



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Departamento de Fisiología

Unidad Docente de Fisiología Animal

**RITMOS DE ACTIVIDAD MOTORA, COMPORTAMIENTO
ALIMENTARIO E INFLUENCIA DE LA MELATONINA EXÓGENA EN
PECES TELEÓSTEOS**

**Memoria de la Tesis Doctoral presentada por María Jesús Herrero Ramón para optar al grado
de Doctor en Biología por la Universidad de Murcia**

Dirigida y supervisada por:

Dr. Juan Antonio Madrid Pérez y Dr. Francisco Javier Sánchez Vázquez

Murcia, julio de 2007



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
UNIDAD DOCENTE DE FISIOLÓGÍA ANIMAL

Facultad de Biología

D. FRANCISCO JAVIER SALAZAR APARICIO, Catedrático de Universidad del Área de Fisiología y Director del Departamento de Fisiología, INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada "RITMOS DE ACTIVIDAD MOTORA, COMPORTAMIENTO ALIMENTARIO E INFLUENCIA DE LA MELATONINA EXÓGENA EN PECES TELEÓSTEOS", ha sido realizada por D^a MARÍA JESÚS HERRERO RAMÓN, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. JUAN ANTONIO MADRID PÉREZ Y D. FRANCISCO JAVIER SÁNCHEZ VÁZQUEZ, y que el Departamento ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

Murcia, a 10 de julio de 2007



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DPTO. DE FISIOLÓGÍA



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA
UNIDAD DOCENTE DE FISIOLÓGIA ANIMAL

Facultad de Biología

D. JUAN ANTONIO MADRID PÉREZ, Catedrático de Universidad del Área de Fisiología en el Departamento de Fisiología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "RITMOS DE ACTIVIDAD MOTORA, COMPORTAMIENTO ALIMENTARIO E INFLUENCIA DE LA MELATONINA EXÓGENA EN PECES TELEÓSTEOS", realizada por D^a.

MARÍA JESÚS HERRERO RAMÓN, bajo mi inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Fisiología, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia

JUAN A.
En Murcia, a 10 de julio de 2007
GRUPO DE ORDEN
DPTO. DE FISIOLÓGIA
FARMACOLÓGIA
FACULTAD DE BIOLÓGIA
UNIVERSIDAD DE MURCIA
30100 - MURCIA - ESPAÑA



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
UNIDAD DOCENTE DE FISIOLÓGÍA ANIMAL

Facultad de Biología

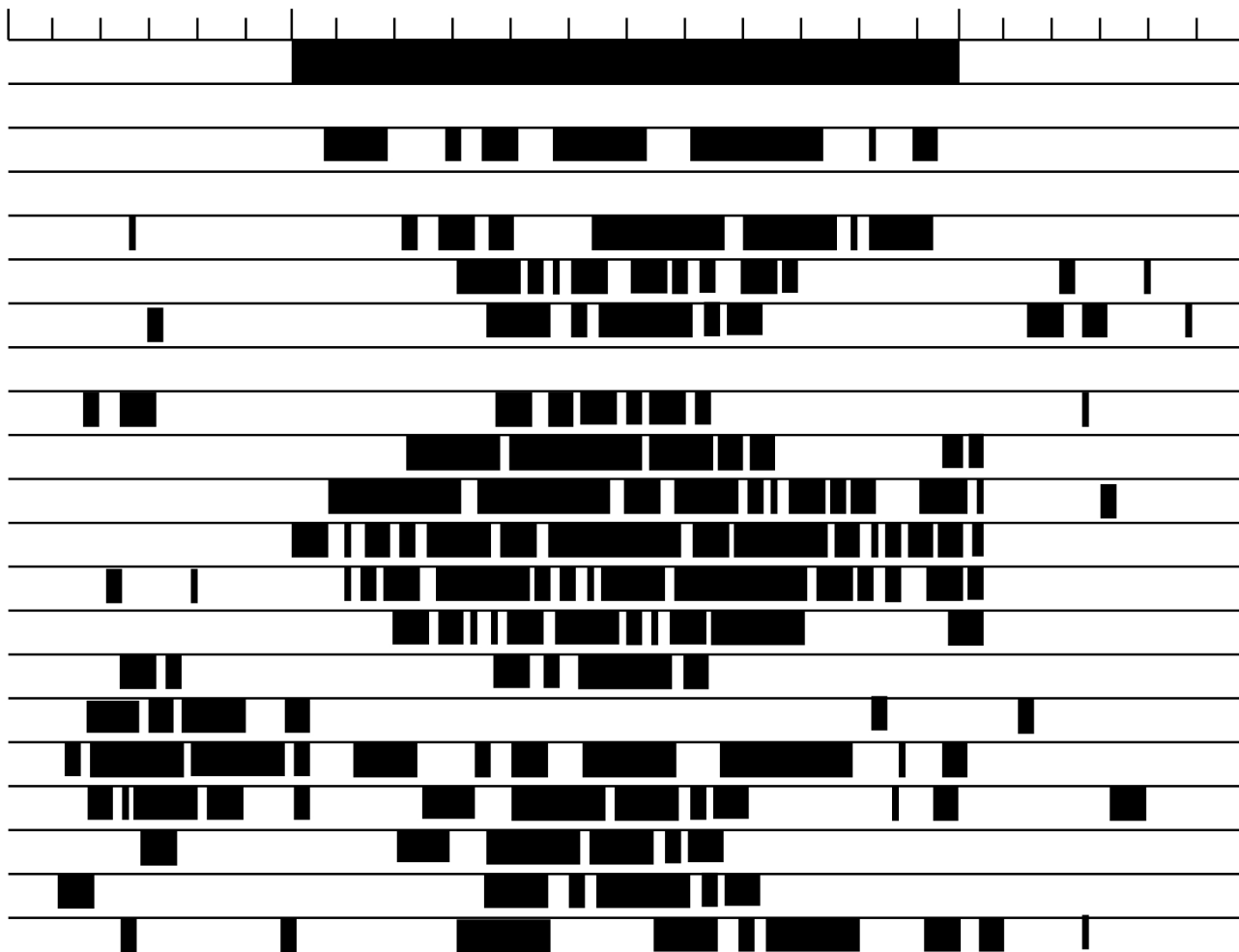
D. FRANCISCO JAVIER SÁNCHEZ VÁZQUEZ, Profesor Titular de Universidad del Área de Fisiología en el Departamento de Fisiología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “RITMOS DE ACTIVIDAD MOTORA, COMPORTAMIENTO ALIMENTARIO E INFLUENCIA DE LA MELATONINA EXÓGENA EN PECES TELEÓSTEOS“, realizada por D^a.

MARÍA JESÚS HERRERO RAMÓN, bajo mi inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Fisiología, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

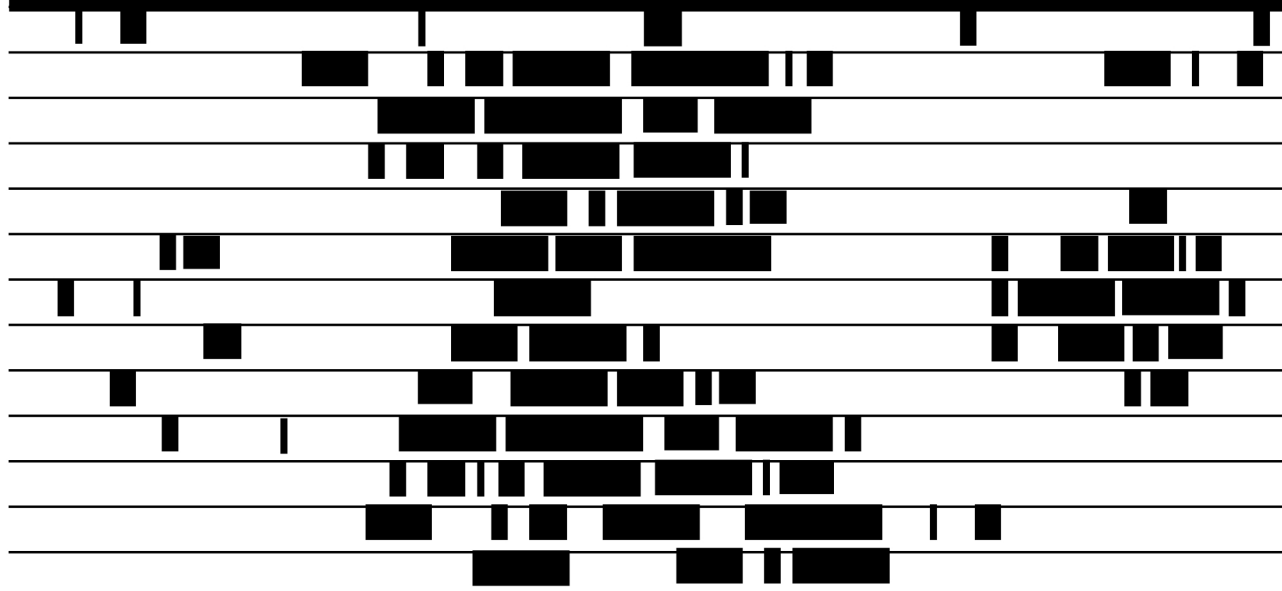
En Murcia, a 10 de julio de 2007


F. J. Sánchez-Vázquez



Ritmos de actividad motora, comportamiento alimentario e influencia de la melatonina exógena en peces teleósteos

María Jesús Herrero Ramón
2007



AGRADECIMIENTOS

Debo cada letra de esta tesis a todas las personas que me habéis animado, apoyado y ayudado a que hoy sea una realidad. Os la debo y os la dedico. Mi mayor agradecimiento a mis padres, porque vuestro amor ha estado siempre presente en cada minuto de mi vida, en todo lo que hago y en todo lo que soy. También a mis hermanos, Estela y Miguel (y recientemente, David y Natalia), porque sois simplemente inmejorables, mi mejor herencia.

Otra familia mía durante estos años han sido los profesores del departamento: Salvador, Paquita, Pilar, Jorge, Marian, Marta, Elvira, José Ángel y Juan Fran, representáis la estrella que seguimos, a vuestro lado no se para de aprender. Quiero destacar vuestra labor, así como la generosidad con la que siempre habéis atendido mis consultas.

Con toda mi admiración, afecto y gratitud a mis directores de tesis, Juan Antonio Madrid y a Javier Sánchez, muchas gracias por iniciarme en esta extraordinaria aventura cultural que ha supuesto para mí la tesis. Además, me siento profundamente agradecida por la ayuda constante de Javier Martínez, a quien también he sentido como mi director de tesis. Con vuestro esfuerzo cotidiano y extensa actividad impulsáis la ilusión por crear, trabajar y superarse en la investigación científica. Entre todos nos enseñáis a seguir construyendo ciencia con ánimo y voluntad, y por ello, gracias.

También se la dedico y agradezco a mis compañeros de departamento (muchos de ellos ya doctores) con quien he tenido la suerte de compartir mis vivencias aquí; en especial a mis compañeros de despacho que, como he estado en dos, son muchos: Vera, Mariado, Pedro, Pablo, Diego, Antonio, Bea, Tere... y además, por su ayuda en los experimentos a Eva, Laura, Luisa, Catarina, José Fernando, Paco y también a Marta y a Paloma, mis compañeras de Badajoz, porque siendo todos tan diferentes hay algo común en todos vosotros que os hace maravillosos, ¿será la ciencia?

