.83 \pm 0.13 \mu\text{g larva}^{-1}$ ) a partir del día 3dde (Fig. 6A). Con respecto a la longitud notocordal, las diferencias significativas entre larvas alimentadas ( $3.09 \pm 0.17 \text{ mm}$ ) y larvas en inanición ( $2.52 \pm 0.12 \text{ mm}$ ) se detectaron hasta el día 4dde (Fig. 6B). Las larvas sometidas a inanición sobrevivieron hasta el día 4dde, registrando  $1.25 \pm 0.08 \mu\text{g larva}^{-1}$  de peso seco y una longitud notocordal de  $2.52 \pm 0.12 \text{ mm}$ .

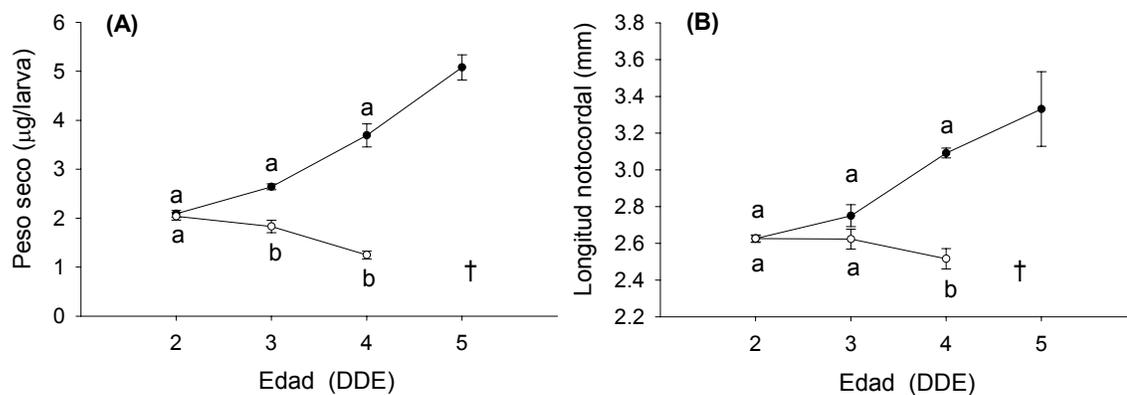


Figura 6. (A) peso seco y (B) Longitud notocordal (media  $\pm$  desv. est.,  $n=6$ ) de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* en la primera alimentación.  $\bullet$  Alimentadas,  $\circ$  Inanición. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) para cada día. Las larvas en inanición sobrevivieron hasta el día 4dde ( $\dagger$ ). Cada replica = 30 larvas.

Las larvas alimentadas mostraron un incremento positivo en todas las variables morfométricas evaluadas. Por el contrario, los cambios observados en la morfometría de las larvas sin alimento fueron negativos, es decir, que disminuyeron de tamaño (Fig. 7). Las diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre larvas alimentadas y sin alimentar se detectaron a partir del día 03dde, con sólo una de las siete variables evaluadas, la AM ( $F = 8.2529$ ;  $p = 0.0453$ ). Es hasta el día 4dde, cuando las diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) aumentaron a seis de las siete variables evaluadas: la LN, LPM, LC, LCA, AC y AM. En este día las larvas restringidas de alimento mostraron un deterioro físico muy marcado. Importante resaltar que el DO no mostró diferencias significativas con el tiempo (Fig. 7E).

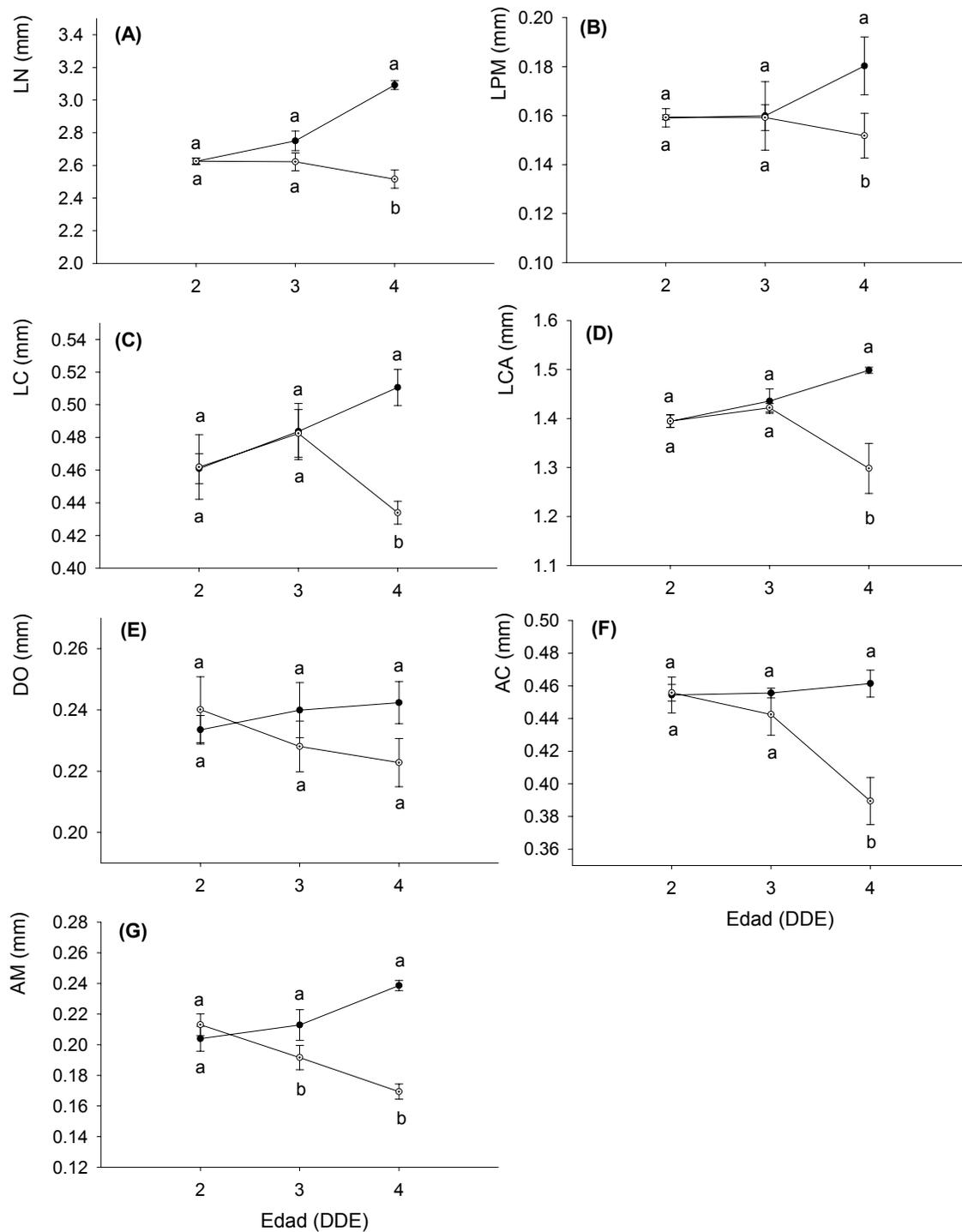


Figura 7. Morfometría (media  $\pm$  desv. est., n=6) de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* en la primera alimentación. (A) LN: Longitud notocordal, (B) LPM: Longitud premaxilar; (C) LC: Longitud cefálica, (D) LCA: Longitud céfalo-ano, (E) DO: Diámetro del ojo, (F) AC: Altura de la cabeza, y (G) AM: Altura del músculo.  $\bullet$  Alimentadas,  $\circ$  Inanición. Letras diferentes denotan diferencias significativas (P<0.05) para cada día. Cada replica = 30 larvas.

### 7.1.2 Análisis histológico.

En el día 2<sup>do</sup> se observó que el tubo digestivo estaba conformado por un epitelio de tipo cilíndrico simple, los enterocitos presentaron un núcleo basal y ovalado y se observó la presencia del borde plumoso. En el hígado, los hepatocitos fueron numerosos con el núcleo distinguible y no mostraron un arreglo bien definido.

A partir del día 3<sup>do</sup> comenzaron a notarse pequeñas alteraciones estructurales en la forma, arreglo y tamaño de las células de las larvas sometidas a inanición. En el tubo digestivo de las larvas alimentadas se distinguió una mayor superficie del epitelio y del borde plumoso, acompañado de un mayor número de pliegues. En contraste, las larvas en inanición mostraron un epitelio más delgado. Mientras en el hígado solo se observaron células ligeramente más compactas.

En el día 4<sup>do</sup> las larvas alimentadas presentaron un intestino en donde los enterocitos se observaron grandes, no presentaron separaciones entre ellas, el citoplasma fue abundante, se observaron vacuolas supranucleares y el lumen intestinal fue amplio (Fig. 8A). En contraparte, en las larvas en inanición se observó una degeneración más severa, los enterocitos estaban notablemente más compactos con un citoplasma reducido y las vacuolas intracelulares de los enterocitos estaban pobremente desarrolladas e incluso ausentes (Fig. 8B).

El hígado de las larvas alimentadas se caracterizó por presentar hepatocitos con núcleos grandes, nucléolos distinguibles y citoplasma bastante destacado (Fig. 9A). En cambio, los hepatocitos de las larvas en inanición presentaron núcleos pequeños y nucléolos indistinguibles, además se observaron señas de apoptosis, las cuales se identificaron por los núcleos pequeños de teñido intenso y oscuro (Fig. 9B).

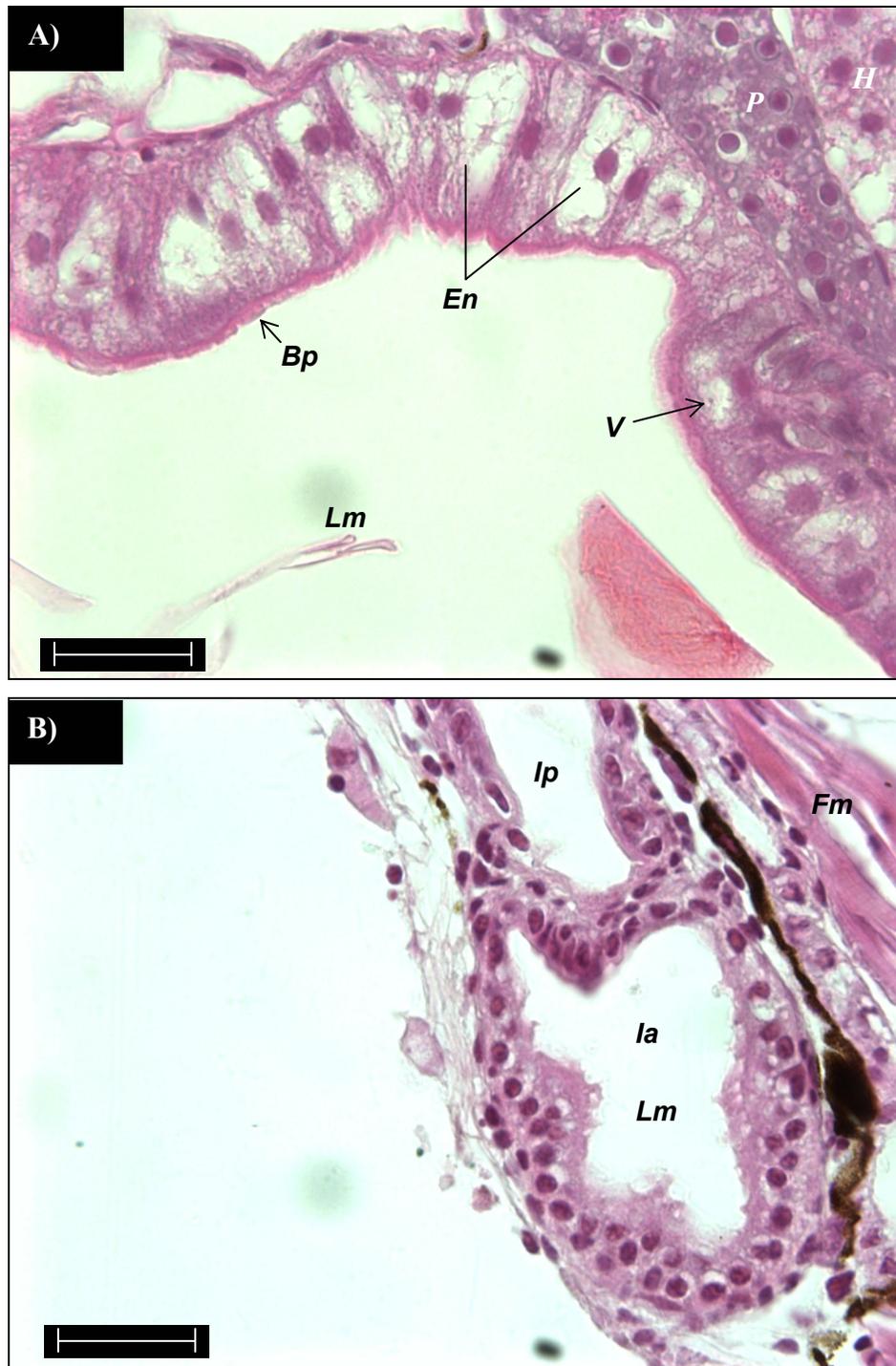


Figura 8. Microsecciones del tubo digestivo de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, día 4de. A: Alimentadas, B: Inanición. La barra equivale a 20µm.

*Bp*: Borde Plumoso

*H*: Hígado

*Lm*: Lumen

*En*: Enterocitos

*la*: Intestino anterior

*P*: Páncreas

*Fm*: Fibras musculares

*Ip*: Intestino posterior

*V*: Vacuola

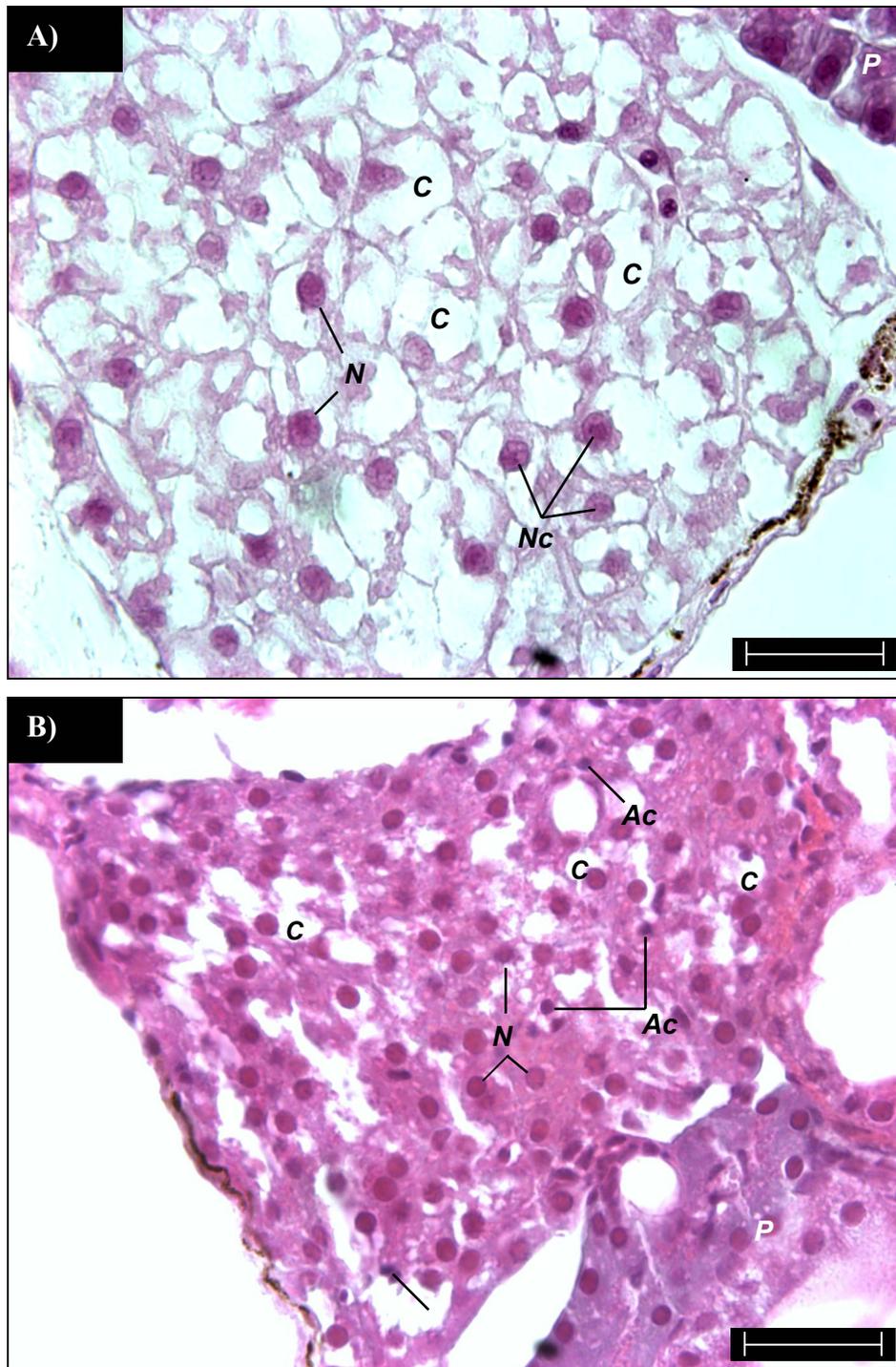


Figura 9. Microsecciones del hígado de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, día 4dde. A: Alimentadas, B: Inanición. La barra equivale a 20µm. Nótese el tamaño de los núcleos y el citoplasma de los hepatocitos.

Ac: Apoptosis celular  
C: Citoplasma

N: Núcleo  
Nc: Nucleolo

P: Páncreas

Sin embargo, fue hasta el día 4dde cuando el análisis cuantitativo reveló que la altura de los enterocitos ( $16.68 \pm 1.18 \mu\text{m}$ ) y el área nuclear de los hepatocitos ( $15.18 \pm 0.27 \mu\text{m}^2$ ) de las larvas alimentadas fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) que el de las larvas en inanición ( $10.0 \pm 0.12 \mu\text{m}$ ;  $8.68 \pm 0.46 \mu\text{m}^2$ , respectivamente) (Fig. 10).

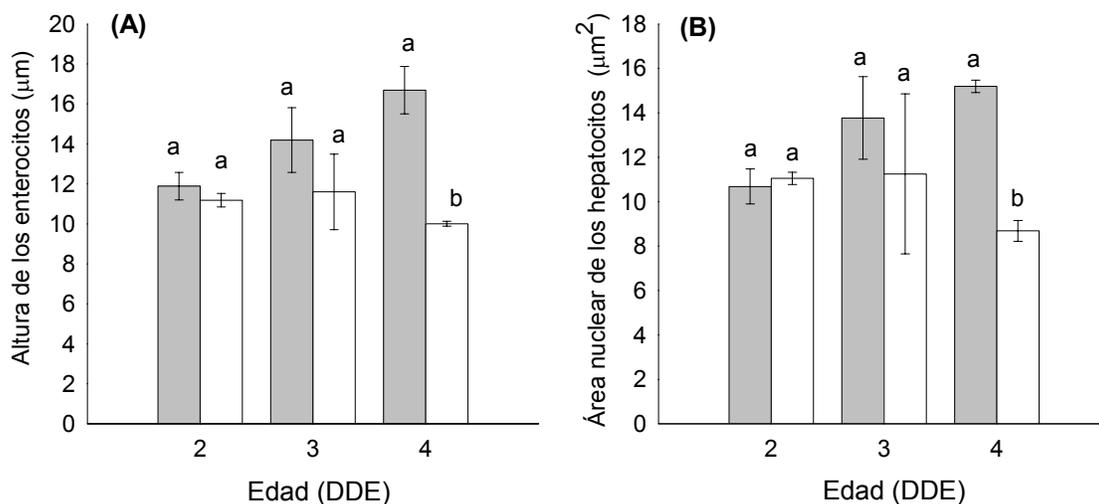


Figura 10. (A) Altura de los enterocitos y (B) área nuclear de los hepatocitos (media  $\pm$  desv. est.,  $n=3$ ) de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* durante la primera alimentación. ■-Alimentadas, □-Inanición. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) para cada día. Cada replica = 30 larvas.