Obtuve además una amistad incomparable de Fátima, su conversación me ha dado verdadero placer intelectual y muchos ánimos siempre; de Víctor, idem, abre hacia horizontes nuevos de pensamiento, no podría contar la cantidad de momentos increíbles que he disfrutado de

su visión de la vida y de su compañía; de Juan Antonio, que me ha brindado su asistencia todo terreno rebosante de energía vital; y de Manolo, que me ha transmitido la tranquilidad que he necesitado para seguir adelante, siendo un gran compañero y amigo.

Ramón, gracias por todo tu apoyo y cariño, especialmente desde el punto de vista personal, que ha sido importantísimo para el desarrollo de este trabajo.

A mis primos, tíos y abuelos (a los que están y a los que se han ido), y a mis amigas de Soria, de Cádiz y de Murcia. Prometo que a partir de ahora os cuidaré más. He conocido gente tan maravillosa estos años que así la filantropía no tiene mérito. Además, Juan Carl, José María y Enrique, gracias por vuestro apoyo tecnológico; Pilar, Cristina y Miguel, por todo lo que aprendo de vosotros; Ramón e Imanol, por la ayuda en las traducciones; Esther, Paloma, Laura, Esperanza, Nuria, Elena y Lucía por las enriquecedoras charlas de sofá; Anabel, por facilitarme artículos desde la biblioteca del CSIC y por trasladarme a la ilusión de mares lejanos, dándome energía para continuar; gracias también Fernando, por la misma razón, tus ocurrencias fantásticas han animado los paréntesis de la tesis.

Maria Dolores, Juana, Antonia, Régulo y a todo el personal del SACE que me ha facilitado y alegrado el trabajo llevado a cabo en los laboratorios, gracias por vuestra profesionalidad y colaboración.

He aprendido no sólo conocimientos, sino también un gran valor personal y un estilo de vida que se recrea en el aprendizaje, de profesores e investigadores de otros centros de investigación y universidades que me han ayudado a verlo todo con más claridad. Muy especialmente, gracias a Dr. Miguel Jover, Dr. Russel Reiter, Dr. Juan Miguel Mancera, Dr. José Antonio Muñoz Cueto, Dra. Inge Geurden, Dr. Anders Kiessling, Dr. Frode Oppedal, Dr. Kari Ruohonen, Dr. Steve Simpson, Dr. David Raubenheimer y a Dr. César Fallola, Dr. Jesús Míguez, Dr. José Luis Soengas, Dr. Benjamín García y Dra. Eva Brännäs, que además me han acogido en sus laboratorios. Mi agradecimiento a los referees anónimos por su dedicación, que ha mejorado la calidad de los artículos.

Resumiendo, gracias a todos los que me habéis ayudado a no desanimarme y a cuantos habéis contribuido, directa o indirectamente, a lograr los resultados alcanzados. Sin vosotros esta tesis no hubiera sido posible. Los errores son todos míos.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	7
1. RITMOS BIOLÓGICOS. GENERALIDADES.....	7
2. ENTRADAS DEL MARCAPASOS CIRCADIANO: SINCRONIZADORES O ZEITGEBERS	9
2.1. Sincronizadores abióticos: luz	10
2.2. Sincronizadores bióticos: horario de alimentación, interacciones sociales y administración de melatonina.....	11
3. EL MARCAPASOS CIRCADIANO	12
3.1. Los marcapasos circadianos en mamíferos	13
3.2. Mecanismos moleculares de funcionamiento de los osciladores.....	14
3.3. Marcapasos endógeno en peces: el órgano pineal y los osciladores periféricos.....	15
4. SALIDAS DEL MARCAPASOS CIRCADIANO: MELATONINA	16
4.1. Melatonina: funciones y generalidades.....	17
4.2. Ruta metabólica de la melatonina.....	18
4.3. Precursores: triptófano y serotonina	19
4.4. Fuentes de melatonina: el órgano pineal, el tracto gastrointestinal y otras fuentes extrapineales	20
5. SALIDAS DEL MARCAPASOS CIRCADIANO: CORTISOL	21
6. RITMOS MANIFIESTOS	23
6.1. Ritmos locomotores	24
6.2. Ritmos alimentarios	26
6.3. Interacciones sociales y ritmos	27
7. AUTOSELECCIÓN DIETARIA	28
8. BIOLOGÍA DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS.....	30
8.1. Tenca, <i>Tinca tinca</i> (Linnaeus, 1758).....	30
8.2. Trucha alpina o <i>Arctic charr</i> , <i>Salvelinus alpinus</i> (Linnaeus, 1758).....	31
8.3. Lubina, <i>Dicentrarchus labrax</i> (Linnaeus, 1758)	32
II. OBJETIVOS	35
III. CAPÍTULOS EXPERIMENTALES	37
1. SINCRONIZACIÓN POR LA LUZ DE LOS RITMOS CIRCADIANOS DE ACTIVIDAD EN LA TENCA (<i>Tinca tinca</i>)	37
1.1. Resumen	37

1.2. Introducción	38
1.3. Material y métodos	39
1.4. Resultados	42
1.5. Discusión	51
1.6. Agradecimientos	55
1.7. Referencias bibliográficas	56
2. RITMOS DE ALIMENTACIÓN A DEMANDA Y SINCRONIZACIÓN POR EL ALIMENTO DE LOS RITMOS DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN LA TENCA (<i>Tinca tinca</i>).....	59
2.1. Resumen	59
2.2. Introducción	60
2.3. Material y métodos	62
2.4. Resultados	65
2.5. Discusión	74
2.6. Agradecimientos	78
2.7. Referencias bibliográficas	79
3. RITMOS DIARIOS DE SELECCIÓN DE MACRONUTRIENTES MEDIANTE ALIMENTADORES A DEMANDA EN EJEMPLARES DE TRUCHA ALPINA (<i>Salvelinus alpinus</i>) MARCADOS INDIVIDUALMENTE	83
3.1. Resumen	83
3.2. Introducción	84
3.3. Material y métodos	87
3.4. Resultados	90
3.5. Discusión	99
3.6. Agradecimientos	102
3.7. Referencias bibliográficas	103
4. RESPUESTA DE LA MELATONINA GASTROINTESTINAL Y PLASMÁTICA, CORTISOL EN PLASMA Y RITMOS DE ACTIVIDAD MOTORA DE LA LUBINA (<i>Dicentrarchus labrax</i>) A LA SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA CON TRIPTÓFANO Y MELATONINA	107
4.1. Resumen	107
4.2. Introducción	107
4.3. Material y métodos	110
4.4. Resultados	113
4.5. Discusión	118
4.6. Agradecimientos	121

4.7. Referencias bibliográficas.....	123
IV. DISCUSIÓN GENERAL	129
V. CONCLUSIONES.....	137
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
VII. GLOSARIO	165
VIII. ASPECTOS ÉTICOS Y GENERALES	169
IX. ANEXOS: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA Y OTROS.....	171



I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. RITMOS BIOLÓGICOS. GENERALIDADES.

El movimiento cíclico de nuestro planeta y de la luna en el sistema solar, provoca variaciones ambientales periódicas (como las estaciones del año, los ciclos luz/oscuridad del fotoperiodo o las mareas). A lo largo de la evolución, se han desarrollado y mantenido mecanismos capaces de generar ritmos biológicos y una organización temporal interna, que confiere a los seres vivos la capacidad de anticipar estos cambios cíclicos ambientales y adaptar su fisiología a ellos. De esta manera, los ritmos biológicos sincronizan funciones tales como el reposo y la actividad, la temperatura del cuerpo, el latido cardíaco, el consumo de oxígeno o la secreción de glándulas endocrinas. Su conservación a lo largo de la cadena evolutiva, desde los organismos unicelulares hasta los mamíferos, demuestra que son imprescindibles para la supervivencia.

El ritmo biológico podría definirse como la recurrencia de un fenómeno biológico en intervalos regulares de tiempo (Aschoff, 1981). Referencias de la Antigua Grecia demuestran que ya entonces se tenía consciencia de que estos fenómenos ocurrían como respuesta a factores ambientales, si bien el primer experimento que sugirió el carácter endógeno de los ritmos biológicos se atribuye al astrónomo francés Jean Jacques d'Ortous de Mairan. En 1729, de Mairan describió en la "Histoire de l'Académie Royale des Sciences", que los ritmos diarios de extensión y retraimiento de las hojas de una planta heliotropa persistían bajo condiciones de oscuridad constante. Desde entonces se ha estudiado no sólo la organización temporal de los procesos que ocurren en los seres vivos, sino también los mecanismos que la originan, sus alteraciones y su distribución en la biota, constituyéndose así la Cronobiología como ciencia de estudio de los ritmos biológicos.

Los ritmos biológicos se clasifican en función de su frecuencia de oscilación en ultradianos (tienen períodos inferiores a 19 h), circadianos (cuyo período es cercano a las 24 h) e infradianos (con período superior a 29 h). Un ejemplo de ritmo ultradiano podría ser el sincronizado por las mareas semidiurnas, de aproximadamente 12 h de periodicidad, que en algunos bivalvos de la zona intermareal regula la apertura y cierre de sus valvas (Beentjes y William, 1986; Palmer, 1995). Por otro lado, los ritmos infradianos como los circanuales o los circalunares, suelen estar muy relacionados con la reproducción, especialmente en peces (Taylor, 1984).

En cuanto a los ritmos circadianos, éstos son sincronizados principalmente por los ciclos diarios de luz y oscuridad y de los que tratará la presente tesis. Los cambios cíclicos diarios son de gran interés puesto que la presencia o ausencia de luz modifica radicalmente las condiciones de vida ambientales, afectando además a la temperatura, a la disponibilidad de alimento, a la presencia de depredadores, etc.

Debido a la gran importancia de los ritmos circadianos, los organismos han desarrollado relojes biológicos endógenos o marcapasos circadianos que, incluso en ausencia de estímulos ambientales, oscilan con un periodo próximo a 24h. Para que los organismos puedan adaptar sus ritmos biológicos al entorno, es necesario que exista una entrada de la información ambiental a su sistema circadiano. Estas entradas o estímulos se captan por los transductores (como la retina), que transmiten la información (en este ejemplo, la lumínica) hasta el reloj endógeno. A su vez, el reloj endógeno puede sincronizarse con estos estímulos, de tal forma que las salidas rítmicas fisiológicas y los ritmos manifiestos comportamentales que se producen en el organismo, estén en fase con los ritmos ambientales. Este sistema se autorregula por una retroalimentación de las variables rítmicas sobre el propio reloj endógeno, funcionando alguna de las salidas también a modo de entradas (Rietveld, 1992).

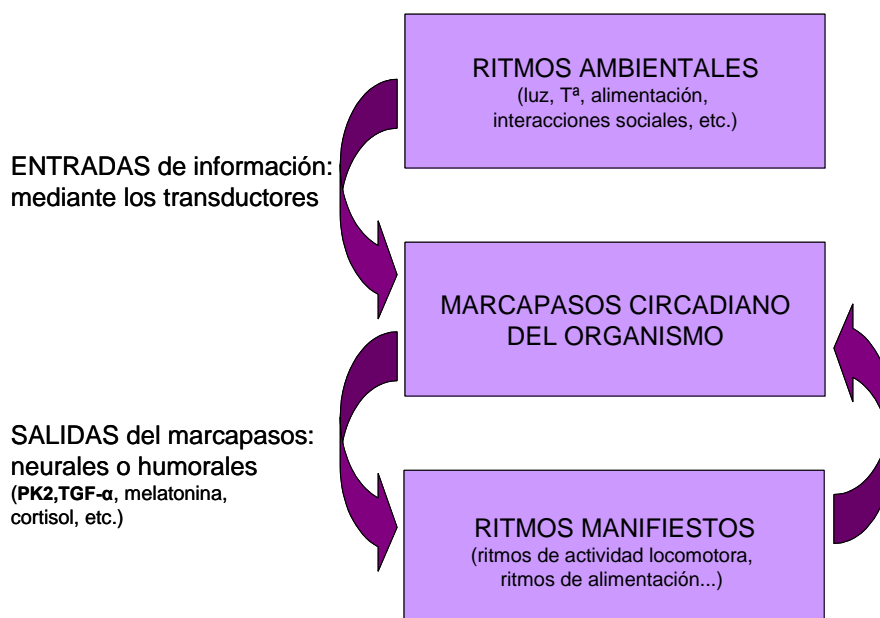


Fig. 1. Esquema general de la organización del sistema circadiano.

2. ENTRADAS DEL MARCAPASOS CIRCADIANO: SINCRONIZADORES O *ZEITGEBERS*

Las señales proporcionadas por los sincronizadores ambientales o "*zeitgebers*", una vez captadas por los transductores de los organismos, ajustan los marcapasos endógenos adelantando o retrasando sus fases, hasta que los estabilizan o "encarrilan" con el tiempo ambiental.

Los sincronizadores ambientales (o simplemente sincronizadores) se clasifican en abióticos o bióticos, en función de si están relacionados con parámetros físico-químicos o biológicos, respectivamente. Sincronizadores abióticos son, por ejemplo, la luz o la temperatura; mientras que el alimento o las interacciones sociales serían sincronizadores bióticos. De todos ellos, la luz parece ser el sincronizador más potente en la mayoría de las especies estudiadas.

En ausencia de sincronizadores (bajo condiciones constantes de luz, de temperatura, etc.), el animal entra en "curso libre", esto es: su marcapasos circadiano se desajusta ligeramente y oscila con un periodo endógeno o *tau* (τ) que puede ser ligeramente superior o inferior a 24h, dependiendo de la especie o del individuo. En esta situación, el animal mantiene sus ritmos de actividad y reposo acorde a un día y a una noche subjetivos.

Un parámetro ambiental es considerado como sincronizador cuando, tras varios días de exposición al mismo, aparece una relación de fase estable entre el ritmo y el *zeitgeber*. Además, cuando se elimine el sincronizador el animal entrará en curso libre con un determinado *tau* o periodo endógeno (Moore-Ede *et al.*, 1982).

En ocasiones, algunos factores ambientales influyen directamente sobre la expresión del ritmo circadiano, pero sin actuar sobre el marcapasos circadiano (Aschoff *et al.*, 1982). En tal caso, no se considera que estén actuando como *zeitgebers*, sino que estarían ejerciendo un efecto enmascarante del ritmo biológico. Estos factores enmascarantes impiden la transmisión de señales desde el marcapasos a las funciones controladas por él y si también son periódicos, podrán llegar a dominar sobre las periodicidades impuestas por el sistema circadiano endógeno. El enmascaramiento es distinguible del encarrilamiento porque cuando se imponen condiciones de curso libre, el sujeto muestra un salto súbito en su actividad, retomando la fase que mantenía previamente a la presencia del aparente estímulo encarrilador (Aschoff, 1981).

2.1. Sincronizadores abióticos: luz

En la mayoría de las especies estudiadas, la luz del fotoperiodo es el sincronizador ambiental más potente.

En mamíferos, la luz ambiental es percibida por la retina, que envía esta información al sistema nervioso central. En peces se ha demostrado que, además de la retina, el órgano pineal posee fotorreceptores que captan las señales lumínicas (Meissl y Dodt, 1981; Meissl *et al.*, 1986).

Para sincronizar sus ritmos, los animales “miden” la duración del día. La forma en que lo hacen se explica por cuatro posibles mecanismos. En el primero, o *modelo de duración*, el mensaje de la fase de oscuridad está determinado por la duración de niveles elevados de melatonina que varían con fotoperiodos cambiantes. La melatonina es la principal hormona del sistema circadiano, utilizada por los organismos como señal de oscuridad (véase apartado 1.4.). El segundo modelo o *modelo de amplitud*, sugiere que la amplitud del pico nocturno de melatonina “informa” sobre la duración de la fase de oscuridad. En el *modelo de coincidencia externa*, la luz del amanecer encarrila un ritmo endógeno de sensibilidad. Si la luz cae dentro de esa fase, es leída como una señal de día largo. En la cuarta hipótesis o *modelo de coincidencia interna*, la luz alteraría la relación entre las fases de dos osciladores (uno para la mañana y otro para el atardecer) cuya relación de fase es traducida como la señal fotoperiódica (Madrid *et al.*, 2007; Reiter, 1993). De estos modelos, el de coincidencia externa cuenta con más apoyo experimental, basado en resultados como los de Sundararaj y Vasal (1976). Ellos mantuvieron peces hembras de *Heteropneustes fossilis*, que necesitan fotoperiodo largo para su desarrollo gonadal, bajo fotoperiodo corto LD 7:17, con una escotofase interrumpida por un pulso de luz de 1 h, a diferentes horas. Sólo los grupos que recibieron el pulso 14-18 h tras el encendido de luces, mostraron desarrollo ovárico. Experimentos con genes reloj en mamíferos, también avalan este modelo (Lincoln *et al.*, 2002).

Además de la duración del fotoperiodo, otras propiedades de la luz intervienen en el mecanismo circadiano, como por ejemplo el espectro lumínico (Pohl, 1999; Ziv *et al.*, 2007). En este sentido, se ha comprobado que determinadas longitudes de onda tienen menor efecto en la supresión de síntesis de melatonina que otras, en función de los pigmentos retinales del individuo y de la hora de administración del pulso de luz (Brainard *et al.*, 1984; Honma *et al.*, 1992). También

los cambios en la intensidad lumínica pueden alterar los patrones circadianos de los organismos, induciendo inversiones (Eriksson, 1978).

Pero no siempre la luz actúa como sincronizador. Por ejemplo, cuando la luz es aplicada en mitad de una fase de oscuridad, puede inhibir la actividad en especies de comportamiento nocturno, sin actuar sobre su marcapasos endógeno. En tal caso, la luz estaría actuando como factor enmascarante del ritmo circadiano (Aschoff, 1989).

Por otra parte, existen diferentes entradas de información ambiental de carácter abiótico o físico-químico, que afectan a la actividad de los peces (aunque generalmente en menor medida que la luz). Potencialmente podrían sincronizar el marcapasos endógeno en peces, debido a que son parámetros que registran variaciones circadianas. Entre otros, destacan la temperatura (Rensing y Ruof, 2002), el oxígeno disuelto, el CO₂ y las variaciones en la presión hidrostática originada por las mareas (Boujard y Leatherland, 1992). En cualquier caso, hay pocos datos disponibles en relación a la acción encarriladora de estos estímulos en peces y, por ejemplo, aún no se ha demostrado que las variaciones diarias en las variables químicas del agua (fundamentalmente el oxígeno disuelto), actúen como sincronizadores que afectan al componente endógeno (Zhdanova y Reebbs, 2006).

2.2. Sincronizadores bióticos: horario de alimentación, interacciones sociales y administración de melatonina

Los ritmos circadianos también pueden encarrilarse por estímulos bióticos como el horario regular de alimentación. Esta sincronización es independiente del ciclo LD y prepara el comportamiento y la fisiología del animal a las oportunidades de alimentación.

En estudios con trucha, los peces eran capaces de encarrilarse a más de una comida diaria (Chen y Tabata, 2002). Además, se ha estudiado el encarrilamiento según las calorías aportadas y el tamaño de la comida. En este sentido, en carpín se comprobó la importancia del tamaño de la comida, observándose que el alimento era un mejor sincronizador cuando el tamaño de la comida era pequeño, lo que sugiere que el hambre o la distensión del aparato digestivo está relacionada con la capacidad de sincronización (Sánchez-Vázquez *et al.*, 2001). Asimismo, en ratas se observó que se necesita un mínimo aporte calórico para que el alimento actúe como sincronizador (Stephan, 1997). Otro tipo de estudios analizaban la composición de la dieta y la influencia de cada

macronutriente en la sincronización de los ritmos, llegando a la conclusión de que las dietas ricas en grasa son las de menor efecto (Stephan y Davidson, 1998).

Por otro lado, las interacciones sociales intra o interespecíficas también tienen cierta influencia sobre los ritmos circadianos. En determinadas especies de peces, se ha comprobado que el agrupamiento en bancos modifica el carácter nocturno o diurno de los individuos (Kavaliers, 1980a; 1980b) y puede facilitar el encarrilamiento a la luz y al alimento (Boujard, 1995). Pero también, como efecto de las jerarquías que se desarrollan en los cardúmenes de algunas especies de peces, se ha observado que los individuos menos competitivos pueden ser desplazados hacia horarios de alimentación más desfavorables, probablemente para evitar competencia intraespecífica (Alanärä y Brännäs, 1997).

En cuanto a sincronizadores sociales interespecíficos: por un lado, la disponibilidad de presas puede considerarse equivalente al sincronizador por el horario de alimentación; por otro lado, los organismos pueden encarrilar sus marcapasos circadianos para anticipar la presencia de depredadores (Schibler y Sassone-Corsi, 2002).

Otro sincronizador biótico es la hormona melatonina. Su administración exógena puede encarrilar los ritmos circadianos en sujetos bajo condiciones de curso libre, actuando como *zeitgeber* interno, según se ha comprobado en ratas (Redman *et al.*, 1983). El encarrilamiento por melatonina exógena puede verse afectado por diversos factores, como la dosis suministrada, la hora de administración, la duración de la infusión de melatonina y las características iniciales del comportamiento del animal (Pitrosky *et al.*, 1999; Pertsov, 2006). Al parecer, los receptores de melatonina en las células pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo del encarrilamiento. La sensibilidad de los receptores de melatonina sigue un patrón circadiano, lo que explicaría la influencia de la hora de administración en el encarrilamiento (Agez *et al.*, 2007).

3. EL MARCAPASOS CIRCADIANO

Demostrar la existencia de un marcapasos circadiano requiere que un animal, bajo condiciones constantes, muestre un patrón cíclico de actividad/reposo o *tau* de aproximadamente 24h. En especies con marcapasos muy potentes, los ciclos automantenidos pueden prolongarse durante meses, oscilando con el *tau* correspondiente. En especies con marcapasos menos

potentes, como en la mayoría de los peces estudiados, estos ciclos sólo se mantienen durante varios días.