### 7.1.3 Análisis bioquímico.

Los efectos de la restricción de alimento sobre las larvas se evidenciaron desde el día 3dde. El contenido de ARN ( $0.55 \pm 0.01 \mu\text{g larva}^{-1}$ ), de proteínas totales ( $3.12 \pm 0.21 \mu\text{g larva}^{-1}$ ) y el índice ARN/ADN (1.88) fueron significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) en las larvas alimentadas que en las larvas en inanición (Fig. 11).

La concentración de ARN, el índice ARN/ADN y la concentración de proteínas totales se incrementaron con la edad en las larvas a las cuales se les proporcionó alimento, alcanzando valores en el último día de muestreo hasta del

triple para el ARN ( $0.73 \pm 0.02 \mu\text{g larva}^{-1}$ ) y del doble para el índice ARN/ADN (2.46) y las proteínas totales ( $2.5 \pm 0.14 \mu\text{g larva}^{-1}$ ). Por el contrario, las larvas restringidas de alimento mostraron una disminución en dichos valores.

La concentración de ADN se mantuvo sin cambios significativos ( $P > 0.05$ ) entre larvas alimentadas ( $0.29 \pm 7e^{-4} \mu\text{g larva}^{-1}$ ) y larvas en inanición ( $0.28 \pm 0.01 \mu\text{g larva}^{-1}$ ) hasta el final del bioensayo. El índice ARN/ADN en las larvas en inanición alcanzó el valor de 1.0 en el día 4dde.

La concentración de ARN y el índice ARN/ADN fueron los más sensibles a los cambios en relación a la edad de las larvas, ya que mostraron diferencias significativas desde el día 3dde, tanto entre tratamientos como entre días.

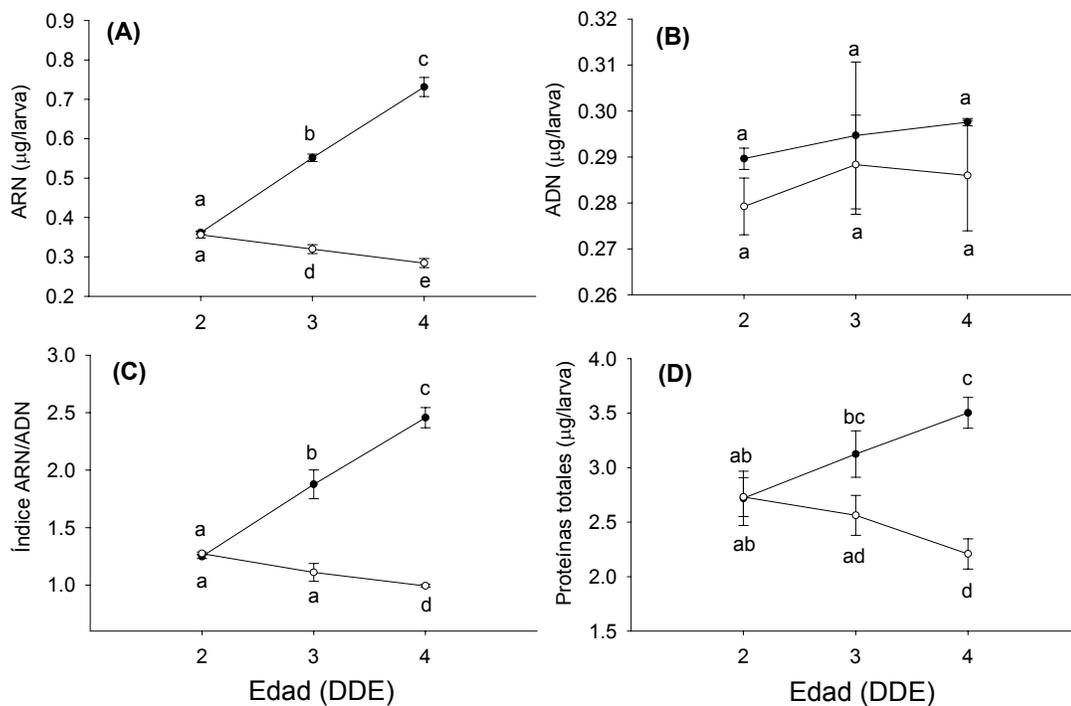


Figura 11. Concentración de ARN (A), ADN (B), Índice ARN/ADN (C) y Proteínas totales (D) (media  $\pm$  desv. est.,  $n=6$ ) de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* durante la primera alimentación. ● Alimentadas ◊ Inanición. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Cada replica = 50 larvas.

## 7.2 Estrategia de destete.

### 7.2.1 Análisis morfométrico.

El peso seco de las larvas alimentadas con AV ( $293.64 \pm 6.83 \mu\text{g larva}^{-1}$ ) fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) que el de las larvas alimentadas con la DMP ( $264.23 \pm 2.77 \mu\text{g larva}^{-1}$ ) a partir del día 21dde. Para la longitud notocordal, las diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre larvas alimentadas con AV ( $8.44 \pm 1.40$  mm) y larvas alimentadas con la DMP ( $7.38 \pm 0.52$  mm) se detectaron en el día 27dde (Fig. 12). La tasa de crecimiento absoluto (TCA) y la tasa de crecimiento específico (TCE) mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos alimenticios, hasta el día 33dde (Tabla 3). Las larvas alimentadas con AV fueron las que registraron el mayor peso seco, longitud notocordal y tasas de crecimiento.

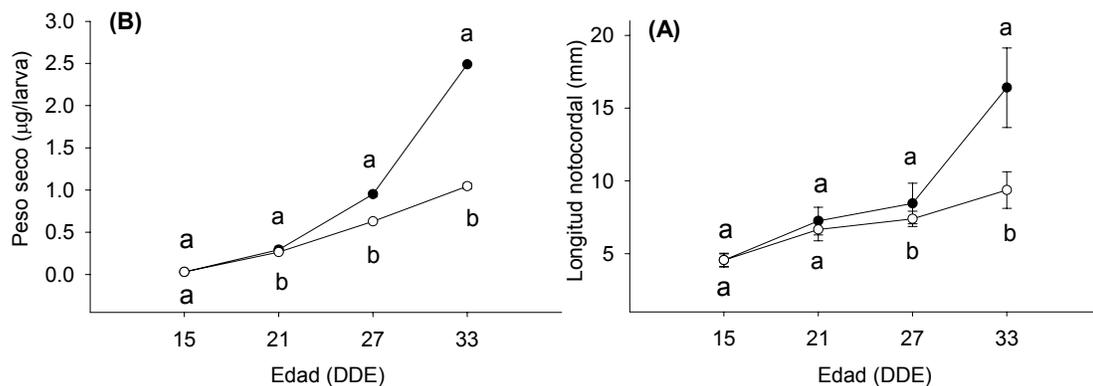


Figura 12. (A) Peso seco y (B) Longitud notocordal (media  $\pm$  desv. est.,  $n=3$ ) de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* durante el destete.  $\bullet$  Alimento vivo,  $\circ$  Dieta microparticulada. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) para cada día. Cada replica = 10 larvas para el día 15dde, 5 para el día 21dde y 3 para los día 27 y 33dde.

Tabla 3. Tasas de crecimiento de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* durante el destete.

Edad (DDE)	TCE		TCA	
	AV	DMP	AV	DMP
15	4.79 <sup>a</sup>	4.79 <sup>a</sup>	13.83 <sup>a</sup>	10.21 <sup>a</sup>
21	8.01 <sup>a</sup>	6.46 <sup>a</sup>		
27	10.96 <sup>a</sup>	6.56 <sup>a</sup>		
33	22.58 <sup>a</sup>	13.55 <sup>b</sup>	7.58 <sup>a</sup>	4.57 <sup>b</sup>

Superíndices desiguales denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) para cada día. TCE- Tasa de crecimiento específico, TCA-Tasa de crecimiento absoluto. AV-Alimento vivo, DMP-Dieta microparticulada.

Los efectos entre tratamientos alimenticios DMP y AV sobre la morfometría de las larvas se detectaron en el día 27dde. El análisis mostró que cuatro variables (LT, LN, LCA y AM) de las ocho medidas evaluadas incrementaron significativamente ( $P < 0.05$ ) en las larvas alimentadas con AV. En el día 33dde las diferencias morfológicas fueron mayores, ya que además se detectaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la LPM y en la AC. El diámetro del ojo (DO) y la longitud cefálica (LC) no mostraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) con el tiempo (Fig. 13).

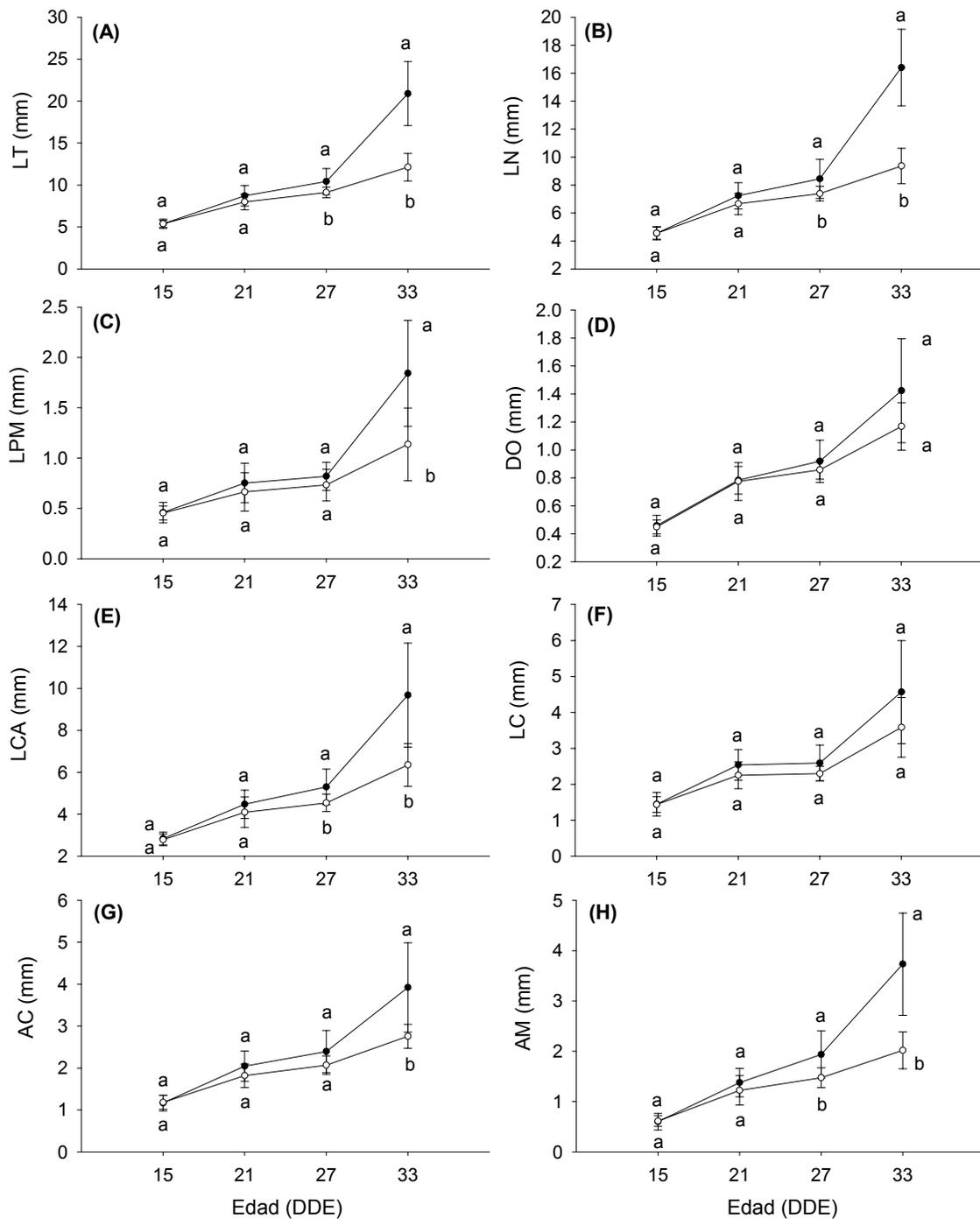


Figura 13. Morfometría (media  $\pm$  desv. est., n=3) de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* durante el destete. (A) LT: Longitud total, (B) LN: Longitud notocordal, (C) LPM: Longitud premaxilar; (D) DO: Diámetro del ojo, (E) LCA: Longitud céfalo-ano, (F) LC: Longitud cefálica, (G) AC: Altura de la cabeza, y (H) AM: Altura del músculo.  $\bullet$  Alimento vivo  $\circ$  Dieta microparticulada. Letras diferentes denotan diferencias significativas (P<0.05) para cada día. Cada replica = 10 larvas para el día 15dde, 5 para el día 21dde y 3 para los días 27 y 33dde.

### 7.2.2 Análisis histológico.

El análisis cualitativo mostró que los efectos de la sustitución del AV por la DMP se presentaron a partir del día 21dde principalmente en el hígado. Las larvas alimentadas con el AV mostraron células con citoplasma abundante, núcleos grandes y nucleolos distinguibles dentro de los núcleos (Fig. 14A); características que no fueron tan evidentes para las larvas alimentadas con la DMP (Fig. 14B). Sin embargo, con este análisis se observaron en este mismo día que, algunas larvas alimentadas con la DMP presentaron características similares a las larvas alimentadas con el AV, es decir, células con núcleos grandes, nucleolo visible y citoplasma abundante, no obstante, se presentaron señas de apoptosis celular (Fig. 15).

Para los días 27dde (Fig. 16) y 33dde (Fig. 17) se observó que los núcleos y el citoplasma de los hepatocitos fueron de mayor tamaño en las larvas alimentadas con el AV, a diferencia de las larvas alimentadas con la DMP, las cuales mostraron núcleos pequeños, citoplasma reducido y señas de apoptosis celular. En el intestino anterior, no se detectaron diferencias marcadas entre las larvas alimentadas con el AV (Fig. 18A) y con la DMP en el día 21dde con el análisis cualitativo, la única diferencia fue que las larvas alimentadas con la DMP se caracterizaron por presentar epitelios ligeramente más delgados (Fig. 18B).

Es hasta el día 27dde cuando el análisis cualitativo del intestino anterior permitió detectar diferencias marcadas entre tratamientos alimenticios (Fig. 19), mismas que se incrementaron para el día 33dde. En este caso, las larvas alimentadas con el AV mostraron epitelios más amplios, enterocitos con núcleos grandes y vacuolas supranucleares de mayor tamaño y número (Fig. 20A), las cuales incluso, llegaron a estar ausentes en las larvas alimentadas con la DMP (Fig. 20B).

Por medio del análisis cuantitativo se logró detectar que, desde el día 21dde, la altura de los enterocitos ( $22.53 \pm 1.06 \mu\text{m}$ ) y el área nuclear de los hepatocitos ( $15.18 \pm 0.27 \mu\text{m}^2$ ) en las larvas alimentadas con el AV fueron significativamente ( $P < 0.05$ ) mayores respecto de las larvas alimentadas con la DMP (Fig. 21).

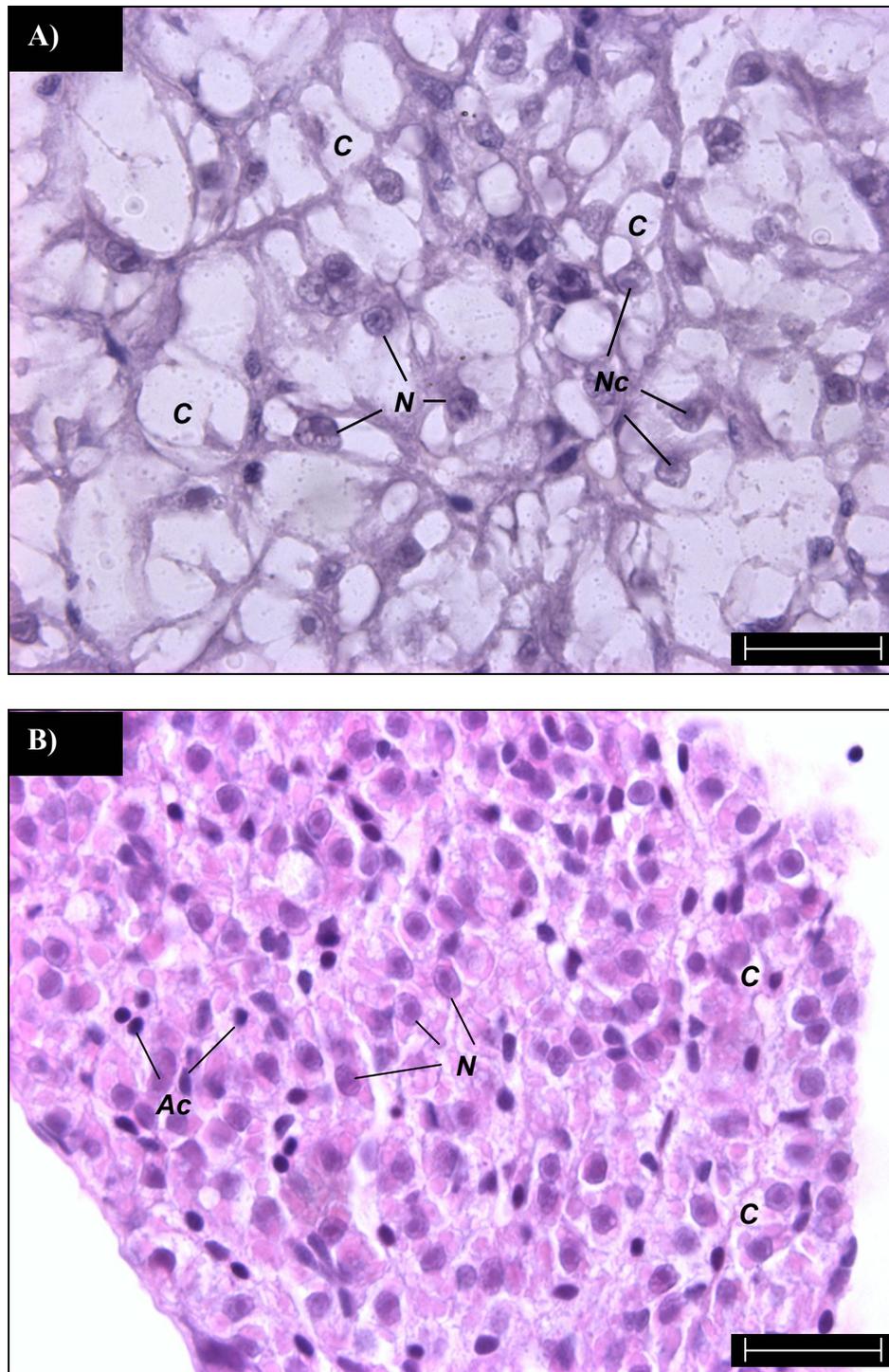


Figura 14. Microsecciones del hígado de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, día 21dde. A: Alimento vivo; B: Dieta microparticulada. La barra equivale a 20µm. Nótese el tamaño de los núcleos y el citoplasma en los hepatocitos.

Ac: Apoptosis celular  
C: Citoplasma

N: Núcleo  
Nc: Nucleolo

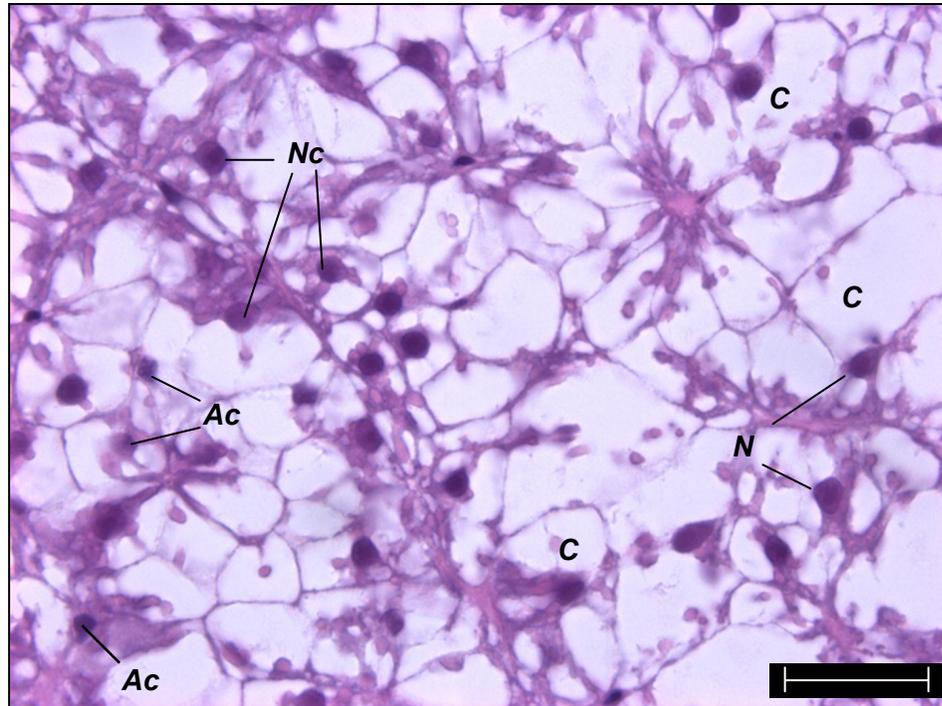


Figura 15. Microsecciones del hígado de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* alimentadas con dieta microparticulada, día 21dde. La barra equivale a 20 $\mu$ m.

Ac: Apoptosis celular  
C: Citoplasma

N: Núcleo  
Nc: Nucleolo

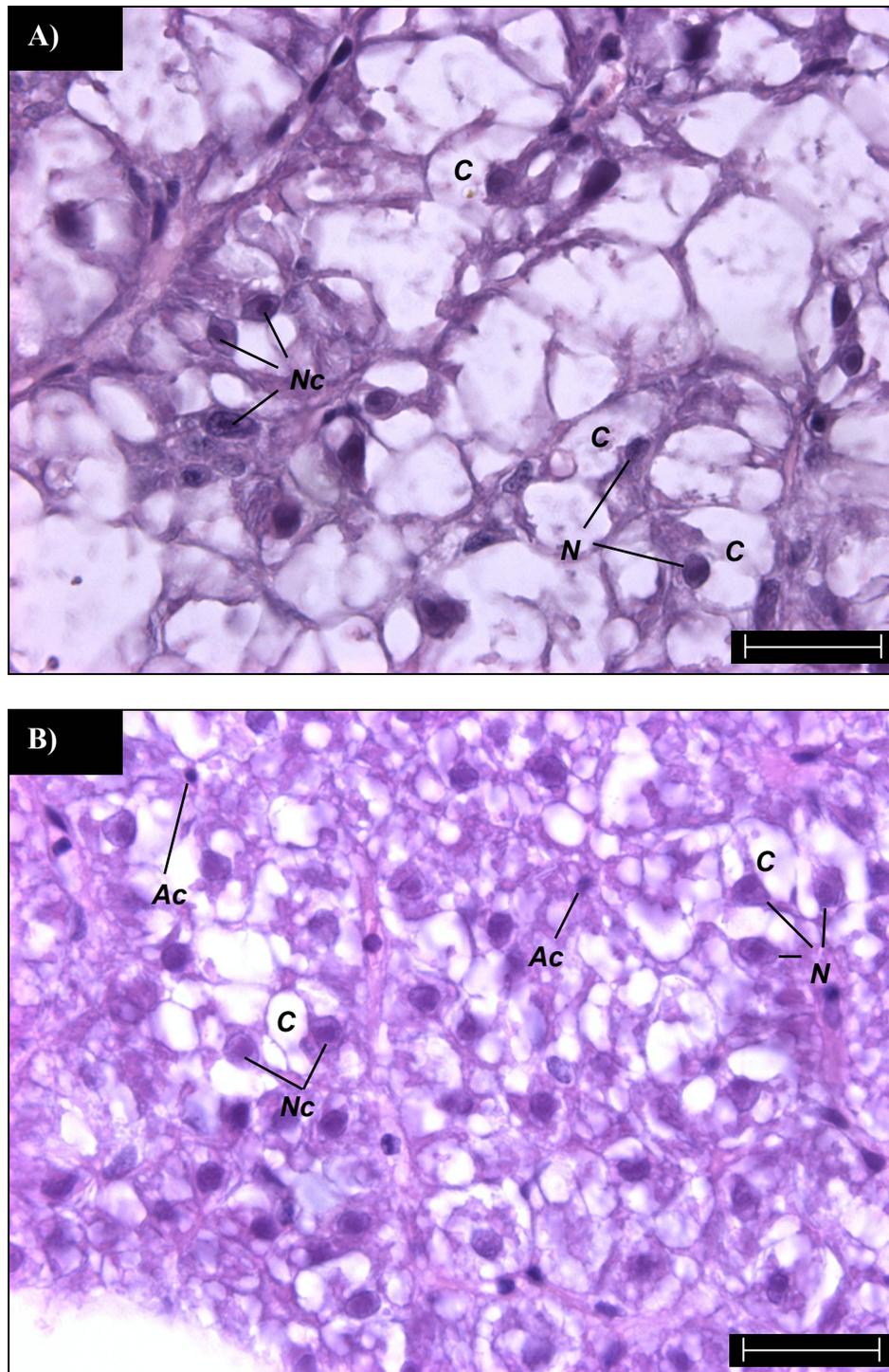


Figura 16. Microsecciones del hígado de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, día 27dde. A: Alimento vivo, B: Dieta microparticulada. La barra equivale a 20µm. Nótese el tamaño de los núcleos y el citoplasma de los hepatocitos.

Ac: Apoptosis celular  
C: Citoplasma

N: Núcleo  
Nc: Nucleolo

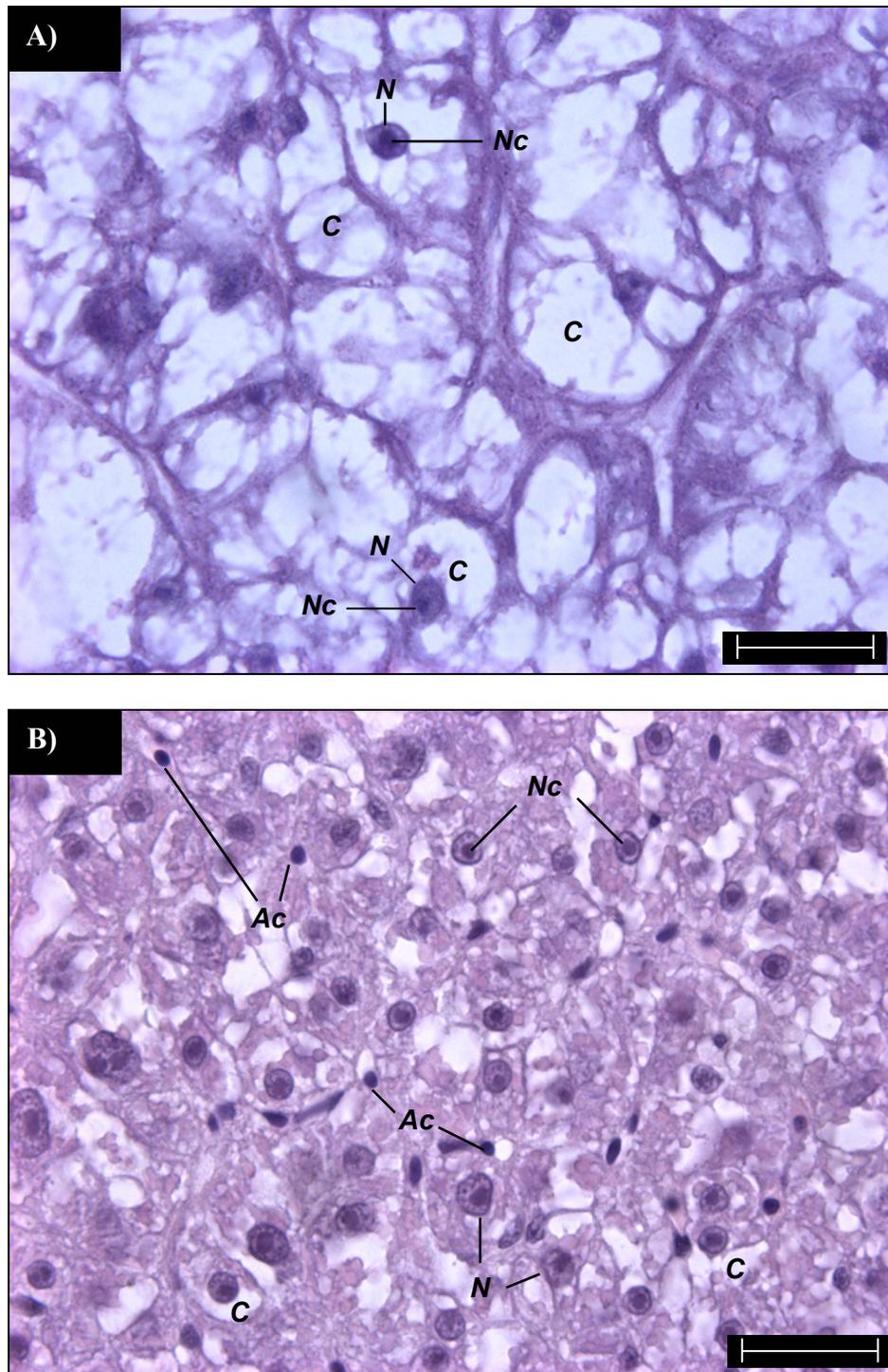


Figura 17. Microsecciones del hígado de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, día 33dde. A: Alimento vivo, B: Dieta microparticulada. La barra equivale a 20 $\mu$ m. Nótese el tamaño de los núcleos y el citoplasma.

Ac: Apoptosis celular  
C: Citoplasma

N: Núcleo  
Nc: Nucleolo

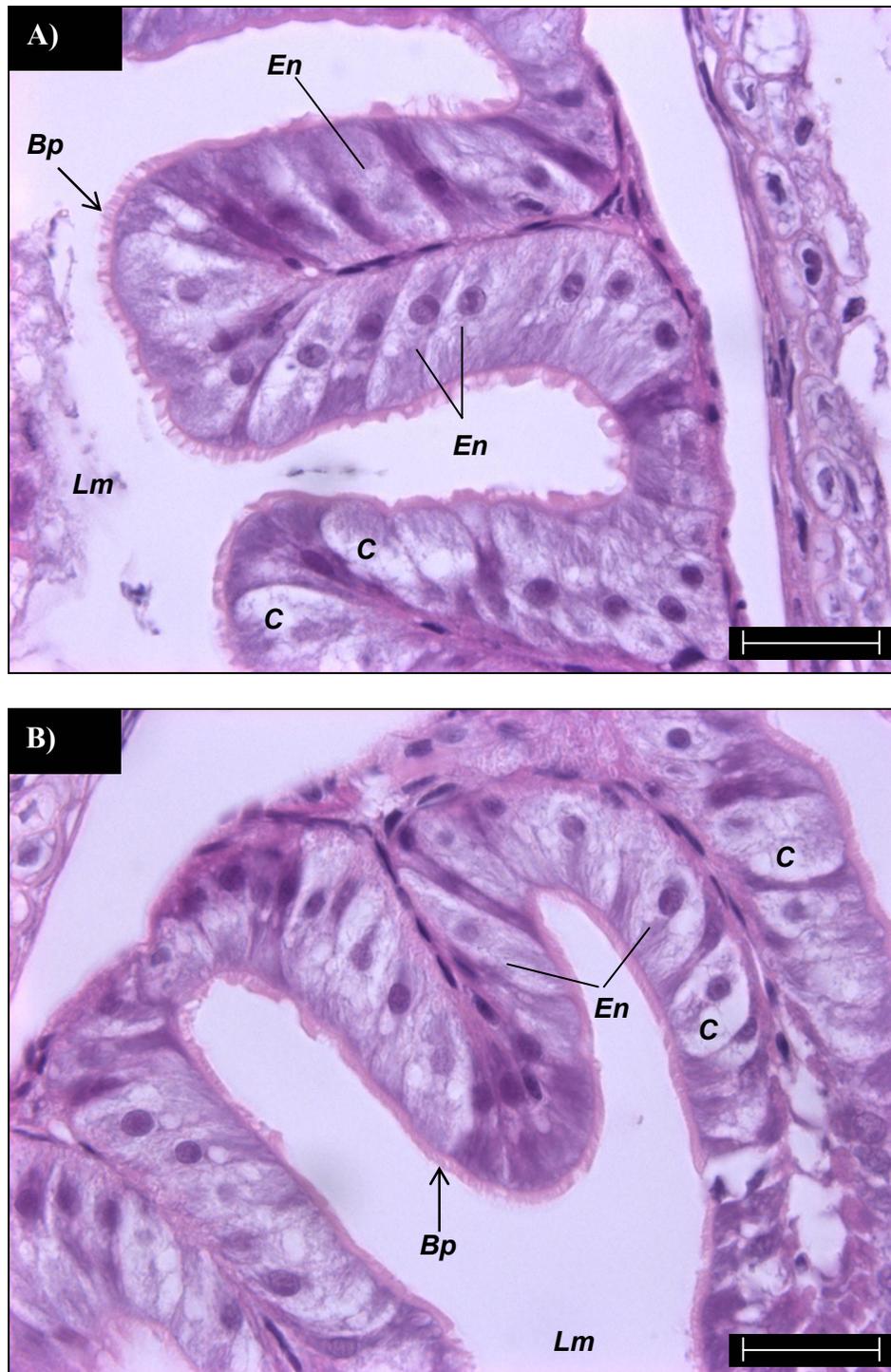


Figura 18. Microsecciones del intestino anterior de larvas de cabrilla arenera *Parabrax maculatofasciatus*, día 21dde. A: Alimento vivo, B: Dieta microparticulada. La barra equivale a 20 $\mu$ m.

*Bp*: Borde plumoso  
*C*: Citoplasma

*En*: Enterocitos  
*Lm*: Lumen

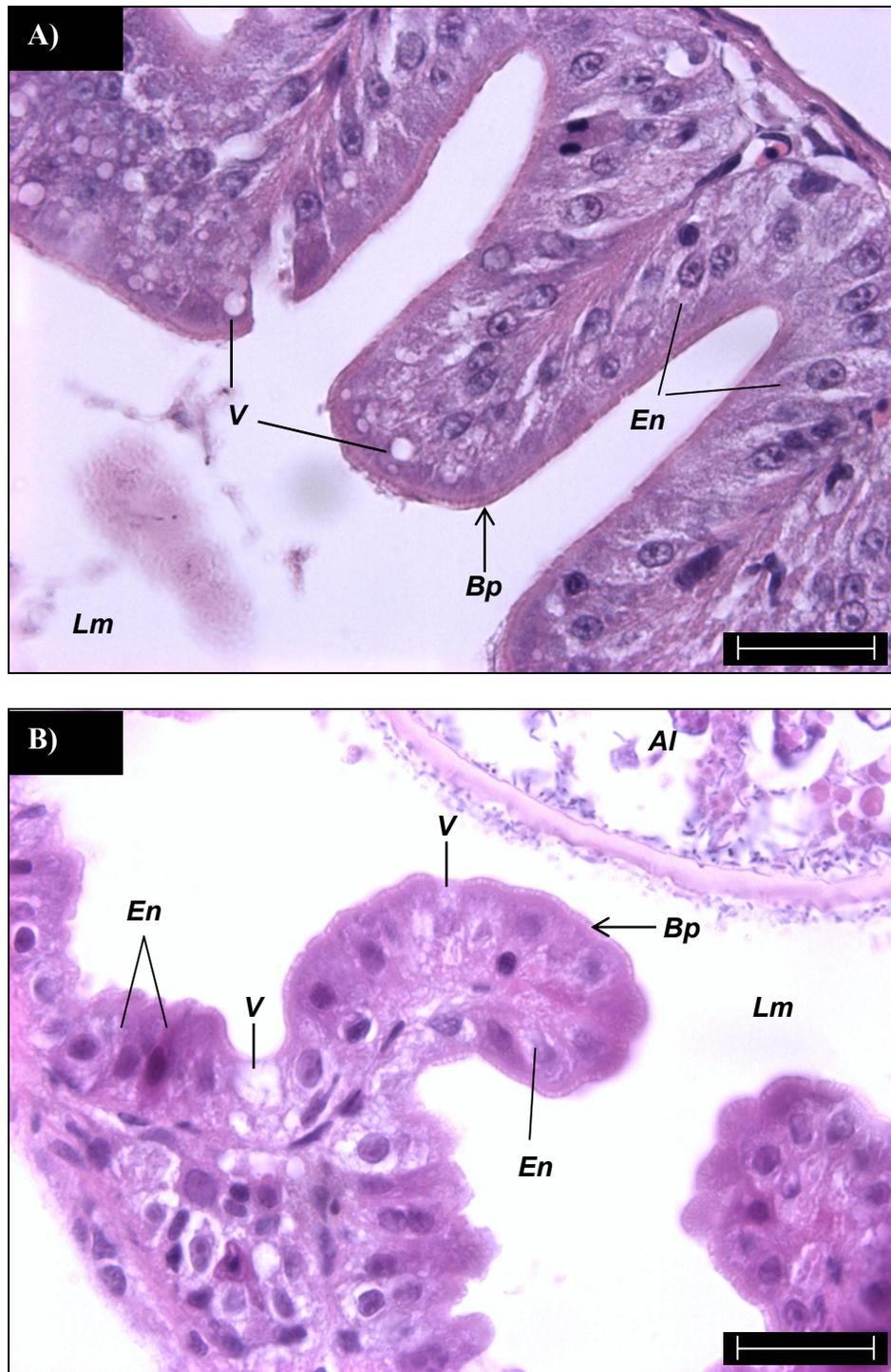


Figura 19. Microsecciones del intestino anterior de larvas de cabrilla arenera *Parabrax maculatofasciatus*, día 27dde. A: Alimento vivo, B: Dieta microparticulada. La barra equivale a 20 $\mu$ m.