Además, hay otras formas de estudio de los marcapasos circadianos: observar la anticipación de eventos regulares diarios como la noche, el día, la llegada de alimento, etc. O adelantar/retrasar la fase del sincronizador y observar los ciclos de actividad hasta que el animal se sincroniza de nuevo. Asimismo, se han llevado a cabo numerosos experimentos para localizar los marcapasos circadianos: examen de tejidos aislados *in vitro*, efectos *in vivo* de extirpación local y estimulación o trasplantes de supuestos tejidos marcapasos en sujetos arrítmicos.

Sin embargo, algo que todavía no está totalmente aclarado es cómo se organizan los mecanismos endógenos que regulan los ciclos de actividad en condiciones constantes.

3.1. Los marcapasos circadianos en mamíferos

Hay dos teorías que intentan dar respuesta a este fenómeno. La primera de ellas supone la existencia de un único marcapasos endógeno encarrilado por la luz (LEP "Light entrainable pacemaker"), en el que la hora de la alimentación puede quedar memorizada y por tanto, puede aparecer actividad anticipatoria al alimento. Frente a este modelo de un único LEP, la teoría multioscilaria sostiene la existencia de, al menos, dos marcapasos diferentes: uno sincronizado por la luz (LEP) y otro por el alimento (FEP "Feeding entrainable pacemaker") (Aschoff y Weber, 1976; Mistlberger, 1994).

El sistema circadiano de los mamíferos se ajusta a este segundo modelo. De hecho, en mamíferos, el marcapasos encarrilado por la luz se ha localizado en el núcleo supraquiasmático (NSQ), cuyas lesiones provocan alteraciones en los ritmos circadianos (Richter, 1967). Sin embargo, cuando el NSQ es extirpado no desaparece la capacidad de anticipación al alimento (Stephan *et al.*, 1979a, Stephan *et al.*, 1979b), indicando la existencia de marcapasos adicionales. En el caso del FEP, su existencia se ha demostrado de forma funcional y no se conoce su localización exacta, si bien se asocia a órganos del aparato digestivo, como el hígado, y al tracto gastrointestinal. Además, el alimento parece sincronizar osciladores circadianos en órganos como el corazón y los pulmones, independientemente del ciclo LD (Mistlberger y Antle, 2006). En condiciones normales, el NSQ parece que actúa sincronizando todos los osciladores, sin embargo, bajo determinadas circunstancias (por ejemplo, cuando el alimento es escaso), los osciladores

periféricos, localizados fuera del cerebro, pueden desacoplarse y funcionar independientemente del marcapasos principal (Damiola *et al.*, 2000).

3.2. Mecanismos moleculares de funcionamiento de los osciladores

A escala molecular, los ritmos de los osciladores se automantienen mediante bucles de retroalimentación génica, en los que intervienen genes como *Per*, *Cry* o *Bmal1*. El modelo más aceptado propone que tanto las proteínas PER y CRY, como su RNA mensajero, tienen ritmos circadianos de expresión. Su síntesis es estimulada por factores de transcripción positivos, en concreto por el heterodímero BMAL-CLOCK, mientras que la transcripción se regula por un mecanismo de retroalimentación negativa de las proteínas PER y CRY sobre el complejo BMAL-CLOCK, inhibiendo su propia transcripción y actuando, por tanto, como factores de transcripción negativos. Este bucle controla también los ritmos de expresión del represor REV-ERB α (necesario para la transcripción rítmica del gen *Bmal1*), y genera un periodo de oscilación molecular de aproximadamente 24h (Zhdanova y Reeb, 2006).

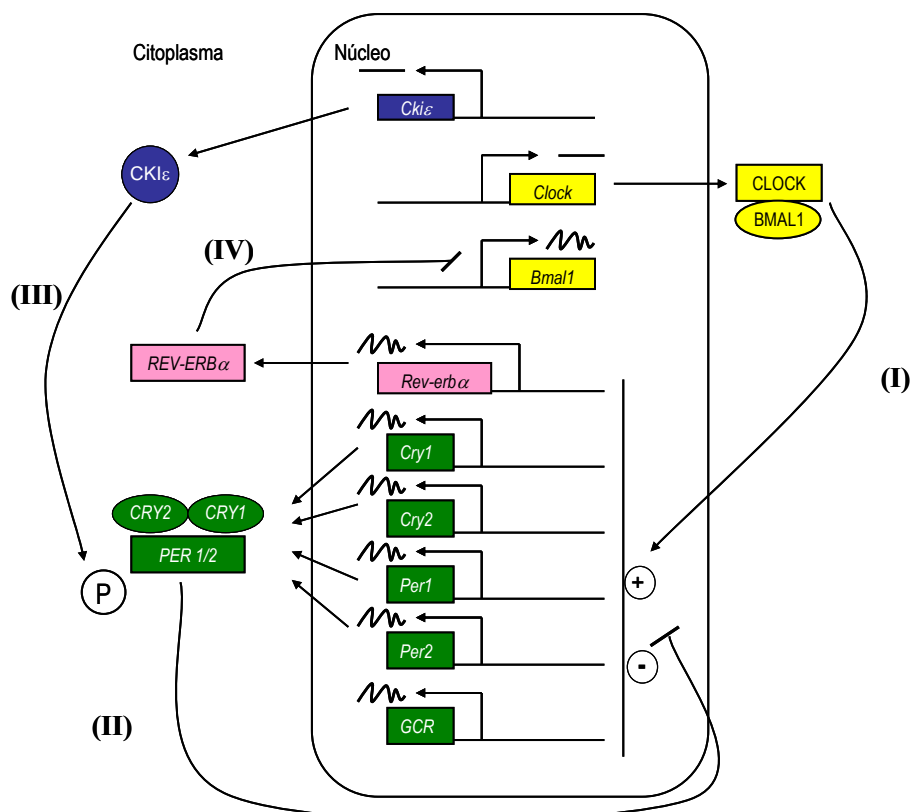


Fig. 2. El modelo del reloj molecular en mamíferos propone que el dímero CLOCK-BMAL1 activa la transcripción de los genes *Per* y *Cry* (I). Las proteínas CRY y PER forman multímeros que translocan al núcleo e inhiben la activación de la transcripción inducida por CLOCK-BMAL1 (II). La retroalimentación negativa de las proteínas CRY y PER sobre la transcripción de sus propios genes es retrasada por la fosforilación de las proteínas PER por acción de CKI ϵ (III). La transcripción de *Rev-erb α* es también

activada por CLOCK-BMAL1 e inhibida por el complejo PER-CRY, produciendo una oscilación en los niveles de REV-ERB α , una proteína que, a su vez, inhibe la transcripción de Bmal1 (IV). El resultado de estos ciclos de retroalimentación es la oscilación en los niveles de ARNm y proteínas de varios de los genes reloj y de genes controlados por el reloj. (Fuente: de la Iglesia, 2006).

Los genes reloj se expresan en el cerebro y también en tejidos y células periféricas, funcionando de forma rítmica. Además, se ha observado acoplamiento de las oscilaciones en tejidos enteros. Esto sugiere que los órganos de todo el cuerpo marcan el tiempo utilizando sus propios relojes genéticos internos.

3.3. Marcapasos endógeno en peces: el órgano pineal y los osciladores periféricos

En peces teleósteos no se ha documentado la existencia de una estructura neuronal análoga al núcleo supraquiasmático (NSQ) de mamíferos. En cualquier caso, al igual que los mamíferos, los peces presentan órgano pineal: una estructura conservada a lo largo de la evolución de gran importancia en el funcionamiento del sistema circadiano. El órgano pineal de peces teleósteos es una diminuta evaginación de la región diencefálica. Su pared epitelial presenta abundantes pliegues, en los que se diferencian tres tipos de células principalmente: fotorreceptores, neuronas y células gliales (Falcón, 1999). Los fotorreceptores conectan sinápticamente con las neuronas, y ambos conectan neuralmente con el cerebro. A su vez, existen conexiones eferentes de origen central que inervan la pineal.

Las células fotorreceptoras del órgano pineal de peces, captan directamente la información luminosa del medio externo y son capaces de sintetizar melatonina. Además, los ritmos de secreción de melatonina obtenidos en cultivos *in vitro* del órgano pineal de varias especies de peces, han dado como resultado concentraciones mayores durante la fase de oscuridad real o subjetiva, confirmando la existencia de un oscilador intrapineal (Kezuka *et al.*, 1989; Iigo *et al.*, 1991; Bolliet *et al.*, 1994; Okimoto y Stetson, 1999). De esta forma, en el órgano pineal estarían asociados anatómicamente los mecanismos de fototransducción, marcapasos y síntesis de melatonina. Asimismo, resultados en reptiles sugieren que el marcapasos localizado en la pineal, podría estar controlando otros osciladores subordinados a través de la síntesis rítmica y secreción de melatonina (Hyde y Underwood, 2000). A su vez, estos osciladores subordinados también parecen sincronizarse con otros *zeitgebers* como el horario de alimentación, y se ha comprobado que en peces pinealectomizados persistían los ritmos de alimentación autodemanda (Sánchez-Vázquez *et al.*, 2000).

No obstante, el órgano pineal no desempeña función de marcapasos circadiano en todas las especies de peces estudiadas. De hecho, en trucha así como en otros salmónidos, la síntesis de melatonina en la glándula pineal está directamente controlada por la iluminación del ambiente (Gern y Greenhouse, 1988; Max y Menaker, 1992; Ekström y Meissl, 1997; Falcón *et al.*, 1998). A lo largo de la evolución, la capacidad fotorreceptora de la pineal y su carácter de marcapasos circadiano ha ido desapareciendo, hasta llegar a mamíferos en los que sólo se mantiene la capacidad de síntesis de melatonina (Korf, 2000; Falcon, 1999). Sin embargo, la desaparición del carácter de marcapasos endógeno en salmónidos parece ser, más probablemente, debida a una mutación (Coon *et al.*, 1998).

En relación al componente endógeno encarrilado por el alimento (FEP) se sabe que, al menos en determinadas especies de peces, puede sincronizarse de forma independiente al encarrilado por la luz (LEP) (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1995a). Su localización anatómica se desconoce, si bien podría estar asociado al tracto gastrointestinal. De hecho, parece sincronizar la secreción de determinadas enzimas digestivas y además, tras la ingesta de alimento se ha descrito un aumento de la producción de melatonina intestinal, al igual que ocurre en las células fotorreceptoras en respuesta a la oscuridad (Vera *et al.*, 2007).

A escala molecular, los peces expresan genes reloj en gran variedad de tejidos, de forma similar a mamíferos. En el caso del pez cebra se ha documentado esta expresión en el corazón y en el riñón (Whitmore *et al.*, 1998). Sin embargo, el sistema circadiano de peces presenta una gran plasticidad, con ritmos circadianos inestables, cambios espontáneos de fase entre actividad nocturna y diurna, y cambios estacionales profundos en los patrones de actividad. La existencia de una red compleja de osciladores centrales y periféricos circadianos y un gran número de genes reloj en peces, comparado con otros vertebrados, puede explicar algunas de estas características específicas (Zhdanova y Reeb, 2006).