Al: Alimento

En: Enterocitos

Lm: Lumen

Bp: Borde plumoso

V: Vacuola

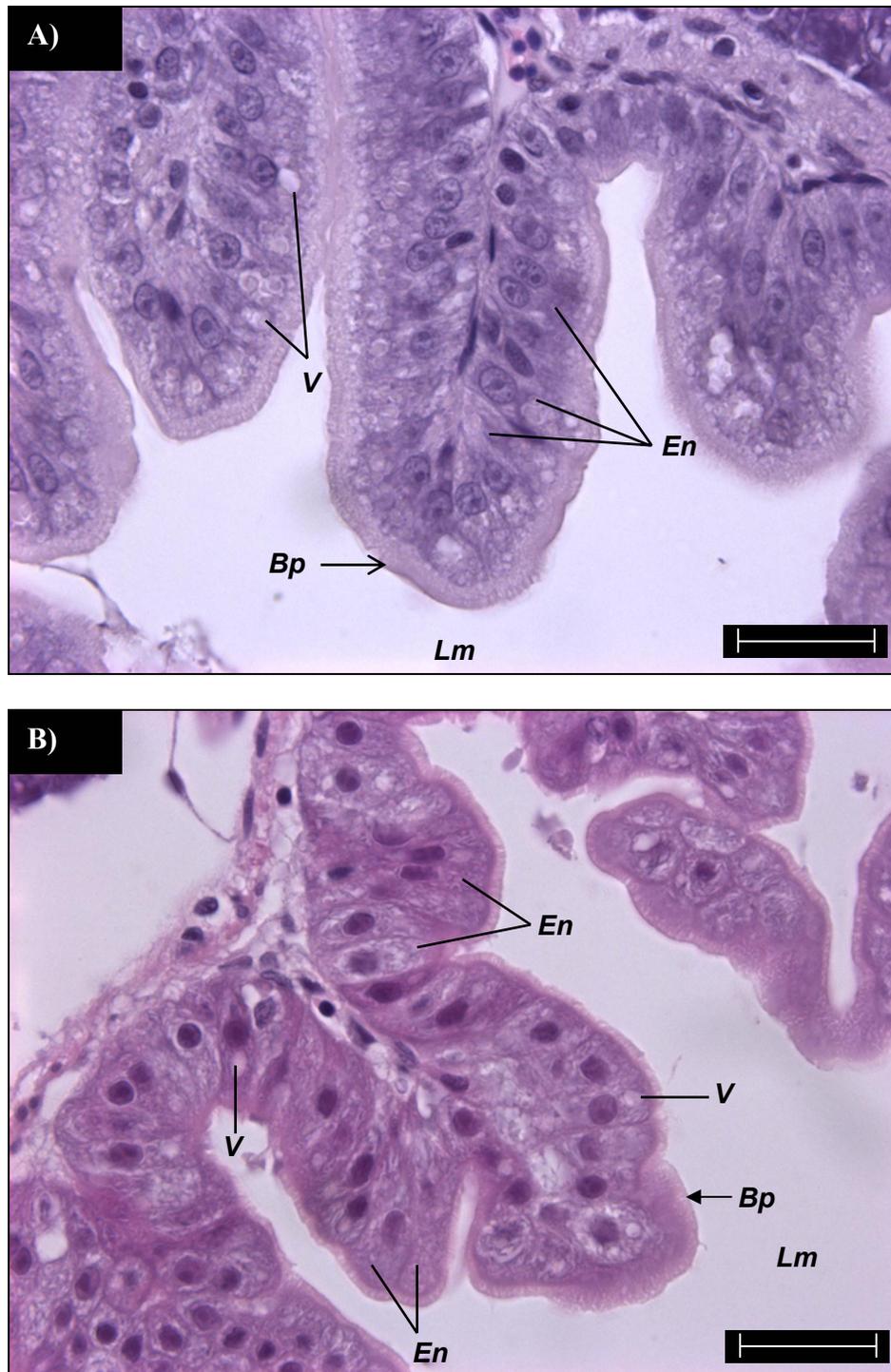


Figura 20. Microsecciones del intestino anterior de larvas de cabrilla arenera *Parabrax maculatofasciatus*, día 33dde. A: Alimento vivo, B: Dieta microparticulada. La barra equivale a 20µm. Nótese el tamaño de los enterocitos.

*Bp*: Borde plumoso  
*En*: Enterocitos

*Lm*: Lumen  
*V*: Vacuola

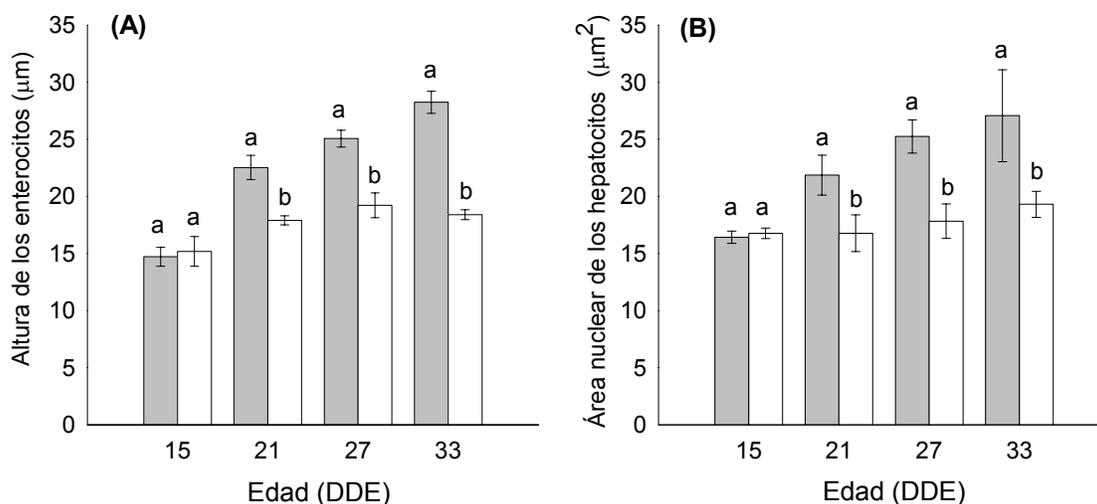


Figura 21. (A) Altura de los enterocitos y (B) área nuclear de los hepatocitos (media  $\pm$  desv. est.,  $n=3$ ) de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* durante el destete.  $\blacksquare$ -Alimento vivo,  $\square$ -Dieta microparticulada. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P<0.05$ ) para cada día. Cada replica,  $n = 10$  larvas para el día 15dde, 5 larvas para el día 21dde y 3 para los días 27 y 33dde.

### 7.2.3 Análisis bioquímico.

Las diferencias entre tratamientos alimenticios se evidenciaron desde el día 21dde. La concentración de ARN ( $59.55 \pm 1.27 \mu\text{g larva}^{-1}$ ), ADN ( $13.07 \pm 0.02 \mu\text{g larva}^{-1}$ ) y proteínas totales ( $439 \pm 48 \mu\text{g larva}^{-1}$ ) fueron significativamente mayores ( $P<0.05$ ) en las larvas alimentadas con el AV que en las larvas alimentadas con la DMP. Las larvas alimentadas con AV registraron los valores más altos al final del bioensayo (Fig. 22).

El índice ARN/ADN se incrementó fuertemente en las larvas alimentadas con AV, de 4.14 en el día 15dde a 6.4 para el día 33dde. En cambio, el índice ARN/ADN obtenido en las larvas alimentadas con la DMP disminuyó de 4.25 en el día 15dde a 3.8 para el día 33dde.

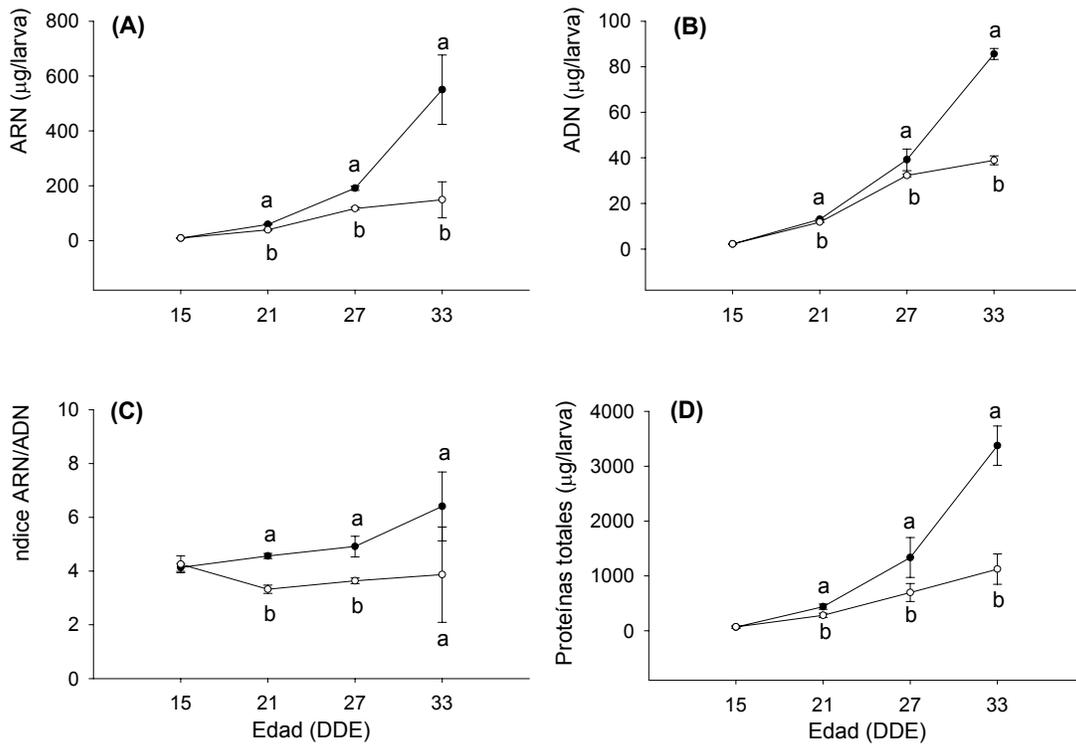


Figura 22. Concentración de ARN (A), ADN (B), Índice ARN/ADN (C) y Proteínas totales (D) (media  $\pm$  desv. est.,  $n=3$ ) de larvas de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* durante el destete.  $\bullet$  Alimento vivo  $\circ$  Dieta microparticulada. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) para cada día. Cada replica = 10 larvas para el día 15dde y 3 larvas para los días 21, 27 y 33dde.

## DISCUSIÓN



Las larvas de peces marinos se caracterizan por presentar tasas de crecimiento muy aceleradas que demandan altas cantidades de energía. Al momento de la eclosión, la larva se alimenta de sus reservas maternas (vitelo y gota de aceite), en el transcurso de esta etapa incrementa en longitud y pierde masa, principalmente debido al uso de aminoácidos libres y ácidos grasos como fuente primaria de energía (Fyhn y Serigstad, 1987; Fyhn, 1989; Buckley *et al.*, 1999). Una vez que se han agotado estas reservas, la larva requiere obtener energía de una fuente externa. Cuando la fuente energética es deficiente, presentará un crecimiento reducido, mientras que la falta de una fuente de energía, se compensará por el consumo de sus propias reservas, mediante la degradación de biomoléculas (catabolismo) y/o de componentes celulares (autólisis) para obtener energía (Love, 1980; Wilbraham y Matta, 1990; Pedersen, 1997).

### **8.1 Primera alimentación.**

#### **Análisis morfométrico.**

El peso seco mostró la condición nutricional de las larvas de cabrilla arenera desde el día 3<sup>do</sup>, puesto que se encontraron diferencias significativas entre larvas alimentadas y larvas sin alimentar. Las larvas alimentadas presentaron una condición nutricional buena, ya que mostraron incrementos significativos con el tiempo. Por el contrario, las larvas sin alimento mostraron una condición nutricional pobre al registrarse la pérdida significativa de peso seco con el tiempo, lo cual es un efecto de la inanición. Este resultado concuerda con el

obtenido en larvas sometidas a inanición de *Solea solea* (Richard *et al.*, 1991) en donde se reporta una pérdida significativa de peso seco a partir de los 2 días después de que se detectó la apertura de la boca y del ano.

El peso seco en las larvas de peces marinos ha sido definido como la suma de los componentes orgánicos e inorgánicos, entre los cuales las proteínas y los ácidos grasos, son los cuantitativamente más importantes (May, 1971; Buckley, 1979; Ronnestad *et al.*, 1999). Se ha observado que en periodos de inanición prolongados el organismo satisface sus necesidades energéticas mediante el catabolismo de sus biomoléculas (Love, 1980).

La pérdida de peso seco en las larvas en inanición puede explicarse en función de la degradación de proteínas (catabolismo proteínico). Este proceso produce un aumento en los espacios intercelulares y en el contenido de agua, observándose una relación inversa entre el contenido de agua y el contenido de proteínas en el organismo (Love, 1980). El catabolismo proteínico también ha sido observado en larvas sin alimentar de *Pleuronectes platessa* y *Clupea harengus* (Ehrlich, 1974; McGurk, 1985) y *Scophthalmus maximus* (Segner *et al.*, 1993). En larvas de *P. maculatofasciatus* durante la primera alimentación, Carrasco (2004) confirma que no son lípidos los primeros compuestos que se emplean para cubrir sus necesidades metabólicas durante la inanición, al no encontrar diferencias significativas entre larvas alimentadas y en inanición a nivel de lípidos totales y ácidos grasos en los días 2 y 3dde. Se sugiere, como en otras especies, que son las proteínas los primeros componentes en agotarse.

Mediante el uso de los caracteres morfométricos se encontró que la altura del músculo, fue la primera y única variable que mostró diferencias significativas entre larvas alimentadas y larvas sin alimentar desde el día 3dde. Es difícil denominar la condición nutricional de las larvas en este día con base a una sola variable. Diversos autores (Martin y Wright, 1987; Ferron y Leggett 1994; Catalán, 2003) han mostrado que la AM es una de las variables más sensibles a la carencia de alimento, debido a que las larvas degradan rápidamente las proteínas del músculo (Love, 1980). Sin embargo, Theilacker, 1978 y Powell y Chester, 1985;

consideran que las larvas se encuentran en inanición cuando presentan diferencias significativas, a partir de 4-5 variables morfométricas. A pesar de que las larvas de cabrilla arenera restringidas de alimento presentaron una menor condición nutricional en el día 3dde, es posible que pudieran recuperarse al ser alimentadas. Peña y Dumas (2005) demuestran que las larvas de cabrilla arenera tienen la capacidad para recuperarse al retrasarles la primera alimentación 1 y 2 días. Este hecho sustenta la idea de que las larvas sin alimento posiblemente aun no se encontraban en inanición. Al respecto, Catalán (2003) denomina a las larvas de *Dicentrarchus labrax* como recuperables, cuando tienen la capacidad de alimentarse después de ser sometidas a periodos sin alimento y no morir por inanición. Theilacker y Watanabe (1989) hacen uso de este término cuando las larvas de *Engraulis mordax* presentan alimento en el tubo digestivo y muestran algunas señas de inanición.

Fue hasta el día 4dde, cuando se pudo detectar una condición nutricional pobre en las larvas de cabrilla arenera restringidas de alimento, debido a que las diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) se presentaron en seis de las siete variables evaluadas (LN, LPM, LCA, LC, AC y AM). En este día se registró la mortalidad masiva de las larvas sin alimento. Theilacker (1986) considera que las larvas de *Trachurus symmetricus* capturadas en el campo, se encuentran en condición nutricional pobre al detectar diferencias significativas con cuatro de once variables morfométricas evaluadas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Powell y Chester (1985) con larvas de *Leiostomus xanthurus* y Catalán (2003) con larvas de *Dicentrarchus labrax*, quienes empleando variables morfométricas determinan una pobre condición nutricional en las larvas sometidas a inanición hasta el día previo a su muerte. Peña y Dumas (2005) encontraron diferencias significativas para la morfometría de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus* sin alimentar hasta el día 5dde, día en el cual murieron las larvas.

El diámetro del ojo fue la única variable que no mostró cambios significativos con el tiempo, esto puede atribuirse a la importancia del sistema visual en la alimentación ya que las larvas de la cabrilla arenera son depredadores

visuales (Peña *et al.*, 2004). Este resultado concuerda con el de Catalán (2003) en larvas de *Dicentrarchus labrax*, ya que encuentra que el diámetro del ojo de las larvas no sufre cambios significativos durante 10 días de inanición y lo atribuye al papel que juega el sistema visual en la alimentación de esta especie. Nelson *et al.* (1994) y Mittelbach *et al.* (1999) sugieren que las estructuras de la cabeza involucradas en los mecanismos de alimentación (ojo, mandíbula, branquioespinas, etc) son de los últimos caracteres morfométricos en sufrir daños ante la carencia de alimento.

### **Análisis histológico.**

Dos días después de haber eclosionado (2dde), las larvas de cabrilla arenera presentaron el desarrollo suficiente que les permitió iniciar con la obtención y absorción del alimento exógeno, tal como lo reportan Peña *et al.* (2003). Sin embargo, al restringirles el alimento se encontró hasta el día 4dde una disminución significativa ( $P < 0.05$ ) en la altura de los enterocitos y el área nuclear de los hepatocitos, lo cual evidenció que la condición nutricional en éste grupo de larvas fue pobre y fue un claro reflejo de los efectos de la inanición. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en larvas de *Engaulis mordax* (Theilacker y Watanabe, 1989), *Odontesthes bonariensis* (Strüssmann y Takashima, 1990), *Scophthalmus maximus* (McFadzen *et al.*, 1994) y *Pomacentrus coelestis* (Hall y Bellwood, 1995) ya que han servido para determinar estadios de inanición. En *Paralabrax maculatofasciatus*, estas alteraciones son reportadas en larvas restringidas de alimento (Peña y Dumas, 2005). Esto se atribuye a que el hígado y el tubo digestivo son de los primeros órganos en sufrir degeneración celular cuando no se cubren los requerimientos nutricionales, debido a que el hígado se encarga del almacenamiento de glucógeno y el tubo digestivo de la digestión y absorción de los nutrientes provenientes del alimento (Segner *et al.*, 1993).

Love (1980) y Hall y Bellwood (1995) sugieren que la autólisis celular es un proceso empleado para satisfacer las necesidades metabólicas en periodos

severos de inanición, este proceso puede ser tan severo e irreversible que causa atrofia de los tejidos y/u órganos y ha sido confirmado por la presencia de necrosis celular (Strüssmann y Takashima, 1990; McFadzen *et al.*, 1997). Posiblemente la disminución en la altura de los enterocitos y el área nuclear de los hepatocitos de las larvas de cabrilla arenera restringidas de alimento se puede atribuir a una autólisis celular, mientras que la presencia de apoptosis puede ser una señal de que experimentaron atrofia celular. Esta idea es apoyada por los resultados obtenidos por Peña y Dumas (2005) quienes sugieren que las larvas de cabrilla arenera son incapaces de digerir apropiadamente el alimento después de retrasarles 3 días la primera alimentación, ya que, aun y cuando las larvas ingirieron el alimento murieron en los dos días siguientes. McFadzen *et al.* (1997) sugieren que la presencia de necrosis celular es característico en larvas de *Sardina pilchardus* en condición nutricional pobre.

Contrariamente, el incremento significativo en la altura de los enterocitos y el área nuclear de los hepatocitos, confirmó que la condición nutricional de las larvas alimentadas fue buena. En los enterocitos, el incremento en los pliegues de la mucosa permitió aumentar la superficie de absorción y mantener el alimento ingerido por un periodo de tiempo mayor. Segner y Rösch (1998) sugieren que el incremento de la mucosa intestinal permite a las larvas lograr una mejor digestión y una mayor absorción de nutrientes provenientes del alimento exógeno. Además, la presencia de vacuolas en los enterocitos del intestino anterior de las larvas alimentadas, corresponde a una señal de la funcionalidad de los enterocitos al acumular y absorber los lípidos del alimento exógeno (Sarasquete *et al.*, 1995; Segner y Rösch, 1998; Peña *et al.*, 2003).

Peña *et al.* (2003) encontraron que la reacción PAS positiva en el hígado de larvas de cabrilla arenera al día 4dde, es una señal de la funcionalidad de los hepatocitos al acumular glucógeno. Esto fue corroborado con el análisis cualitativo, ya que en las larvas alimentadas se observaron hepatocitos con citoplasma bien desarrollado y que al igual que en este trabajo, ha sido reportado en otras especies de peces (Love, 1980; Guyot *et al.*, 1995, Sarasquete *et al.*,

1995; Robaina *et al.*, 1998; Santamaría *et al.*, 2004). En cuanto al incremento en el área nuclear, Segner y Rösch (1990) mencionan que se debe a un alto metabolismo hepático. Storch *et al.* (1983) y Strüssmann y Takashima (1990) sugieren que es producto de una alta síntesis de proteínas, ya que el núcleo representa el sitio de transcripción de la síntesis de proteínas.

### **Análisis bioquímico.**

La concentración de ARN y el índice ARN/ADN fueron sensibles a los cambios en relación a la edad, ya que evidenciaron la condición nutricional de las larvas de cabrilla arenera desde el día 3<sup>de</sup>. Se determinó que las larvas alimentadas presentaron una condición nutricional buena al mostrar incrementos significativos en la concentración de ARN y el índice ARN/ADN, a diferencia de las larvas restringidas de alimento. El decremento significativo demostró una pobre condición nutricional, poniendo de manifiesto que las larvas se encontraron en inanición. Estos resultados muestran la rapidez con que el índice ARN/ADN respondió a la inanición en las larvas de cabrilla arenera, tal como lo reportan Martin y Wright (1987) con larvas de *Morone saxatilis* y Richard *et al.* (1991) con larvas de *Solea solea*, al detectar inanición con el índice ARN/ADN 2 días después de la primera alimentación y Cunha *et al.* (2003) en larvas de *Scophthalmus maximus*, 3 días después de observar la completa reabsorción del vitelo y la gota de aceite.