4. SALIDAS DEL MARCAPASOS CIRCADIANO: MELATONINA

En mamíferos, el marcapasos circadiano central puede comunicar sus mensajes de fase de actividad al resto del organismo gracias a factores humorales como una pequeña proteína llamada prokinetina 2 (PK2), codificada por el gen de la prokinetina (Cheng *et al.*, 2002), o al factor de crecimiento transformador (TGF- α) (Kramer *et al.*, 2001). En ratones, se expresan en el núcleo

supraquiasmático rítmicamente, en respuesta al ciclo de luz-oscuridad y al marcapasos circadiano, y envían señales de largo alcance en el espacio y en el tiempo. Además, el envío de señales rápidas y localizadas puede llevarse a cabo mediante prolongaciones neuronales procedentes directamente del NSQ del hipotálamo y que conectan con los distintos órganos del cuerpo (LeSauter y Silver, 1998). En peces, se sabe muy poco sobre estos mecanismos humorales y neuronales (Zhdanova y Reeb, 2006) pero, al igual que en mamíferos, la hormona melatonina aparece como la hormona mensajera del marcapasos circadiano. La melatonina actuaría como señal inequívoca de baja intensidad de luz, relacionando las fases de los diferentes osciladores endógenos con el ambiente. Su papel en el mecanismo circadiano se trata a continuación con más detalle.

4.1. Melatonina: funciones y generalidades

La melatonina es la principal hormona responsable de la sincronización de los ritmos biológicos con los ciclos luz/oscuridad del fotoperiodo, actuando como señal química perceptible por las células. Transmite a las células la información de oscuridad. De esta manera, sus niveles son elevados durante la noche y su secreción se inhibe en presencia de luz. Gracias a este funcionamiento, también suministra al organismo información sobre la época del año, según sea la duración del fotoperiodo. La hormona melatonina está presente en todos los vertebrados, y en especies de invertebrados, plantas, hongos, protozoos y bacterias.

La melatonina es una indolamina altamente lipofílica que, debido a su estructura molecular, puede penetrar fácilmente en cualquier célula o fluido corporal. Además de sus propiedades circadianas, es un potente antioxidante e inmunoestimulante, actúa como factor antiestrés e interviene en la regulación de la maduración gonadal de vertebrados.

En los diferentes tejidos de peces teleósteos, existen receptores específicos de alta afinidad para la melatonina, que detectan cambios en sus niveles circulantes y cuya sensibilidad puede variar de forma cíclica cada 24 horas. Son muy abundantes, especialmente en estructuras de los sistemas visual y auditivo, y en determinadas áreas cerebrales, sugiriendo que estas áreas pueden estar relacionadas con las manifestaciones comportamentales del incremento de melatonina (Brooks y Cassone, 1992).

4.2. Ruta metabólica de la melatonina

La principal ruta biosintética de la melatonina consiste en la conversión del triptófano en serotonina, y de ésta en melatonina.

De forma detallada, el triptófano se convierte en 5-hidroxitriptófano (5-HTP) tras una 5-hidroxilación por acción de la enzima triptófano hidroxilasa (TPOH). A continuación, la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (AAAD) convierte el 5-HTP a serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT). La serotonina puede ser convertida por la enzima arilalkilamina N-acetiltransferasa (AA-NAT) en N-acetilserotonina, que a su vez es convertida, por acción de la enzima hidroxiindol-O-metiltransferasa (HIOMT), en melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina). Generalmente, la enzima AA-NAT limita el proceso, si bien la enzima HIOMT se ha descrito también que puede actuar como limitante (Hardeland y Poeggeler, 2003).

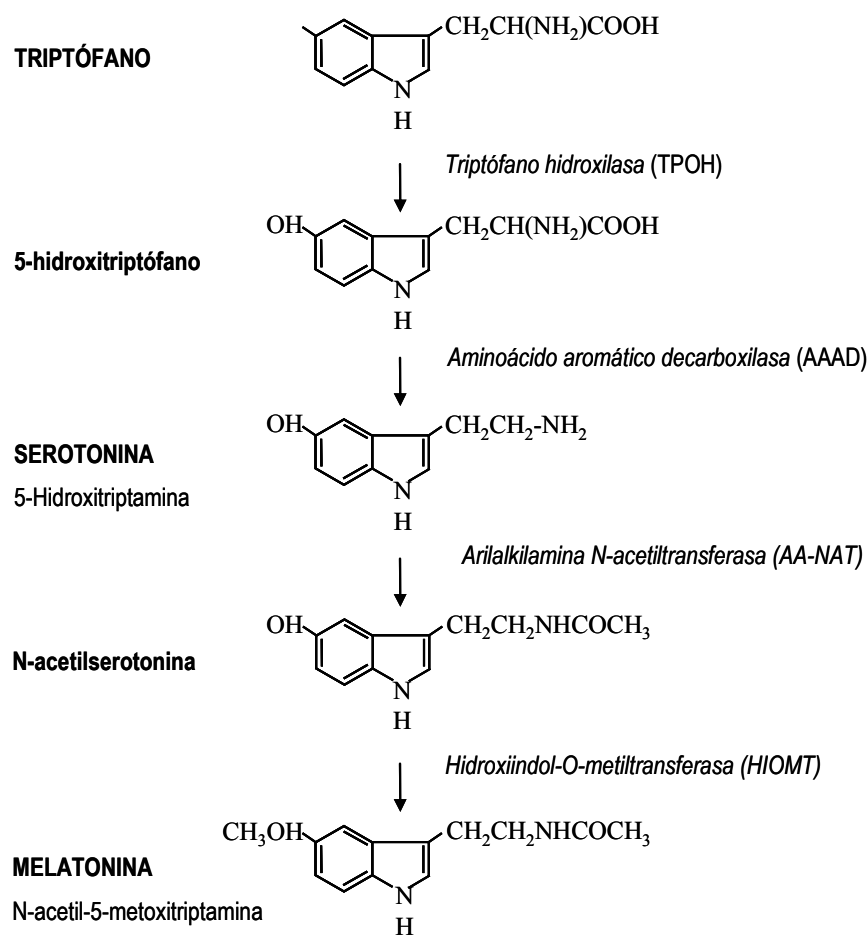


Fig. 3. Ruta biosintética de la melatonina a partir de su aminoácido precursor, el triptófano.

Hay varias fuentes de producción de melatonina en vertebrados entre las que se encuentran la glándula pineal, la retina y el tracto gastrointestinal (véase apartado 4.4.).

Por otra parte, la melatonina es catabolizada siguiendo dos vías diferentes. La vía catabólica más importante de melatonina circulante ocurre por la conversión enzimática de melatonina en 6-hidroximelatonina, llevada a cabo por las monooxigenasas hepáticas P₄₅₀. Seguidamente se produce una conjugación, que da como resultado el metabolito urinario principal 6-sulfatoximelatonina, que se elimina en la orina. Sin embargo, la melatonina de los tejidos, especialmente la del sistema nervioso, se cataboliza principalmente por división de su anillo pirrólico, contribuyendo en un tercio al total de la melatonina catabolizada (Hardeland *et al.*, 2006).

4.3. Precursores: triptófano y serotonina

El triptófano en vertebrados es un aminoácido esencial que, por tanto, debe ingerirse en la dieta. Su presencia es imprescindible para la producción de serotonina y melatonina, así como para la síntesis proteica. La ruta de degradación tiene lugar en el hígado y lleva a la formación del ácido nicotínico y otros subproductos.

La serotonina desempeña funciones en el sistema circadiano y endocrino. Es uno de los principales neurotransmisores del núcleo supraquiasmático, esencial para regular el sueño, el apetito, el humor y los umbrales del dolor. Los patrones circadianos de sus niveles se oponen a los de la melatonina, presentando una mayor concentración durante el día, cuando las actividades de las enzimas AA-NAT y la HIOMT son bajas, y una menor concentración durante la noche, al actuar como sustrato para la síntesis de melatonina.

Varios estudios sugieren que la concentración de serotonina en el cerebro es directamente proporcional a las concentraciones de triptófano en plasma y cerebro, directamente influenciadas por la ingesta dietética de triptófano (Aldegunde, 1998; Winberg *et al.*, 2001). En peces, la suplementación de triptófano en la dieta reduce los niveles de cortisol bajo condiciones de estrés (Lepage *et al.*, 2002), su agresividad (Winberg *et al.*, 2001), y también su peso corporal (Hseu *et al.*, 2003). En trucha estos efectos parecen estar mediados por la serotonina y no por la melatonina, a pesar de que la ingesta de triptófano puede también influir en la concentración de melatonina (Lepage *et al.*, 2005b).

4.4. Fuentes de melatonina: el órgano pineal, el tracto gastrointestinal y otras fuentes extrapineales

En todos los grupos de vertebrados, el órgano pineal sintetiza melatonina y la libera al torrente sanguíneo, inhibiéndose su síntesis en presencia de luz.

En la pineal de mamíferos, la enzima AA-NAT que limita la síntesis de melatonina, está controlada por el núcleo supraquiasmático (Borjigin *et al.*, 1999). Las señales lumínicas captadas por las células ganglionares de la retina, envían la información al NSQ a través del tracto retinohipotalámico (Moore y Lenn, 1972). En ausencia de luz, el NSQ transmite la información de oscuridad mediante una vía multisináptica, estimulando la producción de melatonina en la glándula pineal. Concretamente, provoca una elevación nocturna en la liberación de norepinefrina que, vía los β_1 y α_1 -adrenorreceptores (Klein *et al.*, 1983), incrementa el AMP cíclico intracelular (AMPC) el cual media la fosforilación de la AA-NAT, activándola (Klein y Moore, 1979; Larsen *et al.*, 1998; Hardeland *et al.*, 2006).

En peces teleósteos, el órgano pineal muestra capacidades fotorreceptoras, al igual que en anfibios, reptiles y aves (Falcón, 1999). La información lumínica captada a través de estos receptores pineales y de la retina, se integra y provoca cambios en la producción de melatonina (Bayarri *et al.*, 2003). La diferencia entre los dos fototransductores reside en que la retina puede discriminar cambios lumínicos rápidos, a diferencia del órgano pineal que indicaría los cambios graduales, como los que se producen entre el día y la noche (Falcón, 1999). Esto podría deberse a los dos tipos de AA-NAT que se han detectado recientemente en el pez cebra: la AA-NAT1, que se expresa en la retina y la AA-NAT2, que se expresa en la retina y en la pineal. En oscuridad constante, la expresión rítmica de la AA-NAT2 retinal persiste, mientras que el ritmo de la AA-NAT1 desaparece, indicando que mientras que la AA-NAT2 está controlada por un marcapasos circadiano, la AA-NAT1 parece estar muy influida por la luz (Appelbaum *et al.*, 2006).

Los mecanismos que activan la producción de melatonina se asemejan a los descritos para mamíferos, si bien parecen estar directamente controlados por genes reloj en la pineal (Hardeland *et al.*, 2006). Por otra parte, la inhibición de su producción podría deberse a que la luz activa una fosfodiesterasa que reduce los niveles de GMPc, ocasionando el cierre de canales de sodio y calcio activados por GMPc. Esto hace que las células fotorreceptoras, que se encontraban parcialmente

despolarizadas en oscuridad, se hiperpolaricen, inhibiéndose la liberación de neurotransmisores estimuladores como glutamato y aspartato (Falcón, 1999).

Además de la glándula pineal, existen otras fuentes de secreción de melatonina, incluyendo el tracto gastrointestinal (Bubenik, 2002), la retina (Gern y Ralph, 1979), los leucocitos y la glándula harderiana (en aves y mamíferos) (Kvetnoy, 1999).