Los cambios observados en el índice ARN/ADN están en función de los cambios en la síntesis ribosomal y la producción de ribosomas (Buckley, 1979), por eso la disminución del índice puede ser explicado por la degradación del ARN y la permanencia del ADN. Las larvas de cabrilla arenera se apegan al modelo propuesto por Clemmesen (1996) para entender la funcionalidad del índice ARN/ADN en larvas de peces, en el cual se detectan tres fases bien delimitadas de acuerdo con la cantidad de ARN. La Fase I se caracteriza por que la actividad ribosomal disminuye muy lentamente. La Fase II, se define por una concentración de ARN muy baja debido a que la actividad de los ribosomas decrece, hasta el

grado en que los ribosomas comienzan a degradarse y disminuir en número. Finalmente, en la Fase III se presenta la degradación de ARN hasta el nivel crítico, el cual se identifica por presentar concentraciones similares a las del ADN, entonces el índice ARN/ADN alcanza el mínimo necesario para sobrevivir (1.0). En las larvas de cabrilla arenera en inanición, se detectó la fase II en el día 3dde y la fase III en el día 4dde cuando el índice ARN/ADN mostró el valor de 1.0, lo que evidenció una pobre condición nutricional. La escala de tiempo para pasar de una fase a otra es dependiente de la especie, la edad y la temperatura (Clemmesen, 1996; Buckley *et al.*, 1999). Estos resultados concuerdan con lo reportado por diversos autores en distintas especies (Buckley, 1984; Wright y Martin, 1985; Clemmesen, 1987; Hovenkamp, 1990; Richard *et al.*, 1991; Canino *et al.*, 1991; Ueberschrär y Clemmesen, 1992; Clemmesen, 1994; Morioka *et al.*, 1996; Catalán, 2003; Gwak *et al.*, 2003) en donde, independientemente de la especie, se ha observado que el índice alcanza valores cercanos a 1 en periodos prolongados de inanición y previo a la muerte.

Se ha propuesto que al punto de no retorno (PNR) le corresponde un nivel crítico del índice ARN/ADN que es dependiente de la especie (Clemmesen *et al.*, 1997; Chícharo *et al.*, 1998; Gwak y Tanaka, 2001; Ramírez *et al.*, 2004; Sykes *et al.*, 2004). Peña y Dumas (2005) encuentran que el punto de no retorno para la cabrilla arenera con base al análisis morfométrico e histológico, ocurre entre 4 y 5dde. En este trabajo, puedo confirmarse con el análisis de ácidos nucleicos que el PNR se presentó en el día 4dde, en el cual se obtuvo el valor del índice ARN/ADN mínimo necesario para sobrevivir y tras el cual, aunque se consuma alimento ya no lograrían recuperarse. McNamara y Buckley (1994) y McNamara *et al.* (1999) sugieren que la maquinaria ribosomal es drástica e irreversiblemente dañada cuando el índice alcanza valores cercanos a 1.0 en larvas de *Gadus morhua* sometidas a inanición, debido a que la cantidad de ARN disminuye drásticamente poco antes de morir, resultando muy complicado reestablecer la síntesis de proteínas y por ende una buena condición nutricional.

Es importante resaltar que el índice ARN/ADN mostró valores cercanos a 1.0 desde el día 2dde en ambos tratamientos, día en el cual se observó que se agotaron las reservas maternas. Bulow (1987) menciona que el valor más bajo del índice se alcanza tras la completa absorción de las reservas maternas, previo a la primera alimentación exógena. Buckley *et al.* (1990) sugieren que la calidad del vitelo de las larvas de *Pseudopleuronectes americanus* está relacionado con la cantidad de ARN, la formación de tejidos y el tamaño de la larva al momento de la primera alimentación. Generalmente, en la literatura disponible se encuentran índices por arriba de 2.0 en diferente especies al momento en que agotan sus reservas maternas y previo a la primera alimentación exógena, por ejemplo en *Scophthalmus maximus* se encontró un índice de 2.2 (Clemmesen, 1987), en *Morone Saxatilis* fue de 2.17 (Martin y Wright, 1987), en *Clupea harengus* el índice fue 2.0 (Clemmesen, 1994), para *Paralichthys olivaceus* fue de 2.15 (Guak *et al.*, 2003) y en *Pseudopleuronectes americanus* de 2.7 (Mercier *et al.*, 2004). Es posible que las larvas de la cabrilla arenera presentaran un índice de ARN/ADN cercano a 1.0 debido a que la calidad o la cantidad del vitelo no promovió una síntesis ribosomal alta ó porque el desove obtenido fue inducido hormonalmente en los reproductores de cabrilla arenera (LHRHa), se ha reportado que los desoves inducidos con hormonas son de menor calidad que los desoves espontáneos en función de numero de huevos flotantes y tasa de eclosión (Zohar y Mylonas, 2001).

En trabajos posteriores (datos no publicados), bajo las mismas condiciones de cultivo, se encontró un índice de 1.7 en el día 2dde en larvas obtenidas de un desove espontáneo inducido por temperatura y fotoperiodo. Aun y cuando el índice ARN/ADN obtenido, no es un efecto de la inanición, nos demuestra la utilidad que representa este índice como herramienta para evaluar la calidad de las larvas antes de comenzar con la primera alimentación. Peña y Dumas (2005) reportan que la mortalidad de las larvas de cabrilla arenera restringidas de alimento se registró en el día 5dde; en este trabajo la mortalidad se registró un día antes, es decir en el día 4dde. Esta observación junto con el bajo índice ARN/ADN

en las larvas recién eclosionadas, nos sugiere que las larvas del presente trabajo fueron de menor calidad. Con base a ello, se determinó que las larvas de cabrilla arenera obtenidas de los desoves inducidos presentaron una condición nutricional intermedia, pues a pesar de esta deficiencia, las larvas alimentadas mostraron la capacidad de mejorar su condición nutricional al incrementar significativamente el índice ARN/ADN con la edad. Clemmesen (1987) menciona que las larvas de *Clupea harengus* y *Scophthalmus maximus* se encuentran en condición nutricional intermedia cuando presentan índices ARN/ADN bajos y al ser alimentadas, el índice se incrementa, mejorando su condición nutricional.

## 8.2 Estrategia de destete.

### Análisis morfométrico.

Los indicadores evaluados en esta etapa, mostraron que la sustitución del AV por la DMP retrasó significativamente el crecimiento y disminuyó la condición nutricional de las larvas destetadas.

Se detectó una condición nutricional deficiente en las larvas alimentadas con DMP a partir del día 21dde con el peso seco, al no mostrar incrementos significativos con el tiempo, lo cual puede atribuirse a una baja acumulación de proteínas en los tejidos, como se ha observado en otras especies de peces (Love, 1980). Los caracteres morfométricos evidenciaron esta condición nutricional en el día 27dde cuando cuatro de las ocho variables evaluadas fueron significativamente menores. Respecto a la tasa de crecimiento específico (TCE), se detectó la deficiente condición nutricional hasta el día 33dde, ya que mostró que las larvas presentaron un crecimiento significativamente menor ( $P < 0.05$ ).

El retraso del crecimiento debido al uso de dietas inertes en comparación con el alimento vivo ha sido reportado en varias especies de larvas de peces (Dabrowski y Kaushik, 1984; Kanazawa *et al.*, 1989; Holt, 1993); específicamente en las larvas de cabrilla arenera ha sido reportado por Anguas-Vélez *et al.* (2000) y Álvarez-González (2003). Se atribuye a que las dietas inertes no satisfacen los requerimientos nutricionales específicos de acuerdo a la etapa de desarrollo del

organismo, esto puede causar que se reduzca la digestión o asimilación de la dieta inerte por parte del organismo (García-Ortega, 2000; Lazo, 2000).

García-Ortega *et al.* (2000) comprobaron que la DMP empleada en este trabajo cuenta con una alta digestibilidad de proteína, como resultado del procesamiento del alimento sobre la calidad de proteína, su capacidad autolítica y la solubilidad de la proteína. Presenta una gran inclusión de aminoácidos libres y de péptidos de bajo peso molecular lo que facilita la digestión y absorción en el tracto digestivo, además el perfil de ácidos grasos y aminoácidos es muy similar a los nauplios de *Artemia*, los cuales son componentes del alimento vivo ofrecido a las larvas (García-Ortega *et al.*, 1998). Estas características han sido reportadas como primordiales para obtener buenos resultados en el crecimiento de acuerdo con diversos autores (Fyhn, 1989; Walford y Lam, 1993; Segner *et al.*, 1994; Fyhn *et al.*, 1995; Rønnestad *et al.*, 1999).

Sin embargo, el menor crecimiento obtenido en las larvas de cabrilla arenera alimentadas con la DMP puede atribuirse a que las propiedades físicas y/o nutricionales de la DMP no fueron las más adecuadas para satisfacer los requerimientos nutricionales específicos de las larvas de la cabrilla arenera, ya que se carece de información sobre estos requerimientos. Asimismo, no debe descartarse una posible deficiencia en la ingesta de la DMP por parte de las larvas. Si bien no se evaluó la incidencia e intensidad alimenticia, se observó en los tanques de cultivo desde el inicio del periodo de coalimentación, que las larvas no aceptaron rápidamente la DMP; además, en el análisis histológico se observó en las laminillas que pocas larvas presentaron alimento en el intestino en el día 21<sup>do</sup> (día en el cual las larvas ya se alimentaban solo con la DMP). Aún y cuando se realizó una coalimentación para lograr un buen acondicionamiento de las larvas con el alimento inerte, es probable que el periodo (tiempo) de coalimentación no fuera lo suficientemente amplio para que las larvas aceptaran el nuevo alimento (Rosenlund *et al.*, 1997).

Álvarez-González (2003), comparó el crecimiento y la sobrevivencia de larvas de cabrilla arenera alimentadas con tres dietas microparticuladas con

diferentes fuentes de proteína (hidrolizado de proteína de pescado, harina de calamar y harina de sangre de res, con un nivel de inclusión del 15% base húmeda) y dos tiempos de inicio del destete (17 y 22dde). Respecto al destete realizado a los 17dde, el autor encontró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el crecimiento y en las DMPs hasta el día 30dde, siendo las larvas alimentadas con la DMP elaborada a base de hidrolizado de proteína de pescado, las que presentaron el mejor crecimiento, con una LT de  $9.6 \pm 1.1$  mm; siendo similar al resultado obtenido en este trabajo al día 33dde ( $9.3 \pm 1.2$  mm). Sin embargo, antes de concluir que la dieta empleada en este trabajo fue satisfactoria, es importante resaltar que los efectos de la DMP son a nivel morfofisiológico y no solamente en términos de crecimiento y sobrevivencia. Por esto, debido a las alteraciones que se observaron en el presente trabajo desde el día 21dde, se considera que la dieta artificial todavía pudiera ser mejorada.

Álvarez-González (2003) sugiere que el empleo de hidrolizado de proteína de pescado favorece el crecimiento de las larvas de la cabrilla arenosa, ya que es un producto parcialmente digerido, el cual incorpora péptidos pequeños y aminoácidos libres que facilitan la absorción y digestión en el tracto digestivo. En cambio, cuando la proteína no es predigerida se requiere invertir un mayor gasto energético para digerirla, dado que la proteína tienen un mayor nivel de complejidad (Kolkovski y Tandler, 2000). Cahu *et al.* (1999) mostraron que la adición de hidrolizados de proteínas de pescado en la dieta para larvas de *Dicentrarchus labrax* facilitó la maduración de los enterocitos e incrementó el crecimiento y la sobrevivencia al compararlo con dietas carentes de hidrolizado.

### **Análisis histológico.**

Diversos autores han mostrado que la estructura celular del intestino y del hígado de las larvas de peces responden rápidamente a los cambios de dietas (Segner y Rösch, 1990; Strüssmann y Takashima, 1990; Segner *et al.*, 1993; Caballero *et al.*, 1999 y 2003). Las larvas de cabrilla arenosa no son la excepción, la altura de los enterocitos y el área nuclear de los hepatocitos mostraron

diferencias significativas desde el día 21dde debido a la sustitución del AV por la DMP evidenciando su condición nutricional.

Con base al análisis cualitativo en el día 21dde, se observó que las diferencias en el intestino anterior fueron mínimas entre larvas alimentadas con el AV y la DMP y aunque en el hígado las diferencias fueron más evidentes, es importante resaltar que algunas larvas destetadas presentaron características cualitativas similares a las larvas alimentadas con el AV; con base a estas características se determinó que las larvas destetadas presentaron una condición nutricional intermedia en este día. Estos resultados coinciden con los reportados por Theilacker y Watanabe (1989) y McFadzen *et al.* (1994), quienes clasifican a las larvas en condición nutricional intermedia, cuando presentan características histológicas moderadamente afectadas por la falta de alimento. Estas observaciones nos sugieren que las larvas alimentadas con la DMP presentaron señas de una malnutrición prematura, como ha sido reportada en larvas de *Coregonus lavaretus* (Segner y Rösch, 1990), *Sparus aurata* (Robaina *et al.*, 1998; Caballero *et al.*, 1999; 2003) y *Oncorhynchus mykiss* (Glencross *et al.*, 2004) alimentadas con diferentes tipos de dietas artificiales.

Sin embargo, el análisis cuantitativo en día 21dde, detectó que las larvas alimentadas con la DMP presentaron una condición nutricional deficiente, al mostrar un tamaño significativamente ( $P < 0.05$ ) menor en la altura de los enterocitos y el área nuclear de los hepatocitos. En cambio, en las larvas alimentadas con AV se detectó una condición nutricional buena, ya que se encontraron incrementos significativos en la altura de los enterocitos y el área nuclear de los hepatocitos.

A partir del día 27dde las diferencias observadas entre tratamientos alimenticios, con base al análisis cualitativo fueron bien marcadas y se acentuaron en el día 33dde. Igualmente, la altura de los enterocitos y el área nuclear de los hepatocitos se mantuvieron significativamente menores en las larvas alimentadas con la DMP hasta finalizar el bioensayo y por ende, las larvas destetadas presentaron y mantuvieron una deficiente condición nutricional. Esto apoya la idea

de que este grupo de las larvas presentaron malnutrición. Este estado de malnutrición ha sido reportado en larvas de *Scophthalmus maximus* (Segner y Witt, 1990), *Coregonus lavaretus* (Segner y Rösch, 1990) y *Sciaenops ocellatus* (Holt, 1993) al alimentarse con dietas artificiales. Esto refuerza el argumento anteriormente expuesto, de que las propiedades físicas y/o nutricionales de la DMP posiblemente no fueron las más adecuadas para satisfacer los requerimientos alimenticios específicos de las larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*.

Sin embargo, existe la posibilidad de que las larvas no presentaron el tamaño adecuado para ser destetada. La estrategia de destete se realizó basándose en los principales eventos del desarrollo del sistema digestivo de las larvas de cabrilla arenera, como son la diferenciación del tracto digestivo y la presencia de las glándulas gástricas a los 16dde cuando las larvas midieron en promedio 7.2 mm de longitud total (Peña *et al.*, 2003), así como la presencia de casi todas las enzimas digestivas a los 12-15dde (Álvarez-González, 2003). Asimismo para fines de comparación con el estudio de este último autor, se empleó el mismo día de destete. Sin embargo, la diferenciación en el desarrollo de las larvas de la cabrilla arenera está relacionado con la talla, más que con la edad, tal y como lo menciona Blaxter (1988) al igual que en otras especies de larvas de peces; por lo cual, el hecho de que las larvas de este estudio solamente midieron 5.37 mm de longitud total en promedio, en el día 15dde, cuando se inició la coalimentación, les pudo impedir aprovechar adecuadamente los nutrientes de la DMP al iniciar el destete, ya que las diferencias observadas en la altura de los enterocitos puede ser un reflejo de la baja absorción de la DMP. Al respecto, Cahu y Zambonino-Infante (2001) mencionan que proporcionar dietas artificiales tempranamente a las larvas puede retrasar el desarrollo y dañar la estructura de los enterocitos, afectando la capacidad digestiva y de absorción de las larvas. Segner *et al.* (1993) encontraron una menor altura de los enterocitos en larvas de *Clarias gariepinus* y *Coregonus lavaretus* al alimentarlas con una dieta artificial. Asimismo, se ha considerado que la presencia de las vacuolas en los enterocitos

del intestino anterior es evidencia de la absorción y acumulación de lípidos (Sarasquete *et al.*, 1995; Segner y Rösch, 1998; Porter y Theilacker, 1999). En las larvas destetadas de cabrilla arenera, las vacuolas observadas en los enterocitos del intestino anterior fueron mínimas en número y tamaño durante el transcurso del experimento. Por el contrario, en las larvas alimentadas con AV se observaron numerosas vacuolas de distintos tamaños, tal como lo reporta Peña *et al.* (2003).

El menor tamaño en el área nuclear de los hepatocitos de las larvas de cabrilla arenera alimentadas con la DMP, puede deberse a un bajo metabolismo hepático, tal y como lo sugieren Segner y Rösch (1990) en larvas de *Coregonus lavaretus*, al comparar cuatro dietas inertes y zooplancton como alimento vivo; ya que observaron que en las larvas alimentadas con zooplancton, los núcleos en los hepatocitos fueron significativamente mayores que en los hepatocitos de las larvas alimentadas con dietas artificiales.

### **Análisis bioquímico.**

Desde el día 21<sup>de</sup>, se detectó que la condición nutricional de las larvas de cabrilla arenera alimentadas con la DMP fue deficiente, puesto que la concentración de ARN, proteínas totales y el índice ARN/ADN mostraron diferencias significativas respecto al AV.

El incremento observado en las larvas alimentadas con AV, en la cantidad de ARN, proteínas totales y el índice ARN/ADN fue significativamente mayor y puso de manifiesto una buena condición nutricional. Puesto que el incremento en estos componentes es un claro reflejo de una alta síntesis del ARN ribosomal, la formación de nuevos ribosomas, el aumento en la eficiencia de los mismos y finalmente el aumento en la síntesis de proteínas, como se ha reportado en larvas de *Clupea harengus*, *Engraulis anchoita*, *Scophthalmus maximus* (Clemmesen, 1996), *Salmo salar* (Sveier *et al.*, 2000), *Paralichthys olivaceus* (Guak *et al.*, 2003), *S. maximus* (Cunha *et al.*, 2003) y *Pseudopleuronectes americanus* (Mercier *et al.*, 2004). Esto nos demuestra que el índice ARN/ADN, es un indicativo del potencial de crecimiento para las larvas de cabrilla arenera, ya que como lo mencionan

Houlihan *et al.* (1995) la incorporación y depósito de proteínas en el tejido muscular es un requisito para un crecimiento exponencial sostenido.

El índice ARN/ADN determinado para las larvas alimentadas con la DMP se mantuvo significativamente menor desde el día 21dde hasta el final del bioensayo, poniendo en evidencia que la síntesis de ARN ribosomal fue baja. De acuerdo con diversos autores (Fyhn, 1989; Walford y Lam, 1993; Ronnestad *et al.*, 1999) para que una síntesis óptima de proteínas tenga lugar, es necesario que todos los aminoácidos estén presentes simultáneamente y en las cantidades adecuadas (Conceicao *et al.*, 2003; Aragao *et al.*, 2004). El alto contenido de aminoácidos en los organismos del zooplancton silvestre corrobora esta idea (Dabrowski y Rusiecki, 1983; Fyhn *et al.*, 1993). Sin embargo, si el equilibrio entre aminoácidos no es alcanzado, entonces sobreviene una baja incorporación de aminoácidos y una actividad ribosomal limitada, reflejándose en un pobre crecimiento (Klug y Cummings, 1999). García-Ortega *et al.* (1998), comprobaron que el perfil de aminoácidos de la DMP es muy similar al de los nauplios de la *Artemia*, sin embargo, es posible que éste perfil no fue el adecuado para las larvas de la cabrilla arenera, provocando una baja actividad ribosomal debido a una baja incorporación de aminoácidos, lo cual se corroboró por que el índice ARN/ADN disminuyó en una unidad en el día 21dde y se mantuvo bajo durante el transcurso del bioensayo, asimismo por el menor tamaño del área nuclear de los hepatocitos, ya que éstos representan el sitio de transcripción de la síntesis de proteínas. Esto nos sugiere que las larvas alimentadas con la DMP presentaron signos de malnutrición desde el día 21dde.

### **8.3 Comparación y selección de los indicadores de la condición nutricional.**

Teniendo en cuenta que los valores obtenidos en cada análisis son específicos para cada especie (Ferron y Leggett, 1994), los resultados obtenidos en el presente trabajo, muestran que los indicadores evidenciaron la condición nutricional de las larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* en

distintos tiempos de respuesta ante la restricción de alimento y en el uso de una dieta artificial (Tabla 4).

En la primera alimentación, el peso seco y el índice ARN/ADN fueron los más sensibles al determinar el estado de inanición desde el día 3dde en las larvas sin alimento, ya que el tiempo de respuesta fue menor con respecto a la morfometría e histología, los cuales, detectaron el estado de inanición en el día 4dde. El índice ARN/ADN no solo detectó el estado de inanición desde el día 3dde, sino que los resultados obtenidos en el día 2dde, sugieren que este indicador puede emplearse como una herramienta para evaluar la calidad de las larvas al comenzar con una corrida larvaria.

Vale la pena mencionar que la técnica de inclusión en parafina para obtener las muestras histológicas, posiblemente no permitió detectar diferencias cuantitativas antes del día 4dde, dado lo sensible de los tejidos de las larvas en inanición a la manipulación, ya que el análisis cualitativo mostró pequeñas alteraciones celulares en el día 3dde. Al respecto, se ha reportado que existen diferencias entre métodos cualitativos (O'Connell 1976; Theilacker, 1986; Gonzalez *et al.*, 1993; McFadzen *et al.*, 1997) y cuantitativos (Ehrlich *et al.*, 1976; Theilacker y Watanabe, 1989; Strüssmann y Takashima, 1990; Segner *et al.*, 1993, McFadzen *et al.*, 1994) en la clasificación de la condición nutricional, no obstante, se ha demostrado que el método cuantitativo reduce el sesgo atribuible a las medidas cualitativas y a las diferencias en la experiencia del observador.

En la estrategia de destete, el peso seco, la altura de los enterocitos, el área nuclear de los hepatocitos, el índice ARN/ADN y las proteínas totales fueron los indicadores que detectaron alteraciones en la condición nutricional, desde el día 21dde en las larvas alimentadas con la DMP. Lo cual nos demuestra que son indicadores útiles para evaluar la calidad de una dieta artificial. Sin embargo, es muy probable que un muestreo más temprano (intervalos de muestreos menores a seis días) hubiese permitido separar los indicadores, en cuanto al tiempo de respuesta, se esperaría que sigan el nivel de organización natural de acontecimientos ante la deficiencia del alimento; es decir, un orden creciente

bioquímico-histológico-morfométrico. Esto nos representaría una clara ventaja para evaluar la calidad del alimento artificial empleado en un esquema de cultivo larvario, puesto que permitiría decidir rápidamente sobre el alimento que se está empleando al detectar los efectos negativos en la condición nutricional de las larvas, antes de que alcancen un nivel de organización biológica mayor, así se evitaría alcanzar un grado en donde los daños sean irreversibles, por ejemplo a nivel morfológico.

El empleo de ácidos nucleicos, específicamente el índice ARN/ADN se perfila como una de los indicadores más adecuados para detectar la condición nutricional y la calidad de las larvas de cabrilla arenera, ya que mostró una alta velocidad de respuesta frente a la carencia de alimento en la primera alimentación y ante un déficit nutricional en la estrategia de destete, además de que resultó un buen indicador del crecimiento, ya que una buena condición nutricional es un requisito para un crecimiento exponencial sostenido.

El método goza de simplicidad en el procedimiento, requiere de un proceso mínimo antes de realizar los análisis, que en comparación con las técnicas histológicas y otras técnicas bioquímicas, requieren de largos procedimientos y personal calificado. Los ácidos nucleicos son moléculas relativamente robustas que pueden ser almacenadas en condiciones relativamente simples (ultracongelación  $-50^{\circ}\text{C}$ ) y por periodos prolongados antes de su evaluación (Steinhart y Eckmann, 1992).

A pesar de la simplicidad de la técnica de extracción y cuantificación de ácidos nucleicos empleado en este trabajo, presenta la desventaja de que requiere un gran número de larvas (al menos 50 para esta especie) e impide evaluar la variabilidad individual, pues se han reportado variaciones entre individuos de la misma edad y talla similar de *Scophthalmus maximus* (Clemmesen, 1987), *Clupea harengus* (Raae *et al.*, 1988) y *Gadus morhua* (Richard *et al.*, 1991). En este sentido existen técnicas de extracción y cuantificación para ácidos nucleicos que permiten la evaluación a nivel individual, las cuales requieren cantidades de muestra pequeña hasta de 10  $\mu\text{g}$  de peso seco (Clemmesen, 1996).

No obstante, Ferron y Leggett (1994) y Suther (1996) sugieren que no existe un indicador único y óptimo para determinar la condición nutricional, ya que a menudo se emplea la combinación de algunos de ellos para lograr resultados que fortalezcan el objetivo de estudio. Con base a los resultados obtenidos en este trabajo, el índice ARN/ADN puede ser perfectamente combinado con otros métodos para obtener una determinación más robusta. Por ejemplo, la combinación del índice ARN/ADN y el peso seco, en la primera alimentación nos permiten definir con mayor precisión que el grupo de larvas sin alimento se encontraron en inanición desde el día 3dde, debido a una condición nutricional pobre.

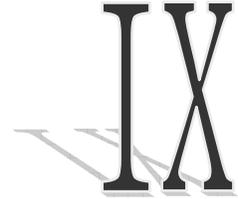
En la estrategia del destete, la combinación del índice ARN/ADN con la altura de los enterocitos y el área nuclear de los hepatocitos, fortalece la idea de una condición nutricional deficiente desde el día 21dde en las larvas alimentadas con la DMP y descarta la posibilidad de recuperación, determinado por el análisis cualitativo de los enterocitos y hepatocitos. Los resultados obtenidos de dicha combinación, nos confirman que las larvas presentaron signos de malnutrición debido a una baja actividad metabólica celular, producto de la baja digestión y absorción de los nutrientes de la DMP, lo cual se manifestó por la talla significativamente menor ( $P < 0.05$ ) obtenida desde el día 21dde.

Tabla 4. Clasificación de la condición nutricional de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, durante dos etapas del cultivo larvario.

<b>Análisis</b>	<b>Tiempo de respuesta</b>	<b>Condición nutricional</b>	<b>Clasificación</b>
<b>Previo a la primera alimentación</b>			
Bioquímica ARN/ADN	DDE 2	Calidad de larva	
<b>Primera alimentación</b>			
Morfometría			
Peso seco	3	Pobre	Inanición
AM	3	Pobre	*
AC, AM, LC, LCA, LN, LPM	4	Pobre	Moribundas
Histología			
Cualitativo	3	Intermedia	Recuperables
Cuantitativo	4	Pobre	Inanición
Bioquímica ARN/AND y PT	3	Pobre	Inanición
<b>Destete</b>			
Morfometría			
Peso seco	21	Deficiente	Malnutridas
AM, LCA, LN, LT	27	Deficiente	Malnutridas
TCE y TCA	33	Deficiente	Malnutridas
Histología			
Cualitativo	21	Intermedia	Malnutrición prematura
Cuantitativo	21	Deficiente	Malnutridas
Bioquímica ARN/ADN, PT	21	Deficiente	Malnutridas

DDE: días después de la eclosión. AC: Altura de la cabeza, AM: Altura del músculo, LC: Longitud cefálica, LCA: Longitud cefalo-ano, LN: Longitud notocordal, LPM: Longitud premaxilar. PT: Proteínas totales. TCE: Tasa de crecimiento específico, TCA: Tasa de crecimiento absoluto. \*De acuerdo con Theilacker (1978) y Powell y Chester (1985) se consideran al menos 4 variables morfométricas para clasificar a las larvas en inanición.

## CONCLUSIONES



El índice ARN/ADN y el peso seco fueron los indicadores más sensibles, al detectar el estado de inanición debido a una pobre condición nutricional en las larvas de cabrilla arenera sin alimento desde el día 3dde. El tiempo de respuesta fue menor con respecto a la morfometría e histología.

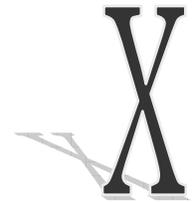
El índice ARN/ADN no solo permitió detectar estados de inanición, sino que podría emplearse para evaluar la calidad de las larvas al comenzar una corrida larvaria, previo a la primera alimentación, ya que desde el día 2dde se detectó una condición nutricional intermedia.

En la estrategia de destete, el análisis morfométrico fue el más tardado en detectar alteraciones en la condición nutricional. El peso seco, la altura de los enterocitos, el área nuclear de los hepatocitos, el índice ARN/ADN y las proteínas totales fueron los más sensibles, puesto que se encontraron deficiencias nutricionales tempranas, evidenciándose una deficiente condición nutricional desde el día 21dde en las larvas alimentadas con la DMP. No obstante, un muestreo más temprano posiblemente hubiera permitido separar estos indicadores.

Por la simplicidad del método para cuantificar los ácidos nucleicos, la objetividad y el tiempo de respuesta del índice ARN/ADN, se postula como uno de los mejores indicadores para detectar la condición nutricional de las larvas de

cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*, puesto que nos permitirá evaluar con precisión el efecto del alimento (vivo y dietas experimentales) y tomar decisiones respecto al alimento suministrado, antes de que los efectos producidos por este alcancen un nivel de organización mayor, por ejemplo el morfométrico. Sin embargo, para obtener una determinación más robusta de la condición nutricional puede combinarse con otros indicadores, por ejemplo, el peso seco.

## RECOMENDACIONES



Con base en los resultados obtenidos con el índice ARN/ADN, se recomienda aplicar otras técnicas de extracción y cuantificación de ácidos nucleicos, las cuales requieran de bajas cantidades de muestra y permitan observar la variabilidad entre individuos de edad y talla similar (Clemmesen, 1993; Berdalet, 2002).

Teniendo en cuenta esto, se recomienda realizar bioensayos con los eleuteroembriones y con las larvas antes de la primera alimentación, para determinar la calidad de las mismas. Dado la sensibilidad y el tiempo de respuesta del índice ARN/ADN, se propone evaluar diferentes situaciones de alimentación, por ejemplo, distintas densidades de alimento.

Determinar el tiempo de recuperación de las larvas tras aplicar periodos de inanición y realimentación durante las dos etapas críticas del cultivo larvario, para observar las deficiencias del aporte restringido de alimento y la heterogeneidad en el consumo del alimento entre larvas.

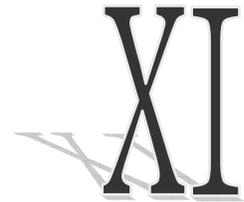
Realizar un monitoreo más intenso durante las etapas importantes del cultivo, antes y después de ofrecer el alimento para determinar si existen variaciones en el índice ARN/ADN a diferentes horas del día. Determinar el tiempo necesario del periodo de coalimentación con base al comportamiento del índice ARN/ADN.

Al combinar diferentes herramientas, se recomienda emplear la técnica de inclusión en resina para obtener las muestras histológicas, dado lo sensible de los tejidos de las larvas en inanición a la manipulación.

Aplicar nuevas técnicas morfométricas a fin de obtener un análisis más robusto, por el ejemplo el TrussNetwork (Marco reticular) y/o la geometría trazadora, ya que estos métodos, disminuyen el error en las mediciones de los caracteres morfométricos clásicos (posiciones extremas definidas en términos de distancias máximas o mínimas) mediante un conjunto de marcas y medidas del cuerpo que son homólogas de forma a forma, lo que permite caracterizar y predecir una tendencia de crecimiento y estandarizar formas para la comparación individual (Strauss y Bookstein, 1999).

Se recomienda el uso del índice ARN/ADN para evaluar la condición nutricional en distintos taxa (Ota y Landry, 1984; Kemp *et al.*, 1993; Wo *et al.*, 1999; Koueta *et al.*, 2000; Mayrand *et al.*, 2000; John *et al.*, 2001; Parslow *et al.*, 2001) y para futuros estudios de campo, previa calibración en laboratorio, a fin de observar la relación entre la condición nutricional, la supervivencia y el ambiente (García *et al.*, 1998; Chícharo, 1999; Pepin *et al.*, 1999; Chui y Huang, 1999; Bergeron, 2000; Ramírez *et al.*, 2004; Sykes *et al.*, 2004).

## LITERATURA CITADA



- Álvarez-González, C. A. 2003. Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei:Serranidae). *Tesis de Maestría*. CICIMAR-IPN, México. 164 pp.
- Álvarez-González, C. A., Ortíz-Galindo, J. L., Dumas, S., Martínez-Díaz, S. F., Hernández-Ceballos, D. E., Grayeb, T., Moreno-Legorreta, M., Peña-Martínez, R. y R. Civera-Cerecedo. 2001a. Effect of stocking density on the growth and survival sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae in a closed recirculating system. *J. World Aquaculture Soc.* 32: 130-137.
- Anguas-Vélez, B. H., Civera-Cerecedo, R., Contreras-Olguín, M., Rueda-Jasso, R. A. y J. Guillaume. 2000. Preliminary study on the timing of weaning of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) larvae with a prepared diet: effects on growth and survival. *Journal of Applied Aquaculture.* 10: 1-15.
- Aragao, C., Conceicao, L., Dinis, M.T. y H. J. Fyhn. 2004. Amino acid pools of rotifers and *Artemia* under different conditions: nutritional implications for fish larvae. *Aquaculture.* 234: 429-445.
- Avilés-Quevedo, A., McGregor-Pardo, U., Rodríguez-Ramos, R., Morales-Castro, O., Huerta-Bello, M. A., y M. Iizawa. 1995. Biología y cultivo de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner,1868). Secretaría de Pesca. *Instituto Nacional de la Pesca. JICA.* México, 85 pp.

- Avilés-Quevedo, A., Rodríguez-Ramos, R. y L. Méndez-López. 2002. Evaluación de *Brachionus plicatilis* cultivado con cinco dietas de fitoplancton y levadura, en el crecimiento y mortalidad de larvas de *Paralabrax maculatofasciatus*. *Acta Cient. CRIP-La Paz, B.C.S, México*. 1: 11-17.
- Balon, E. 1984. Reflections on some digestive events in the early life of fishes. *Trans. Am. Fish. Soc.* 113: 178-185.
- Ben-Khemis, I., De la Noüe, J., y C. Audet. 2000. feeding larvae of winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum) with live prey or microencapsulated diet: linear growth and protein, RNA and DNA content. *Aquaculture Research* 31: 377-386.
- Berdalet, E. 2002. Quantization of nucleic acids in marine microplankton samples. *In: Pelagic Ecology Methodology*. Subba Rao DV (ed). AA Balkema Pub., Lisse, Abingdon, Exton (PA), Tokyo. 271-289pp.
- Bergeron, J. P. 1997. Nucleic acids in ichthyoplankton ecology: a review, with emphasis on recent advances for new perspectives *J. Fish. Biol.* 51: 284-302.
- Bergeron, J. P. 2000. Effect of strong winds on the nutritional condition of anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) larvae in the Bay of Biscay, northeast Atlantic, as inferred from an early filed application of the DNA/C index. *ICES Journal of Marine Sci.* 57: 249-255.
- Bernabé, G. 1998. Aquaculture: biology and ecology of culture species. *Ellis Horwood*, UK. 403 pp.
- Bernabé, G. y A. Guissi. 1994. Adaptation of the feeding behavior of larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* to an alternating live-food/compound-food regime. *Aqua. Fish. Man.* 25: 537-546.
- Blaxter, J. H. S. 1971. Feeding and condition of Clyde herring larvae. *Rapp. P. réun. Cons. perm. Explr. Mer.* 160: 128-136.
- Blaxter, J. H. S. 1988. Pattern and variety in development. *In: Fish Physiology*, vol XI, Part A. Hoar, W.S. and Randall, D.J. (eds.). *Academic Press*, San Diego, 1-58pp.

- Blaxter, J. H. S. y G. Hempel. 1963. The influence of egg size on herring larvae (*Clupea harengus* L.). *J. Cons. Int. Explro. Mer.* 28: 211-240.
- Bookstein, F. L., Chernoff, B., Elder, R., Humphries, J., Smith, G. y R. Strauss. 1985. Morphometrics in evolutionary biology. *Spec. Publs. Acad. Nat. Sci. Philad.* 277 p.
- Buckley, L., Caldarone, E. y T. Ong. 1999. RNA-DNA ratio and other nucleic acid based indicators for growth and condition of marine fishes. *Hydrobiology.* 401: 265-277.
- Buckley, L. 1979. Relationship between RNA-DNA ratio, prey density, and growth rate in Atlantic cod *Gadus morhua*. *J. Fish. Res. B. Can.* 36: 1497-1502.
- Buckley, L. 1984. RNA/DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. *Mar Biol.* 80: 291-298.
- Buckley, L. y F. Bulow. 1987. Techniques for estimation of RNA, DNA and protein in fish. *In: Summfelt, R. and E. Gordon (Eds). The age and growth of fish. USA. The Iowa State University Press, Ames. USA.* 345-354.
- Buckley, L., Smigielski, A. S., Halavik, T. y C. Laurence. 1990. Effect of water temperature on size and biochemical composition of winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* at hatching and feeding initiation. *Fishery bulletin.* 88: 419-428.
- Bulow, F. 1987. RNA-DA ratios as indicators of growth in fish: a review. *In: Summfelt, R. and E. Gordon (Eds). The age and growth of fish. USA. The Iowa State University Press, Ames. USA.* 45-63.
- Caballero, M., Izquierdo, M., Kjørsvik, E., Montero, D., Socorro, A., Fernández, A. y G. Rosenlund. 2003. Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture.* 225: 325-340
- Caballero, M., López-Calero, G., Socorro, J., Roo, F., Izquierdo, M. y A. Fernández. 1999. Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture.* 179: 277-290

- Cahu, C. y J. L. Zambonino-infante. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture*. 200: 161-180.
- Cahu, C., Zambonino-infante, J. L., Quazuguel, P. y M. Le Gall. 1999. Protein hydrolizate vs fish meal in compounds diets for 10 days old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture*. 171: 209-119.
- Canino, M., Bailey, K., y L. Incze. 1991. Temporal and geographical differences in feeding and nutritional condition of walleye pollock larvae *Theragra chalcogramma* in Shelikof Strait, Gulf of Alaska. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 79: 27-35.
- Carrasco, V. 2004. Variación de ácidos grasos durante la ontogenia inicial y requerimientos lipídicos de juveniles en cautiverio, de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. *Tesis de Maestría*, CICIMAR-IPN, México. 76 pp.
- Catalán, I. 2003. Condition indices and their relationship with environmental factors in fish larvae. *Tesis doctoral*. U de Barcelona. España. 270 pp.
- Chícharo, M. A. 1999. Nutritional condition and starvation in *Sardina pilchardus* (L.) larvae off southern Portugal compared with some environmental factors. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 225: 123–137.
- Chícharo, M.A., Chícharo, L., Valdés, L., López-Jamar, E. y P. Ré. 1998. Does nutritional condition limit survival potential of sardine *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) larvae off the north coast of Spain? RNA/DNA ratios and their variability. *Fish Res.* 39: 43-54.
- Chu, E. y S. Ozkizilcik. 1999. Acceptability of complex microencapsulated diets by striped bass (*Morone saxatilis*) larvae. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 237: 1-9.
- Chui, T. S. y J. Huang. 1999. An observation on the RNA/DNA Ratio of individual japanese anchovy larva from four hydrographic regions in the northeastern waters of Taiwan. *Proc. Natl. Sci. Counc. ROC (B)*. 23 (2):69-73.
- Clemmesen, C. 1987. Laboratory studies on RNA-DNA ratios of starved and fed herring *Clupea harengus* and turbot *Scophthalmus maximus* larvae. *J. Cons. In t. Exp Mer.* 43: 122-128.