De todas ellas, el tracto gastrointestinal está considerada como la mayor fuente extrapineal de melatonina, pudiendo contener mucha más melatonina que la sangre (Bubenik *et al.*, 1996). En 1975, Raikhlin *et al.* encontraron melatonina en tejidos del tracto gastrointestinal y, un año más tarde, la localizaron en las células enterocromafines de la mucosa digestiva (Raikhlin y Kvetnoy, 1976), en la que también están presentes las enzimas AA-NAT e HIOMT y donde, al parecer, se produce. Se ha detectado melatonina en todos los segmentos del tracto digestivo de peces teleósteos (Bubenik y Pang, 1997). La ingesta de alimento, especialmente de triptófano, parece estimular la producción de melatonina en el digestivo (Lepage, 2005a) pero además, en mamíferos, la ingesta de melatonina y la melatonina de origen pineal también provocan acumulación de melatonina en el tracto gastrointestinal (Poeggeler *et al.*, 2005; Bubenik, 2002).

La función de la melatonina en el digestivo se relaciona con la regulación del tránsito intestinal, reduciendo la motilidad (Barajas-López *et al.*, 1996), y con la absorción de nutrientes (Motilva *et al.*, 2001). Además, el aumento en la concentración de melatonina en respuesta al alimento, puede encarrilar la secuencia de los procesos digestivos esenciales para el mejor aprovechamiento de la alimentación, mientras que el aumento producido por el ayuno, puede iniciar la reducción general de la actividad del tracto digestivo (Bubenik *et al.*, 1996). Por otro lado, la melatonina es un potente antioxidante que puede prevenir el deterioro provocado por radicales libres en los procesos de digestión (Reiter *et al.*, 2000).

5. SALIDAS DEL MARCAPASOS CIRCADIANO: CORTISOL

El marcapasos circadiano también controla los ritmos diarios de temperatura y de secreción hormonal (Kriegsfeld y Silver, 2006). Entre las diversas funciones endocrinas que controla, se encuentran la síntesis de esteroides sexuales, insulina, cortisol, etc. La regulación de estas hormonas es compleja, participando en ella numerosos factores nerviosos y humorales.

En el caso del cortisol, su síntesis sigue un patrón cíclico diario, pero también puede activarse ante circunstancias de estrés, movilizando energía (libera glucosa) y favoreciendo que el organismo pueda satisfacer su mayor demanda metabólica (Mommsen *et al.*, 1999). El cortisol es el principal corticosteroide en peces y se secreta en las células interrenales, a través de la activación del eje HPI (hipotálamo-pituitaria-interrenal) (Wendelaar Bonga 1997). El control circadiano de su secreción sugiere la existencia de un mecanismo oscilatorio (Schibler y Brown, 2005; Oster *et al.*, 2006) asociado al fotoperiodo y a la alimentación, observándose mayores niveles de cortisol durante el final de la fase de reposo y durante toda la primera parte de la fase activa del individuo (Weitzmann *et al.*, 1971), así como en los momentos próximos a la hora de la alimentación (Spieler y Noeske, 1984; Boujard y Leatherland, 1992).

La secreción de cortisol al torrente circulatorio es controlada por un neuropéptido hipotalámico, el factor liberador de la corticotropina (CRF), que estimula la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) desde la pituitaria anterior. La ACTH, a su vez, actúa sobre las células interrenales para provocar la secreción de cortisol (Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen *et al.* 1999). Existe un control mediante retroalimentación negativa del cortisol a nivel de hipotálamo y pituitaria (Mommsen *et al.*, 1999). Aunque el CRF y la ACTH constituyen la vía principal de control de la secreción de cortisol, las células interrenales también pueden ser estimuladas o moduladas por una variedad de hormonas y neuropéptidos, incluidos la hormona estimuladora α -melanófora, la hormona de crecimiento y la urotensina I (Sumpter, 1997; Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen *et al.*, 1999).

Asimismo, existen indicios de una posible conexión entre el eje HPI y la actividad serotoninérgica y melatoninérgica, sin que se sepa el mecanismo exacto por el que se relacionan. De hecho, se ha observado correlación entre la actividad serotoninérgica y los niveles de ACTH (Höglund *et al.*, 2001) y cambios dosis-dependientes en el cortisol circulante provocados por la administración de un agonista del receptor de serotonina (Winberg *et al.*, 1997; Höglund *et al.*, 2002). Además, el incremento de serotonina parece contrarrestar el aumento de cortisol inducido por estrés (Lepage *et al.*, 2005b). Por otro lado, en mamíferos, la melatonina también parece contrarrestar el incremento de cortisol bajo condiciones de estrés, bien a través de sus efectos a nivel del hipotálamo (Xu *et al.*, 1995) o bien mediante una acción directa sobre las glándulas adrenales, inhibiendo su secreción (Rao *et al.*, 2001). A su vez, las catecolaminas también pueden influenciar la producción de melatonina (Lynch y Deng, 1986).

6. RITMOS MANIFIESTOS

Los marcapasos circadianos controlan los patrones de actividad y reposo de las especies, que suelen estar fijados genéticamente. En función de la fase del fotoperiodo en la que las especies se encuentran activas, se clasifican en: nocturnas, diurnas o crepusculares. Pero además, determinadas especies pueden mostrar un comportamiento diurno durante un determinado estadio de su desarrollo, en una época del año, a determinadas temperaturas, etc. mientras que esta misma especie puede tener un patrón de actividad nocturno, cuando su fase de desarrollo o las condiciones varían. En este caso, se dice que las especies muestran un comportamiento dual.

En especies de comportamiento dual es frecuente encontrar que, durante el invierno, su patrón de actividad se hace preferentemente nocturno. A pesar de que las condiciones exactas que causan las inversiones permanecen todavía sin elucidar, se ha propuesto que esto ocurre como estrategia de supervivencia, para evitar ser percibidos por depredadores homeotermos (aves o mamíferos). Debido a que los peces son animales poiquilotermos, las temperaturas bajas ralentizan su metabolismo, haciéndoles más vulnerables a depredadores que sí mantienen su temperatura corporal constante (Fraser *et al.*, 1993; Fraser *et al.*, 1995). Además, la elección entre desarrollar comportamiento diurno o nocturno puede estar también influenciada por la competencia, la intensidad de luz, o la disponibilidad de alimento y se ha observado que individuos en los que aumentaba la necesidad de alimentarse (como salmones que se preparan para la migración al mar) eran más diurnos, asumiendo el riesgo de la depredación (Metcalf *et al.*, 1998, Johnston *et al.*, 2004).

En general, los patrones circadianos en peces teleósteos presentan una variabilidad notable entre especies, e incluso entre individuos de la misma especie. Además, el comportamiento dual es bastante frecuente. En este sentido, se ha escrito mucho sobre la plasticidad de los ritmos circadianos en peces, observándose por lo general, patrones de actividad más estrictos en especies marinas (Reebs, 2002).

Sin embargo, a pesar de esta plasticidad, la alteración de los correspondientes patrones de actividad (mediante condiciones de iluminación a horarios aleatorios, suministro de alimentación irregular, etc.) tiene implicaciones en el crecimiento, en la eficiencia alimentaria (Bolliet *et al.*, 2001a) o en la reproducción (Allison, 1951; Bromage *et al.*, 2001), y probablemente también en el sistema inmune de los peces (Esteban *et al.*, 2006).

Debido a que los marcapasos circadianos generan un comportamiento rítmico de los ciclos de actividad y reposo, el estudio de los marcapasos puede llevarse a cabo, por tanto, a través del estudio de estos ciclos de actividad y reposo o ritmos manifiestos, por ejemplo de la actividad locomotora o de la alimentaria.

6.1. Ritmos locomotores

La actividad locomotora es una manifestación del marcapasos circadiano que, en peces mantenidos en laboratorio, se registra generalmente mediante la cuantificación de las interrupciones de un haz de luz infrarrojo que atraviesa el acuario. El fotoperiodo, la disponibilidad de alimento, las interacciones sociales, la temperatura, etc. pueden sincronizar los patrones de actividad locomotora.

El estudio de los ritmos circadianos y su sincronización por la luz, se lleva a cabo mediante registro de actividad locomotora bajo ciclos luz-oscuridad (LD) de distintas duraciones, oscuridad constante (DD) o iluminación constante (LL). También mediante la aplicación de ciclos ultradianos (LD) que en peces parecen estabilizar el funcionamiento de su sistema circadiano (Ericsson y Van Veen, 1980; Sánchez-Vázquez *et al.*, 1996). Para evitar que el alimento pueda influir en los resultados, actuando como sincronizador, los animales deben permanecer bajo condiciones de ayuno, o bien con alimentación siempre disponible (mediante comederos autodemanda) o suministrada a intervalos irregulares (mediante comederos automáticos).

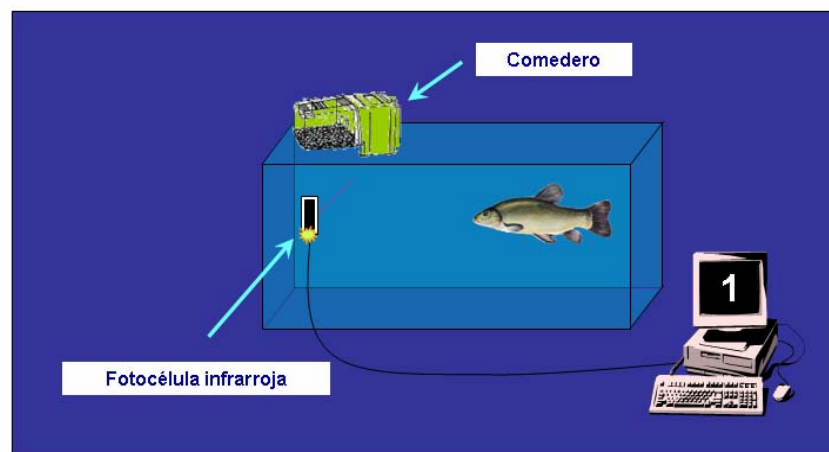


Fig. 4. Método para el estudio de la actividad locomotora en peces, a través de una fotocélula infrarroja. Para estudiar la sincronización a la luz, se modifica la duración de los ciclos LD. En estos experimentos, los animales deben permanecer bajo condiciones de ayuno, o bien con alimentación siempre disponible (mediante comederos autodemanda) o suministrada a intervalos irregulares (mediante comederos automáticos).

La luz ejerce un efecto sincronizador sobre el LEP de las especies, interviniendo en sus ciclos de actividad y reposo, y pudiendo generar actividad anticipatoria al encendido o al apagado de las luces (Reebs, 2002).

El efecto sincronizador de la luz se advierte cuando se adelanta o retrasa el ciclo luz-oscuridad por unas horas, y se observa que el animal tarda varios ciclos en encarrilar su actividad al nuevo horario. En roedores, se observa que tras 6 horas de adelanto o retraso del fotoperiodo, pasan 3-4 días hasta que ajustan de nuevo su marcapasos. Sin embargo en peces, por lo general este periodo se acorta a un día (Godin, 1981; Tabata *et al.*, 1989; Sánchez-Vázquez *et al.*, 1995b), si bien hay excepciones como los 2-3 días observados en *Notemigonus crysoleucas* (Laguë y Reebs, 2000), o los 7-13 días que tarda *Eptatretus burgeri* hasta que se encarrila completamente tras adelantar doce horas el ciclo de luz-oscuridad (Ooka-Souda *et al.*, 1985). Esto parece indicativo de que el sistema circadiano de la mayoría de los peces es poco robusto, o bien es fácilmente enmascarable por la luz (Reebs, 2002).