- Clemmesen, C. 1993. Improvements in the fluorometric determination of the RNA and DNA content in individual marine fish larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 100: 177-183.
- Clemmesen, C. 1994. The effect of food availability, age or size on the RNA/DNA ratio of individually measured herring larvae: laboratory calibration. *Mar. Biol.* 118: 377-382.
- Clemmesen, C. 1996. Importance and limits of RNA/DNA ratios as a measure of nutritional condition in fish larvae. *In: Watanabe Y, Yamashita Y, Ooseki Y (eds). Survival Strategies in Early Life Stages of Marine Resources. A.A. Balkema, Rotterdam.* 67-82.
- Clemmesen, C., Sánchez, R. y C. Wongtschowski. 1996. A regional comparison of SW Atlantic anchovy larvae, *Engraulis anchoita*, based on RNA/DNA ratios. *Arch. Fish. Mar. Res.* 45(1): 17-43.
- Conceicao, L., Grasdalen, H. e I. Rønnestad. 2003. Amino acid requirements of fish larvae and post-larvae: new tools and recent findings. *Aquaculture.* 227: 221-232.
- Contreras-Olguín, M., Rueda-Jasso, R., Matus-Nivón, E., Ortiz-Galindo, J. L., Dumas, S. y M. Osorio-Galindo. 1997. Crianza de larvas y juveniles de cabrilla arenera, *Paralabrax maculatofasciatus*. Abstracts del V Congreso Nacional de Ictiología. Febrero, 1997. *Facultad de Ciencias del Mar.* UAS, Mazatlán, Sin., México.
- Cunha, I., Saborido-Rey, F. y M. Planas. 2003. Use of multivariate analysis to assess the nutritional condition of fish larvae from nucleid acid and protein content. *Biol. Bull.* 204: 339-349.
- Dabrowski, K. 1984. The feeding of fish larvae: present "state of the art" and perspectives. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 24: 807-833.
- Dabrowski, K. y M. Rusiecki. 1983. Content of total and free amino acids in zooplanktonic food of fish larvae. *Aquaculture.* 30, 31-42.

- Dabrowski, K. y S. Kaushik. 1984. Rearing of coregonid (*Coregonus schinzi palea*) larvae using dry and live food. II Oxygen consumption and nitrogen excretion. *Aquaculture*. 42: 333-344.
- Dabrowski, K., Murai, T. y T. Becker. 1986. Physiological and nutritional aspects of intensive feeding of carp. 55-70. *In*: R. Billard y J. Marcel (eds). *Aquaculture of Cyprinids*. U.S.A.
- Diccionario esencial de las ciencias. 2001. EPESA, España. 1002 pp.
- Ecker, E., Randall, D., Burggren, W. y K. French. 1998. Fisiología animal: mecanismos y adaptaciones. *McGraw Hill*, México. 795pp.
- Ehrlich, K. F., Blaxter, J. y R. Pemberton. 1976. Morphological and histological changes during the growth and starvation of herring and plaice larvae. *Mar Biol* 35:105-118.
- Ehrlich, K.F. 1974. Chemical changes during growth and starvation of herring larvae. *In*: Blaxter, J.H. (Eds). The early life history of fish. *Springer-Verlag*, Berlin. 301-323.
- Elliott, J. K. y W. C. Leggett. 1997. Larval condition and vulnerability to predation: an analysis based on mixed-prey experiments. *J. Fish. Aquat. Sci.* 55:626-630.
- Ferron, A. y W. C. Leggett. 1994. An appraisal of condition measures for marine fish larvae. *Adv Mar Biol.* 30: 217-303.
- Fuiman, L.A., Poling, K.R. y U. M. Higgs. 1998. Quantifying developmental progress for comparative studies of larval fishes. *Copeia*. 3: 602-611.
- Fyhn, H. J. y B. Serigstad. 1987. Free amino acids as energy substrate in developing eggs and larvae of the cod *Gadus morhua*. *Marine Biology*. 96: 335-341.
- Fyhn, H. J., Ronnestad, I. y L. Berg. 1995. Variation in free and proteinic amino acids of marine copepods during the spring bloom. *In*: Lavens, P., Jaspers, E. and Roelants, I. (Eds), Larvi'95. Fish & Shellfish larviculture symposium. Belgium. 321-324.

- Fyhn, H. J., Finn, R. N., Helland, S., Ronnestad, I. y E. Lomsland. 1993. Nutritional value of phyto and zooplankton as livefood for marine fish larvae. *In: Reinertsen, H., Dahle, L.A., Jørgensen, L. and K. Tvinnerheim. (Eds), Fish Farming Technology, Balkema, Rotterdam. 121-126.*
- Fyhn, H.J. 1989. First feeding of marine fish larvae: are free amino acids the source of energy? *Aquaculture. 80: 111-120.*
- García, A., Cortés, D. y T. Ramírez. Daily larval growth and RNA and DNA content of the NW Mediterranean anchovy *Engraulis encrasicolus* and their relations to the environment. *Mar. Ecol. Prog. Ser. 166: 237-245.*
- García-Ortega, A. 2000. Valor nutricional de los quistes de *Artemia* y su uso como fuente de proteína en dietas artificiales para larvas de peces. *In: Cruz - Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A. y R. Civera-Cerecedo (Eds). Avances en nutrición acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mérida, Yucatán.*
- García-Ortega A., Huisman, E., Zorruelos, P. y J. Verreth. 2001. Evaluation of protein quality in microbound starter diets made with decapsulated cysts of *Artemia* and fishmeal for fish larvae. *Journal of the world aquaculture society. 32(3):317-329.*
- García-Ortega A., Koussoulaki, A., Boer, H. y J. Verreth. 2000b. *In vitro* protein digestibility of *Artemia* decapsulated cysts and nauplii, and or microbound diets for larval fish. *Aquaculture research. 31: 475-477.*
- García-Ortega A., Verreth, J., Coutteau, P., Segner, E., Huisman, E. y P. Zorruelos. 1998. Biochemical and enzymatic characterization cysts and nauplii of the brine shrimp *Artemia* at different developmental stages. *Aquaculture. 161: 501-514.*
- Glencross, B., Evans, D., Hawkins, W. y B. Jones. 2004. Evaluation of dietary inclusion of yellow lupin (*Lupinus luteus*) kernel meal on the growth, feed utilisation and tissue histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture. 235: 411-422.*

- Gonzalez, G., Crespo, S. y J. Brusle. 1993. Histo-cytological studi of the liver of the cabrilla sea bass, *Serranus cabrilla* (Teleostei, Serranidae) and available model for marine fish experimental studies. *Journal of fish biology*. 43: 363-373.
- Govoni, J. J. 1980. Morphological, histological and functional aspects of alimentary canal and associated organ development in larval (*Leiostomus xanthurus*). *Rev. Can. Biol.* 39: 69-80.
- Govoni, J. J., Boehlert, G. y Y. Watanabe. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. *Env. Biol. Fish.* 16: 59-77.
- Grayeb, T. 2001. Efecto de la densidad en el crecimiento de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae) cultivada en jaulas flotantes. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN, México. 110 pp.
- Guak, W., Tsusaki, T. y M. Tanaka. 2003. Nutrirional condition, as evaluated by RNA/DNA ratios, of hatchery-reared Japanese flounder from hatch to release. *Aquaculture*. 219: 503-514.
- Guyot, E., J.P. Díaz y R. Connes. 1995. Organogenesis of the liver in sea bream. *J. Fish Biol.* 47 : 427-437.
- Hall, K. C. y D. R. Bellwood. 1995. Histological effects of cyanide, stress and starvation on the intestinal mucosa of *Pomacentrus coelestis*, a marine aquarium fish species. *Journal of fish biology*. 47: 438-454.
- Hepher, B. 1993. Nutrición de Peces Comerciales en Estanque. *Limusa*, México. 406pp.
- Holt, J. G. 1993. Feeding larval red drum on microparticulate diets in a closed recirculating water system. *Journal of the world aquaculture society*. 24: 225-230.
- Houlihan, D. F., Pedersen, B., Steffensen, J. y F. Brechin. 1995. Protein synthesis, growth and energetics in larval herring (*Clupea harengus*) at different feeding regimes. *Fish. Phys. Biochem.* 14: 195-208.

- Hovenkamp, F. 1990. Growth differences in larval plaice *Pleuronectes platessa* in the southern bight of the North Sea as indicated by otolith increments and RNA/DNA ratios. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 58: 205-215.
- Hovenkamp, F. 1992. Growth-dependent mortality of larval plaice *Pleuronectes platessa* in the North Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 82: 95-101.
- Hunter, J. R. 1981. Feeding ecology and predation of marine larvae. In: Lasker, R. (ed) *Marine fish larvae: morphology, ecology and relation to fisheries*, University of Washington Press, USA. 34-77.
- John, M., Clemmesen, C., Lund, T. y T. Köster. 2001. Diatom production in the marine environment: implications for larval fish growth and condition. *ICES Journal of Marine Science.* 58: 1106–1113.
- Kanazawa, A., Koshio, S. y S. Teshima. 1989. Growth and survival of larvae red sea bream *Pagrus major* and Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed microbound diets. *Journal of the world aquaculture.* 20: 31-37.
- Klug, W. y M. Cummings. 1999. *Conceptos de genética.* Prentice Hall, España. 816pp.
- Kolkovski, S. y A. Tandler. 2000. The use of the squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata*. *Aquacult. Nutr.* 6: 11-15.
- Koueta, N., Castro, B. y E. Boucaud-Camou. 2000. Biochemical indices for instantaneous growth estimation in young cephalopod *Sepia officinalis* L. *ICES Journal of Marine Science,* 57: 1–7.
- Lazo, J. P. 2000. Conocimiento actual y nuevas perspectivas en el desarrollo de dietas para larvas de peces marinos. In: Cruz-Suarez, L., Ricque, D., Tapia, M., Olvera, M., y R. Civera. (Eds). *Avances en nutrición acuícola V. Memorias del simposium internacional de nutrición acuícola.* Noviembre, 2000. Yucatán, México. 300-312.
- Lehninger, A. 1998. *Bioquímica: las bases moleculares de la estructura y función celular.* Omega, España. 1156pp.

- Love, R. M. 1980. The chemical biology of fishes, Vol.2. Advances 1968-1977. *Academic press*, New York. 650pp.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Lewis-Farr, A. y R. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*. 193: 265–275.
- Lubzens, E. 1987. Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia*.147:245-255.
- Martin, F. D. y D. A. Wright. 1987. Nutritional state analysis and its use in predicting striped bass recruitment: laboratory calibration. *Am Fish Soc Symp* 2: 109-114.
- Martínez-Díaz, S. F. 1995. Estudio de una enfermedad hemorrágica ulcerativa en un lote de reproductores de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868): Osteichthyes; Serranidae. *Tesis de Maestría*. CICIMAR-IPN, México. 94 pp.
- Martínez-Díaz, S. F., Martínez-Pecero, R., Rosales-Velázquez, M. O., Alvarado-Castillo, R., Pérez-España, H., y J. Tucker. 2001. Voluntary spawning, early development, and completion of the cycle of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* in the laboratory. *J. World Aquaculture Soc.*, 32, 122-129.
- Matus-Nivón, E., Ramírez-Sevilla, R., Martínez-Pecero, R. y J. L. Ortiz-Galindo. 1990. Potencial acuacultural de ocho especies de peces marinos del Pacífico mexicano, con base en su biología temprana, *In*: G. De la Lanza-Espino y J.L. Arredondo-Figueroa (eds). La acuicultura en México: De los conceptos a la producción. *Instituto de Biología. UNAM*. México. pp. 67-74.
- May, R. C. 1971. Effects of delayed initial feeding on larvae of the grunion, *Leuresthes tenuis* (Ayres). *US Nat Mar Fish Ser Fish Bull*. 69:411-425.
- Mayrand, E., Guderlet, H. y J. D. Dutil. 2000. Biochemical indicators of the muscle growth in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*. 255: 37-49.

- McFadzen, I. R., Coombs, S. y N. Halliday. 1997. Histological indices of the nutritional condition of sardine *Sardina pilchardus* (Walbaum) larvae off the north coast of Spain. *J. Exp. Mar Biol. Ecol.* 212: 239- 258.
- McFadzen, I. R., Lowe, D. M. y S. Coombs. 1994. Histological changes in starved turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) quantified by digital image analysis. *J. Fish. Biol.* 44:255-262.
- McGurk, M. D. 1985. Multivariate analysis of morphometry and dry weight of Pacific herring larvae. *Marine Biology.* 86: 1-11
- McNamara, P. y L. J. Buckley. 1994. Identification and characterization of metallothionein cDNA from mRNA transcripts induced by starvation in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3(5): 252-260.
- McNamara, P., Caldarone, E. y L. J. Buckley. 1999. RNA/DNA ratio and expression of 18S ribosomal RNA, actin and myosin heavy chain messenger RNAs in starved and fed larval Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Marine Biology.* 135: 123-132.
- Mercier, L., Audet, C., De la Nouë, J., Parent, B., Parrish, C. y N. W. Ross. 2004. First feeding of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) larvae: use of *Brachionus plicatilis* acclimated at low temperature as live prey. *Aquaculture* 229: 361–376.
- Mittelbach, G., Osenberg., C. y P. Wainwright. 1999. Variation in feeding morphology between pumpkinseed populations: Phenotypic plasticity or evolution?. *Evolutionary Ecology Research.* 1: 111–128.
- Morioka, S., Ohno, A., Kohno, H. y Y. Taki. 1996. Nutritional condition of larval milkfish, *Chanos chanos*, occurring in the surf zone. *Ichthyological research.* 43: 367-373.
- Munro, H. y A. Fleck. 1966. The determination of nucleic acids: the Schmidt-Thannhauser procedure. pp 113-176. *In: Glick, D. (Ed). Methods of biochemical analysis.* Vol. 14. Interscience Pub, USA.
- Murphy, B., Willis, D. y T. A. Springer. 1991. The relative weight index in fish management: Status and needs. *Fisheries.* 16(2), 30-39.

- Nakai, Z., Kosaka, M., Ogura, M., Hayashida, C. y S. Shimozono. 1969. Feeding habit and depth of body and diameter of digestive tract of shirasu, in relation with nutritious condition. *J. Coll. Mar. Sci. Technol. Tokai*. 3: 22-34.
- Nelson, K., Hutchinson, L., Gang, F.L., Sly, D., y D. Hedgecock. 1994. Variation in life history and morphology in northern anchovies *Engraulis mordax*. *CalCOFI Reports*. 35: 108-120
- O'Connell, C. P. 1976. Histological criteria for diagnosing the starving condition in early post yolk sac larvae of the northern anchovy, *Engraulis mordax* Girard. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 25: 285-312.
- Ota, A. y M. Landry. 1984. Nucleic acids as growth rate indicators for early developmental stages of *Calanus pacificus* Brodsky. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 80: 147-160.
- Parslow, P. J., Alkinson, R. y A. Taylor. 2001. Nucleid acids as indicators of nutritional condition in the Norway lobster *Nephrops norvegicus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 211: 235-243.
- Pedersen, B. H. 1997. The cost of growth in young fish larvae, a review of new hypotheses. *Aquaculture*. 155: 259-269.
- Peña, R. y S. Dumas,. 2005. Effect of delayed first feeding on development and feeding ability of *Paralabrax maculatofasciatus* larva. *Journal of Fish Biology*. 66: 1-12.
- Peña, R., Dumas, S., Saldivar-Lucio, R., García, G., Trasvina, A. y D. Hernández-Ceballos. 2004. The effecto of Light intensity on first feeding of the spotted san bass *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner) larvae. *Aquaculture research*. 35: 345-349.
- Peña, R., Dumas, S., Trasviña, A. y H. S. Pliego. 2005. The effect of rearing tank colour and prey density on first feeding of the spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner) larvae. *Aquaculture research*. In press.
- Peña, R., Dumas, S., Villalejo-Fuerte, M. y J. L. Ortiz-Galindo. 2003. Ontogenetic development of digestive tract in reared spotted san bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture*. 219: 633-644.

- Pepin, P., Evans, G. y T. Shears. 1999. Patterns of RNA/DNA ratios in larval fish and their relationship to survival in the field. *ICES Journal of Marine Science*, 56: 697–706.
- Pliego, H. S. y J. P. Álcantar. 2002. Inducción al desove en la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoide:Serranidae) mediante el analogo del factor de liberación de la hormona luteinizante (LHRHa). *Tesis de Licenciatura*. UABCS, México. 70 pp.
- Pope, K. y C. Kruse. 2001. Analysis of fish condition data. *Journal of wildlife management*. 61: 459-465.
- Porter, S.M. y G. Theilacker. 1999. The development of the digestive tract and eye in larval walleye pollock, *Theragra chalcogramma*. *Fish. Bull.* 97: 722-729.
- Powell, A. B. y A. J. Chester. 1985. Morphometric indices of nutritional condition and sensitivity to starvation of Spot larvae. *Trans. Am. Fish. Soc.* 114:338-347.
- Raae, A., Opstad, I. Kvenseth, P. y B. Walther. 1988. RNA, DNA, and protein during early development in feeding and starved cod (*Gadus morhua*) larvae. *Aquaculture*. 73: 247-259.
- Ramírez, T., Cortés, D., García, A. y A. Carpena. 2004. Seasonal variations of RNA/DNA ratios and growth rates of the Alboran Sea sardine larvae (*Sardina pilchardus*). *Fisheries Research*. 68: 57–65
- Richard, P., Bergeron, J., Boulhic, M., Galois, R. y J. Person. 1991. Effect of starvation on RNA, DNA and protein content of laboratory-reared larvae and juveniles of *Solea solea*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 27: 69-77.
- Robaina, L., Izquierdo, M., Moyano, F. J., Socorro, J., Vergara, J. y D. Montero. 1998. Increase of the dietary n3/n6 fatty acid ratio and addition of phosphorus improves liver histological alterations induced by feeding diets containing soybean meal to gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture*. 262: 281-293.
- Roldan-Libenson, G., Molina-Camacho, E., Cáceres-Martínez, C. y R. Civera-Cerecedo. 1999. Uso del aceite de langostilla como enriquecedor de

- rotíferos. Efectos sobre el crecimiento y la sobrevivencia de larvas de cabrilla (*Paralabrax maculatofasciatus*). *Hidrobiológica* 9, 77-82.
- Rønnestad, I., Throsen, A. y N. Finn. 1999. Fish larvae nutrition: a review of recent advances in the roles of amino acids. *Aquaculture*. 177: 201-216.
- Rooker, J. K y G. J. Holt. 1996. Application of RNA:DNA ratios to evaluate the condition and growth of larval and juvenile Red Drum (*Sciaenops ocellatus*). *Mar. Freshwater Res.* 1996, 47:283-290.
- Rosales-Velázquez, M. O. 1997. Efecto de la alimentación sobre los desoves de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Teleostei: Serranidae) mantenida en cautiverio. *Tesis de Maestría*. CICIMAR-IPN, México. 62 pp.
- Rosenlund, G., Stoss, J. y C. Talbot,. 1997. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. *Aquaculture* 155 : 183-191.
- Santamaría, C., Marín, M., Traveset, R., Sala, R., Grau, A., Pastor, E., Sarasquete, C. y S. Crespo. 2004. Larval organogenesis in common dentex *Dentex dentex* L. (Sparidae): histological and histochemical aspects. *Aquaculture*. 237: 207-228.
- Sarasquete, M.C., Polo, A. y M. Yúfera. 1995. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquaculture*. 130 : 79-92.
- Sargent, J.R., Tocher, D. y J. G. Bell. 2003. The lipids, pp. 181-257. *In*: J. Halver (ed.). *Fish Nutrition*. Academic Press, New York, U.S.A..
- Segner, H. R. y J. Rösch. 1990. Development of dry diets for larval *Coregonus lavaretus*. II. Liver histology. *Aquaculture*. 91: 117-130.
- Segner, H. R. y J. Rösch. 1998. Ontogeny of digestive and metabolic functions in *Coregonus lavaretus*. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Advanc. Limnol.* 50: 1-14.
- Segner, H., Rösch, J., Schmidt, H. y K. Von Poeppinghausen, K. J. 1988. Studies on the suitability of commercial dry diets for rearing of larval *Coregonus lavaretus* from Lake Constance. *Aquat. Living Resour.* 1 : 231-238.