La actividad locomotora anticipando eventos diarios regulares, como la llegada de la noche, del día (Helfman, 1986) o del horario regular de alimentación, ha sido ampliamente estudiada (Boujard y Leatherland, 1992; Spieler, 1992; Mistlberger, 1994, Reebs, 2002). En estos casos, se detecta un incremento de la actividad locomotora de aproximadamente 2,5 veces por encima de la actividad media de referencia, que se mantiene sin inflexiones durante el tiempo previo al evento (Stephan, 1997; Aranda *et al.*, 2001a).

A su vez, se puede actuar sobre el marcapasos circadiano a través de la actividad locomotora. De esta manera, en mamíferos se ha observado que la actividad locomotora realizada al comienzo de la fase activa, ejerce una retroalimentación sobre el marcapasos para avanzar su fase, mientras que si se realiza al final de la fase activa, induce un retraso (Reebs y Mrosovsky, 1989).

Por otra parte, el estudio de otros sincronizadores distintos a la luz sobre el comportamiento locomotor de las especies, se realiza bajo condiciones de iluminación constante, generalmente en LL o DD.

6.2. Ritmos alimentarios

Conocer los ritmos de alimentación de una especie es de gran interés en acuicultura, puesto que la administración de alimento durante la fase contraria a la propia de alimentación de la especie puede conducir a un peor rendimiento de la eficiencia alimentaria, revirtiendo en un menor crecimiento y un aumento de la contaminación de las aguas por alimento no ingerido (Madrid *et al.*, 2001; Bolliet *et al.*, 2001a). Además la duración del fotoperiodo puede influir también en la cantidad de alimento ingerido, y en salmónidos se ha observado que duraciones mayores de la fotofase estimulan la ingesta alimentaria (Saunders, *et al.*, 1989; Stefanson *et al.*, 1990; Jørgensen y Jobling, 1992).

Al igual que los patrones de actividad locomotora, los patrones de actividad alimentaria presentan una elevada variabilidad intra e inter-específica, que no siempre coinciden con la fase en la que el pez desarrolla su actividad locomotora (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1996).

El estudio de los ritmos de alimentación voluntaria en peces, se lleva a cabo mediante comederos autodemanda activados por el propio pez, quedando registrada cada demanda efectuada (Rozin y Mayer, 1961; Landless, 1976). También mediante el registro de las interrupciones de un haz de luz o de una antena de *PIT tag*, ubicados en la zona donde se suministra la comida. En este caso, no se obtiene una medida directa de la actividad alimentaria o de la motivación por comer, sino más bien una medida de actividad locomotora relacionada con la alimentación (Reebs, 2002). Otro método para estudiar los ritmos voluntarios de alimentación, es la cuantificación regular del alimento no consumido bajo un régimen periódico de suministro de comida, para comparar la fase del fotoperiodo en la que el desperdicio es menor y por tanto, la ingesta mayor. Sin embargo, los animales pueden sincronizarse con el horario regular de alimentación (Sánchez-Vázquez, *et al.*, 1997) y en tal caso, este método no sería eficaz para proporcionar información sobre los ritmos voluntarios de alimentación.

Por otro lado, demostrar que el alimento está actuando como sincronizador, influyendo sobre el marcapasos circadiano, serviría para demostrar el carácter endógeno de los ritmos de actividad alimentaria. En este tipo de experimentos se estudia la persistencia del ritmo de alimentación y la sincronización al alimento, en ausencia de sincronizadores externos. Además, para tal fin, también se puede estudiar la persistencia de los ritmos de alimentación bajo un ciclo LD de periodo diferente al horario regular de alimentación, por ejemplo en el rango ultradiano. Cuando

los animales sincronizan su actividad con el horario regular de alimentación, pueden desarrollar una actividad motora y fisiológica anticipatoria al alimento, que persiste en condiciones de iluminación constante e incluso en ayuno (Stephan, 1984). El desarrollo de actividad anticipatoria al alimento (FAA) y su persistencia al aplicar condiciones de ayuno, son igualmente indicativos de que están interviniendo mecanismos endógenos. De esta manera se ha comprobado la existencia de componente endógeno del ritmo de alimentación en especies como lubina (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1995a) y otras (Reebs, 2002). Puesto que el alimento genera una sincronización del componente endógeno, así como de las salidas del comportamiento alimentario, se dice que actúa a la vez como entrada y como salida del marcapasos circadiano.

6.3. Interacciones sociales y ritmos

Los grupos de peces, especialmente en determinadas especies como trucha alpina o salmón, se organizan en un orden de jerarquía que evita conflictos en el reparto de los recursos. Estas jerarquías se forman tras enfrentamientos, en los que los peces dominantes suelen ser los individuos más agresivos y grandes (Noakes, 1980), mientras que los individuos subordinados presentan tasas de crecimiento menores (Abbot y Dill, 1989), probablemente debidos a una menor ingesta de alimento y a un mayor estrés (Noakes y Leatherland, 1977; Ejike y Schreck, 1980).

Durante los enfrentamientos, el nivel de cortisol en plasma aumenta en todos los individuos. Posteriormente, aunque existe discrepancia a este respecto, parece ser que en los peces vencedores o dominantes, el cortisol decrece rápidamente (en 3 horas) al nivel de peces control no estresados, mientras que en peces subordinados continúa elevado (Øverli *et al.*, 1999a; 1999b), pudiendo generar estrés crónico.

Los niveles de cortisol elevado crónicos tienen un efecto negativo en el apetito, la tasa de crecimiento y la eficiencia alimentaria (Gregory y Wood, 1999). Además, en la pineal de trucha se ha comprobado que existen receptores de glucocorticoides y que los glucocorticoides pueden llegar a modular la producción de melatonina (Benyassi *et al.*, 2001). Asimismo, los niveles de cortisol y melatonina del individuo se ven afectados según la posición social que ocupe dentro de las jerarquías formadas (Larson *et al.*, 2004).

Quizá esta relación entre cortisol y melatonina explique las inversiones de fase en los ritmos biológicos, donde los individuos más dominantes desplazan la actividad de los individuos

subordinados a horas del día más desfavorables para su supervivencia. Este efecto se ha observado en varias especies de peces, como trucha alpina y trucha arcoiris (Alanärä y Brännäs, 1997; Chen *et al.*, 2002), y además se ha comprobado que se acrecienta cuanto mayores son los requerimientos energéticos de los individuos dominantes (Alanärä *et al.*, 2001).

También se ha comprobado que la actividad serotoninérgica cerebral, medida por el índice 5-HIAA/5-HT, incrementó en el cerebro de individuos subordinados de trucha alpina tras interactuar con peces dominantes. Este índice permaneció elevado durante más de 21 días, debido a los altos valores encontrados de 5-HIAA (que es el producto final de la degradación de la serotonina), mientras que la concentración de serotonina cerebral (5-HT) no mostró variaciones. Por el contrario, en peces dominantes el 5-HIAA incrementó en el tronco encefálico, pero disminuyó a niveles control tras dos días desde la interacción (Winberg y Nilsson, 1993a).

Los estudios que relacionan las interacciones sociales y los ritmos biológicos, se suelen llevar a cabo empleando comederos a demanda con peces a los que se les incorpora un *PIT tag* de identificación individual. De esta manera, se observa cómo los comederos son activados habitualmente por 1-4 peces dominantes. Existe además un grupo de individuos subdominantes que también activan los comederos, pero en horarios diferentes que los dominantes, invirtiendo sus ritmos alimentarios. Por otra parte aparece un gran número de peces subordinados que no activan el comedero, y que muestran un crecimiento menor, que también puede ser debido a mayores niveles de estrés (Alanärä y Brännäs, 1996).

7. AUTOSELECCIÓN DIETARIA

En un principio, los comederos autodemanda se emplearon casi exclusivamente para el estudio de los ritmos biológicos. Posteriormente, surgieron nuevas aplicaciones, entre ellas la de realizar estudios sobre las preferencias dietarias de los animales, ofreciendo varios comederos que contenían distintas proporciones de los macronutrientes: proteína, grasa y carbohidratos.

De esta manera, la autoselección de dietas permite conocer de una manera sencilla las preferencias nutricionales de los peces, lo que ayuda a diseñar dietas que mejoren el índice de conversión y la rentabilidad del cultivo (Rubio *et al.*, 2003). Por esta razón, estos experimentos son particularmente interesantes para caracterizar las preferencias nutricionales en especies diferentes, o bien en una misma especie cuyos requerimientos nutricionales puedan variar a lo largo de sus

estadios de desarrollo (durante la esmoltificación, la época de puesta...), de las estaciones del año (en el caso de altas latitudes, existen grandes diferencias de temperatura y fotoperiodo entre el invierno y el verano, que modifican los requerimientos nutricionales de las especies), etc.

Se han estudiado los patrones de selección de diversas especies de peces utilizando comederos autodemanda, como en el carpín (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1998a), la trucha (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1999), la lubina (Aranda *et al.*, 2001b; Rubio *et al.*, 2003) o el sargo picudo (Torrejón Atienza *et al.*, 2004; Vivas *et al.*, 2006), entre otras. La proteína es el macronutriente más demandado en todas ellas (con excepción del carpín dorado), y algunos resultados sugieren la existencia de un mecanismo de regulación de este macronutriente (Vivas *et al.*, 2006; Almaida-Pagán *et al.*, 2006).

Además, se ha descrito una distribución temporal de selección de macronutrientes en el carpín dorado, que demandaba carbohidratos durante el periodo de iluminación, proteína al principio de la fase de oscuridad y grasa en los periodos de transición (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1998a). Se han desarrollado estudios sobre la selección realizada en el periodo de recuperación tras un ayuno de 6 días, que en lubina no modifica el patrón de selección (Aranda *et al.*, 2001b). Y se han llevado a cabo estudios sobre la privación selectiva de macronutrientes, que demuestran que los peces necesitan como mínimo dos macronutrientes para regular su ingesta energética, incluyendo en todos los casos la grasa (Rubio *et al.*, 2005).

Recientemente, para el estudio de la autoselección en peces también se han empleado cápsulas de gelatina de colores que contienen diferentes macronutrientes (Rubio *et al.*, 2003). El empleo de cápsulas elimina la influencia de las propiedades organolépticas de los macronutrientes en la selección dietaria. Además, permite suministrar a los peces vía oral determinadas sustancias y hormonas como serotonina o melatonina, y estudiar su efecto en la selección de macronutrientes (Rubio *et al.*, 2004a; Rubio *et al.*, 2006).