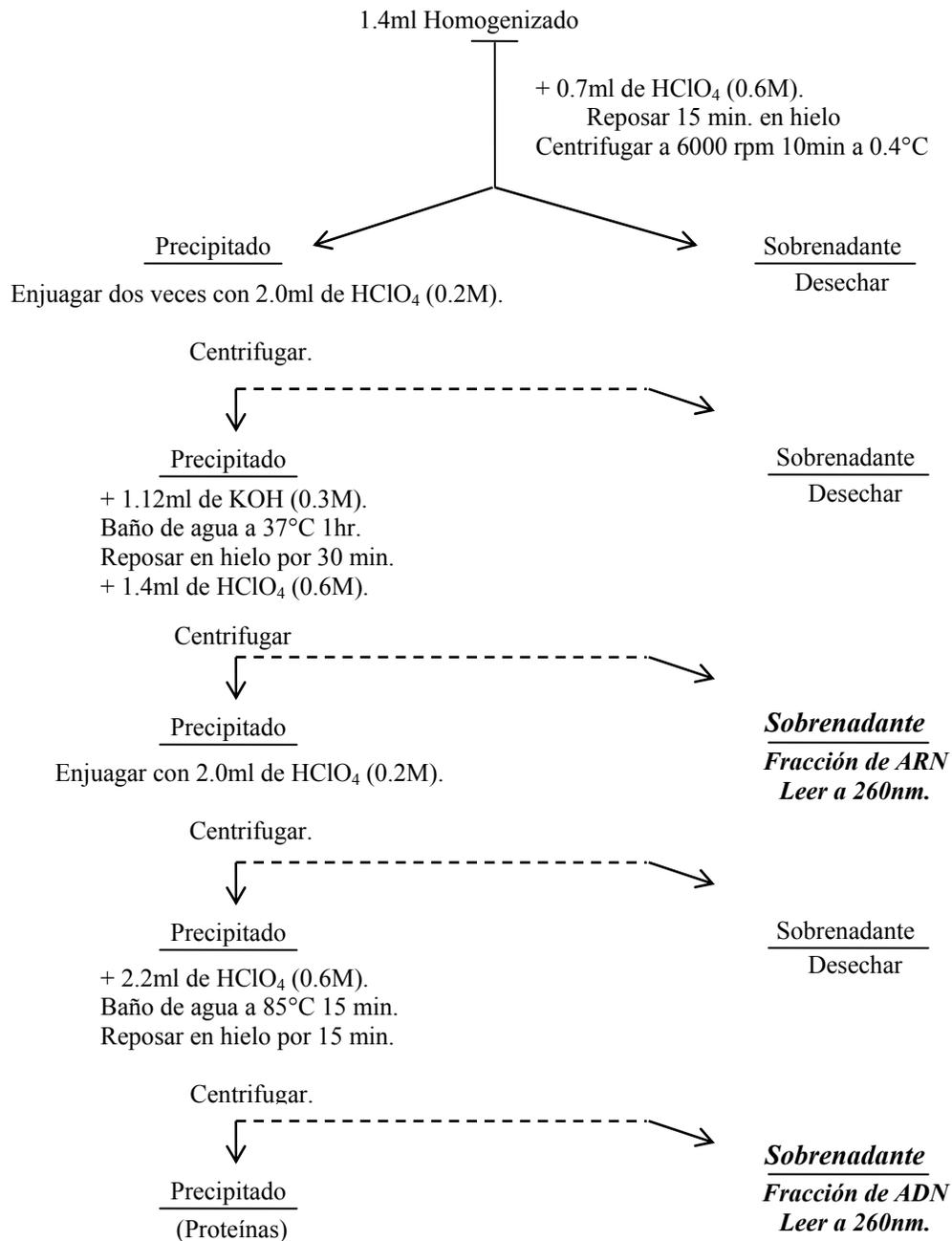
- Segner, H., R. Rösh, J. Verreth y U. Witt. 1993. Larval nutritional physiology: studies with *Clarias gariepinus*, *Coregonus lavaretus* and *Scophthalmus maximus*. *J. World Aquacult. Soc.* 24 : 121-134.
- Segner, H. R., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W. y W. Hanke. 1994. The developmental of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Marine Biology*. 119: 471-486.
- Segner, H. R. y U. Witt. 1990. Weaning experiments with turbot, *Scophthalmus maximus*, electron microscopic study of liver. *Marine Biology*. 105: 352-361.
- SEPESCA-UABCS. 1994. Desarrollo científico y tecnológico del cultivo de la cabrilla. *SEPESCA/UABCS*. México. 93 pp.
- Shelbourne, J. E. 1957. The feeding and condition of plaice larvae in good and bad plankton patches. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 36: 539-552.
- Sorgeloos, P. 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*. 200: 147-159.
- Steinhart, M. y R. Eckmann. 1992. Evaluating the nutrition of individual whitefish (*Coregonus* spp.) larvae by the RNA/DNA ratio. *J. Fish Biol.* 40-791-799.
- Storch, V. y V. Juario. 1983. The effect of starvation and subsequent feeding on the hepatocytes of *Chanos chanos* (Forsskal) fingerlings and fry. *J. fish Biol.* 23: 95-103.
- Strauss, R. E. 1984. Allometry and functional feeding morphology in Haplochromine Cichlids. p. 217-219. *En: Echelle A. A. y I. Kornfield (eds). 1984. Evolution of Fish Species Flocks*. Univ. of Maine at Orond Press, Orond. 257 p.
- Strauss, R.E. y F. Bookstein. 1999. The truss: body form reconstructions in morphometrics. *Systematic Zoology*. 3(2): 113-135.
- Strickland, J. D. H. y T. R. Parsons.,1972. A practical handbook of seawater analysis. *Fisheries Research Board of Canada*. Ottawa. 309 pp.
- Strüssmann, C. A. y F. Takashima. 1990. Hepatocyte nuclear size and nutritional condition of larval pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Cuvier et Valenciennes). *J. Fish Biol.* 36: 59-65.

- Suthers, I. M. 1998. Bigger? Fatter? Or is faster growth better? Considerations on condition in larval and juvenile coral-reef fish. *Aust. J. Ecol.* 23: 265-273.
- Suthers, I. M., Cleary, J., Battaglione, S. C. y R. Evans. 1996. Relative RNA Contents as a measure of condition in larval and juvenile fish. *Mar. Freshwater Res.* 47: 301-307.
- Sveier, H., Raae, A. J. y E. Lied. 2000. Growth and protein turnover in Atlantic salmon (*Salmo salar* L); the effect of dietary protein level and protein particle size. *Aquaculture.* 185: 101–120.
- Sykes, A., Domingues, P. y J. Andrade. 2004. Nucleic acid derived or instantaneous growth rate as tool to determine different nutritional condition in cuttlefish hatchlings. *J. Shellfisheries Research.* 118: 1-15.
- Theilacker, G. 1978. Effect of starvation on the histological and morphological characteristics of jack mackerel, (*Trachurus symmetricus*), larvae. *Fish Bull.* 76: 403-414.
- Theilacker, G. 1986. Starvation-induced mortality of young sea-caught jack mackerel, *Trachurus symmetricus*, determined with histological and morphological methods. *Fish Bull.* 84: 1-17.
- Theilacker, G. y Y. Watanabe. 1989. Midgut cell height defines nutritional status of laboratory raised larval northern anchovy, *Engraulis mordax*, *Fish Bull.* 87: 457-469.
- Tucker, J. 1998. Marine fish culture. *Kluwer, Press, USA.* 750 pp.
- Ueberschrär, B. y C. Clemmesen. 1992. A comparison of the nutritional condition of herring larvae as determined by two biochemical methods-tryptic enzyme activity and RNA/DNA ratio measurements. *Short notes. ICES J. mar. Sci.* 49: 245-249.
- Umeda, S. y A. Ochiai. 1975. On the histological structure and function of digestive organs of the fed and starved larvae of yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Jap. J. Ichthyol.* 21: 213-219.

- Walford, J. y T. Lam. 1993. Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. *Aquaculture*. 109: 187:205.
- Watanabe, T. 1988. Nutrition and growth. 154-197 pp. *In*: J.C. Shepherd y R.N. Bromage (eds.) Intensive fish farming. *BSP Professional Books*. U. K.
- Weber, L., Higgins, P., Carlson, R. y D. Janz. 2003. Development and validation of methods for measuring multiple biochemical indices of condition in juvenile fishes. *Journal of Fish Biology*. 63, 637-658.
- Westerman, M. y G. Holt. 1994. The RNA-DNA ratios: measurement of nucleic acids in larval *Sciaenops ocellatus*. *Contributions to Mar. Sci. Suppl.*, 1988, 30:117-124.
- Wilbraham, A. y M. Matta. 1989. Introducción a la química orgánica y biológica. *Addison-Wesley Iberoamericana*. México. 540pp.
- Wo, K., Paul, K. S., Lam, S. y R. Wu. 1999. A Comparison of Growth Biomarkers for Assessing Sublethal Effects of Cadmium on a Marine Gastropod, *Nassarius festivus*. *Marine Pollution Bulletin*. 39 (1) 165-173.
- Wright, D. A. y F. D. Martin. 1985. The effect of starvation on RNA/DNA ratios and growth in larval striped bass, *Morone saxatilis*. *J. Fish. Biol.* 27: 479-485.
- Yin, M.C. y J. H. Blaxter. 1987. Feeding ability and survival during starvation of marine fish larvae reared in the laboratory. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 105: 73-83.
- Yúfera, M. Pascual, E. Polo, A. y M. C. Sarasquete. 1993. Effect of starvation on the feeding ability of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae at first feeding. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 169:259-272.
- Zohar, Y. y C. Mylonas. 2001. Endocrine manipulation of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*. 197: 99-136.

## ANEXO 1.

Método Schmidt-Thannhauser (Munro and Fleck, 1966) para la extracción de ácidos nucleicos en larvas de peces (Buckley y Bulow, 1987).



## ANEXO 2.

Método para determinar proteínas totales (Lowry *et al.*, 1951).

Solución A	Solución C
Para 100ml de agua destilada: 0.4 g de NaOH (0.1N). 2g de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Para 100ml de agua destilada: 1g de C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> KNaO <sub>6</sub> ·4H <sub>2</sub> O al 1%.
Solución B	Solución D
Para 100ml de agua destilada: 1 de CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O al 1%.	Folin-Cicalteu Fenol al 50% (Dilución 1:1, Folin:Agua destilada) Deberá prepararse al momento.

\*La solución A, B y C deberá mantenerse en refrigeración (4°C)

**Reactivo Lowry:**

1 parte de Sol A + 1/100 partes de Sol. B + 1/100 partes de Sol. C.

**Curva de Calibración:**

Realizar una curva patrón de calibración empleando 1 mg/ml BSA.

**Procedimiento:**

1ml de homogeneizado (Muestra).

+ 3ml de reactivo Lowry, agitar vigorosamente.

Reposar 10 min.

+ 0.3ml de reactivo Folin, agitar vigorosamente.

Reposar 10 min.

Leer la densidad óptica a 500nm.

\*Es estable por 30 min. aproximadamente.

## ANEXO 3.

Tabla a. Resultados del análisis de variancia del peso seco de las larvas de cabrilla arenera en el primera alimentación.

DDE	SC efecto	CM error	gl	F	p
<b>02.</b>	0.000496	0.767690	4	0.767690	0.430398
<b>03*</b>	0.112032	88.03809	4	88.03809	0.000719
<b>04*</b>	0.970149	384.1739	4	384.1739	0.000040

\*Indica diferencias significativas (P<0.05). DDE- Días después de la eclosión. SC-suma de cuadrados, CM-cuadrado medio. gl-grados de libertad.

Tabla b. Resultados del análisis de variancia de la morfometría de larvas de cabrilla arenera en el primera alimentación.

DDE	SC efecto	CM error	gl	F	p
<b>03</b>					
LN	0.000637	0.000085	4	7.516099	0.051823
DO	0.000725	0.000254	4	2.856352	0.166278
LPM	0.000001	0.000857	4	0.001527	0.970702
LC	0.000002	0.000204	4	0.008687	0.930222
LCA	0.000025	0.000032	4	0.772858	0.428976
AC	0.000244	0.000083	4	2.960338	0.160444
AM*	0.003125	0.000379	4	8.252933	0.045341
<b>04</b>					
LN*	0.012044	0.000053	4	228.1222	0.000112
DO	0.201600	0.000194	4	10.4148	0.052061
LPM*	0.008343	0.000760	4	10.9775	0.029565
LC*	0.007479	0.000069	4	108.3538	0.000481
LCA*	0.005868	0.000148	4	39.7040	0.003242
AC*	0.008157	0.000160	4	50.9033	0.002041
AM*	0.033346	0.000099	4	338.2389	0.000051

\*Indica diferencias significativas (P<0.05). SC-suma de cuadrados, gl-grados de libertad, CM-cuadrado medio. LN: Longitud notocordal, DO: Diámetro del ojo LPM: Longitud premaxilar; LC: Longitud cefálica, LCA: Longitud céfalo-ano, AC: Altura de la cabeza, y AM: Altura del músculo.

Tabla c. Resultados del análisis de varianza de la altura de los enterocitos y el área nuclear de los hepatocitos de las larvas de cabrilla arenera en la primera alimentación.

<b>DDE</b>	<b>SC efecto</b>	<b>CM error</b>	<b>gl</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>02</b>					
AE	0.000040	<b>0.000017</b>	4	2.407658	0.195690
ANH	0.000018	<b>0.000027</b>	4	0.651315	0.464895
<b>03</b>					
AE	0.000426	<b>0.000158</b>	4	2.693735	0.176088
ANH	0.000647	<b>0.000387</b>	4	1.672809	0.265519
<b>04</b>					
AE*	0.002384	0.000010	4	234.6543	0.000106
ANH*	0.003679	0.000019	4	194.3611	0.000154

\*Indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). AE-Altura de los enterocitos, ANH-Área nuclear de los hepatocitos. SC-suma de cuadrados, CM-cuadrado medio, gl-grados de libertad.

Tabla d. Resultados del análisis de varianza de los ácidos nucleicos, el índice ARN/ADN y las proteínas totales, de las larvas de cabrilla arenera en la primera alimentación.

<b>DDE</b>	<b>SC efecto</b>	<b>CM error</b>	<b>gl</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>02</b>					
ARN	0.003184	0.002444	4	1.302947	0.317370
ADN	0.025085	0.003609	4	6.951400	0.057789
ARN/ADN	0.000319	0.000089	4	3.590283	0.131022
PT	0.000049	0.006662	4	0.007304	0.936000
<b>03</b>					
ARN*	6.969521	0.011364	4	613.2773	0.000016
ADN	0.029769	0.011278	4	2.6396	0.179554
ARN/ADN*	1.054478	0.001291	4	817.0336	0.000009
PT*	0.320168	0.002706	4	118.3111	0.000406
<b>04</b>					
ARN*	6.969521	0.011364	4	613.2773	0.000016
ADN	0.029769	0.011278	4	2.6396	0.179554
ARN/ADN*	1.054478	0.001291	4	817.0336	0.000009
PT*	0.320168	0.002706	4	118.3111	0.000406

\*Indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). PT-Proteínas totales. SC-suma de cuadrados, CM-cuadrado medio, gl-grados de libertad.

Tabla e. Resultados de la prueba *t* del peso seco de larvas de cabrilla arenera durante el destete.

<b>DDE</b>	<b>Media AV</b>	<b>Media DMP</b>	<b>gl</b>	<b>Valor t</b>	<b>p</b>
<b>15</b>	28.74667	28.99000	4	-0.88669	0.425340
<b>21*</b>	293.6400	264.2333	4	6.908754	0.002303
<b>27*</b>	949.9000	628.7778	4	21.61919	0.000027
<b>33*</b>	2490.044	1046.111	4	68.93930	0.000000

\*Indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). DDE- Días después de la eclosión. gl-grados de libertad.

Tabla f. Resultados de la prueba *t* de la morfometría de larvas de cabrilla arenera durante el destete.

<b>DDE</b>	<b>Media AV</b>	<b>Media DMP</b>	<b>gl</b>	<b>Valor t</b>	<b>p</b>
<b>27</b>					
<b>LT*</b>	1.017564	0.959293	4	5.983243	0.003923
<b>LN*</b>	0.926101	0.868388	4	4.699966	0.009309
<b>LCA*</b>	0.723711	0.656888	4	5.642895	0.004856
<b>AM*</b>	0.286518	0.168306	4	6.297961	0.003248
<b>33</b>					
<b>LT*</b>	1.317937	1.082434	4	6.328235	0.003191
<b>LN*</b>	1.212957	0.970044	4	6.601737	0.002728
<b>DO</b>	0.148987	0.065747	4	1.689098	0.166469
<b>LP*</b>	0.263495	0.046375	4	3.208955	0.032621
<b>LC</b>	0.655642	0.549097	4	1.751521	0.154741
<b>LCA*</b>	0.984080	0.801322	4	4.999282	0.007494
<b>AC*</b>	0.588213	0.439461	4	2.950210	0.041961
<b>AM*</b>	0.568691	0.302572	4	5.566926	0.005100

\*Indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). gl - grados de libertad. dde - días después de la eclosión. AV- Alimento vivo, DMP-Dieta microparticulada. LT: Longitud total, LN: Longitud notocordal, DO: Diámetro del ojo LPM: Longitud premaxilar; LC: Longitud cefálica, LCA: Longitud céfalo-ano, AC: Altura de la cabeza, y AM: Altura del músculo.

Tabla g. Resultados del análisis de varianza de la altura de los enterocitos y el área nuclear de los hepatocitos de las larvas de cabrilla arenera durante el destete.

<i>DDE</i>	<i>SC efecto</i>	<i>CM error</i>	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
<b>21</b>					
AE	38.94021	2.815301	4	13.83163	0.020491
ANH	32.15398	0.643289	4	49.98374	0.002112
<b>27</b>					
AE	82.50128	2.208090	4	37.36320	0.003627
ANH	51.29761	0.874393	4	58.66651	0.001562
<b>33</b>					
AE	90.1625	8.745562	4	10.3095	0.032563
ANH	145.4087	0.560355	4	259.4937	0.000087

\*Indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). AE-Altura de los enterocitos, ANH-Área nuclear de los hepatocitos. SC-suma de cuadrados, gl-grados de libertad, CM-cuadrado medio.

Tabla h. Resultados de la Prueba *t* de los ácidos nucleicos, el índice ARN/ADN y las proteínas totales, de las larvas de cabrilla arenera durante el destete.

<i>DDE</i>	<i>Media AV</i>	<i>Media DMP</i>	<i>gl</i>	<i>Valor t</i>	<i>p</i>
<b>21</b>					
ARN*	0.01680	0.02561	4	-13.6107	0.000169
ADN*	0.07651	0.08500	4	-28.6990	0.000009
ARN/ADN*	27.10887	19.40899	4	12.0374	0.000273
PT*	0.00230	0.00360	4	-4.0108	0.015986
<b>27</b>					
ARN*	0.00524	0.00854	4	-13.9710	0.000152
ADN*	0.02578	0.03102	4	-3.0082	0.039622
ARN/ADN*	29.43165	21.32286	4	5.3820	0.005761
PT*	0.00079	0.00149	4	-2.8206	0.047799
<b>33</b>					
ARN*	0.00188	0.00763	4	-3.0619	0.037588
ADN*	0.01169	0.02572	4	-18.6208	0.000049
ARN/ADN*	40.30980	23.04788	4	1.9960	0.011664
PT*	0.00030	0.00093	4	-4.6804	0.009445

\*Indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). gl - grados de libertad. dde - días después de la eclosión. AV- Alimento vivo, DMP-Dieta microparticulada.