Aún así, el número de estudios de autoselección dietaria en peces es escaso, a pesar de que ha demostrado ser una herramienta de gran utilidad para el estudio de los requerimientos nutricionales de los animales. En este sentido, existe por ejemplo una carencia total de estudios sobre la influencia de las interacciones sociales en la selección de macronutrientes, se desconoce si existen preferencias dietarias de cada individuo del cardumen, o cómo contribuirían éstas a la selección final del grupo. Por este motivo, se plantea una nueva metodología que consiste en

combinar el uso de marcaje individual mediante *PIT tag* con comederos autodemanda que contengan distintas dietas de macronutrientes (Fig. 5).

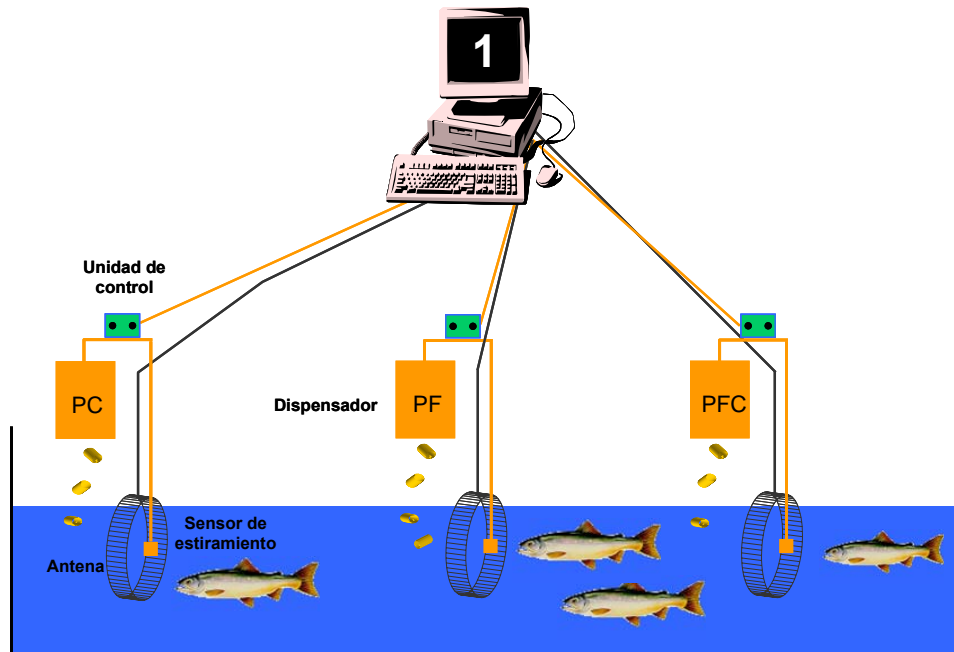


Fig. 5. Esquema de la metodología propuesta para estudiar la autoselección dietaria de peces individuales mantenidos en grupo. Los peces están marcados individualmente mediante *PIT tags*, que son reconocidos por las antenas próximas a cada comedero, quedando un registro en el ordenador para identificar el individuo que ha activado el mecanismo. Cada uno de los comederos contiene distintas dietas de macronutrientes, que combinadas entre sí pueden proporcionar una dieta balanceada (P = proteína, C = carbohidratos, F = lípidos).

8. BIOLOGÍA DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS

8.1. Tenca, *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758)

La tenca pertenece a la familia de los ciprínidos. Su cuerpo es alargado y comprimido lateralmente, con pequeñas escamas profundamente insertadas. Es de color verde oliva con reflejos dorados en la zona del abdomen y sus ojos son de color naranja brillante. Posee boca protáctil con labios gruesos y una serie de 5 dientes faríngeos por lado. Presenta barbillones y aletas grandes y redondeadas. La secreción mucosa que recubre su cuerpo la hace muy resistente a aguas ácidas, ligeramente salobres o contaminadas. También es muy resistente a bajas concentraciones de

oxígeno. En casos excepcionales puede llegar a una longitud máxima de 70 cm y 7 kg de peso. Vive aproximadamente 10 años.

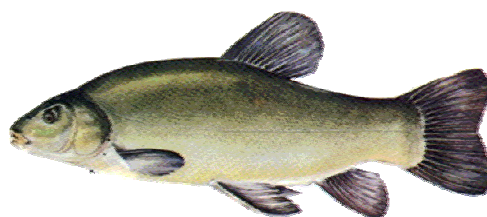


Fig. 6. Dibujo de un ejemplar de tenca (*Tinca tinca*).

Es una especie omnívora que habita cursos tranquilos de agua dulce, con vegetación abundante y fondos fangosos. Vive formando cardúmenes y su distribución se extiende por toda Europa (excepto norte de Escandinavia y Escocia), oeste de la Península Balcánica, Asia y África.

Presenta dimorfismo sexual con fecundación externa y alcanza la madurez sexual a los 3 años, en el caso de los machos y a los 4 años, en el caso de las hembras. El desove se produce de mayo a agosto, cuando las temperaturas superan los 18°C, en varias puestas con intervalos de aproximadamente 14 días y 13.000-45.000 huevos por puesta.

Es de hábitos nocturnos (Siegmund, 1969) y en la época invernal se encuentra en estado de semiletargo.

Es presa de *Esox lucius* y *Micropterus salmoides*. Dos de las patologías que más impacto han tenido en las poblaciones de tenca son la septicemia hemorrágica bacteriana (por *Aeromonas punctata*) y la viremia primaveral (por *Rhabdovirus*). Su apreciado sabor y su alto valor comercial hacen que su cultivo sea atractivo.

8.2. Trucha alpina o *Arctic charr*, *Salvelinus alpinus* (Linnaeus, 1758)

Pertenece a la familia de los salmónidos. Su cuerpo es fusiforme, con una aleta caudal ligeramente ahorquillada. Presenta gran variedad de coloraciones dependiendo de la localización, estación del año, estadio de maduración y hábitat. En términos generales su cuerpo es verde, marrón o plateado, con puntos rojos o rosados en el lomo, y vientre claro. La trucha alpina crece hasta los 60 cm y puede llegar a vivir más de 24 años.

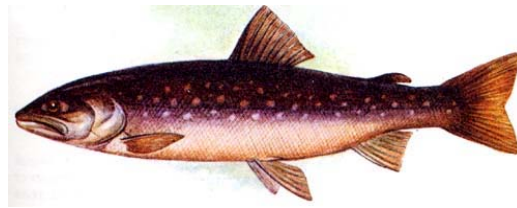


Fig. 7. Dibujo de un ejemplar de trucha alpina o *Arctic charr* (*Salvelinus alpinus*).

Es una especie anádroma, que migra a los ríos y lagos para desovar y habita las zonas más septentrionales del hemisferio norte. Sus poblaciones se extienden por Escandinavia, Islandia, Groenlandia, el norte de América y los Alpes. También existen poblaciones que permanecen toda su vida en agua dulce, en las que es común la aparición de individuos enanos con un tamaño de 8 cm en su edad adulta, debido a la alta competitividad existente y a los recursos limitados de los lagos árticos. Se alimenta de anfibios, insectos, crustáceos, moluscos y peces planctónicos.

Las hembras anádromas desovan en septiembre y octubre, y producen entre 3.000 y 5.000 huevos cada 2 o 3 años. Los huevos se entierran en la grava. Eclosionan en primavera, pero las crías permanecen en el lecho de grava durante algunos meses hasta que desaparece el hielo. En poblaciones anádromas, los jóvenes migran al mar cuando tienen 5 o 7 años de vida.

La trucha alpina presenta un patrón de actividad dual, con determinados individuos diurnos y otros nocturnos, en iguales condiciones de experimentación. Además, éstos individuos pueden sufrir inversiones en los patrones de actividad (Alanärä y Brännäs, 1997).

Se ve afectada por diversas enfermedades bacterianas y víricas como la necrosis pancreática infecciosa. A pesar de ello, continúa siendo una especie de creciente interés en la acuicultura del Norte de Europa, debido a que su demanda en el mercado no se satisface con los niveles actuales de producción.

8.3. Lubina, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758)

La lubina es una especie marina que pertenece a la familia Moronidae. Su cuerpo fusiforme y una aleta caudal fuerte, le confieren una fisionomía bien adaptada a la natación. Presenta una

coloración plateada, de un gris más oscuro en la parte dorsal, y una mancha negra sobre el opérculo. Puede llegar a medir hasta 90 cm.



Fig. 8. Dibujo de un ejemplar de lubina (*Dicentrarchus labrax*).

Se distribuye por las costas orientales del Océano Atlántico, desde Noruega hasta Senegal, así como por todo el Mediterráneo y el Mar Negro. Presenta una alta tolerancia a variaciones de temperatura y salinidad del agua. Habita en las zonas litorales, en fondos arenosos, rocosos o de guijarros, en profundidades que van desde los 100 a los 10 metros, emigrando a aguas profundas en épocas invernales y a aguas más someras cuando las temperaturas aumentan, llegando a encontrarse ocasionalmente en cursos de agua dulce. Su comportamiento social varía en función de su edad, mostrando un comportamiento más gregario cuando son más jóvenes. Se alimenta de otros peces, de pequeños crustáceos y de moluscos.

La época de puesta es en invierno y principios de primavera, llegando a los 150.000 huevos por kg de hembra.

La lubina se ha descrito como una especie de comportamiento dual (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1995b), con variaciones entre individuos, los cuales además, pueden sufrir inversiones de comportamiento en cortos periodos de tiempo en el laboratorio (Aranda *et al.*, 1999a). En condiciones ambientales naturales, durante el invierno presentan un comportamiento predominantemente nocturno, al contrario que en verano (Bengout Anras, 1995). Estudios en laboratorio demostraron que, cuando el alimento se restringe a 4 horas al día, algunos individuos invierten consecuentemente sus ritmos de actividad al horario de alimentación (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1995a), sugiriendo que las variaciones estacionales de disponibilidad de alimento influyen en las inversiones estacionales de la especie (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1998b).

La lubina puede sufrir patologías debidas a parásitos (como el protozoo *Cryptocaryon*), a bacterias (como *Pasteurella piscicida*), o a virus (como la necrosis pancreática infecciosa causada por birnavirus, o la encefalopatía y retinopatía viral causada por nodavirus).

Presenta un alto valor comercial, y en los últimos años se ha convertido en una de las especies de mayor interés en la acuicultura mediterránea.



II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido el de profundizar en los conocimientos sobre ritmos biológicos y comportamiento alimentario de tres especies de peces teleósteos de interés en acuicultura; una especie dulceacuícola, la tenca (*Tinca tinca*); una marina, la lubina (*Dicentrarchus labrax*) y una anádroma del norte de Europa, la trucha alpina (*Salvelinus alpinus*).

Para ello, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la existencia de un componente endógeno en los ritmos diarios de actividad motora de la tenca.
2. Analizar la sincronización a la luz en los ritmos diarios de actividad motora en la tenca, comprobando la influencia de la duración del fotoperiodo y la intensidad lumínica.
3. Investigar los ritmos diarios de actividad alimentaria en la tenca mediante comederos de auto-demanda. Establecer el papel del horario de alimentación como sincronizador de los ritmos de actividad locomotora.
4. Ensayar una nueva metodología basada en el marcaje individual de peces mediante *PIT tag* combinado con la alimentación a demanda, para estudiar la selección dietaria individual en grupos de truchas alpinas.
5. Analizar si la suplementación dietaria de triptófano (precursor en la biosíntesis de serotonina y melatonina), modifica las concentraciones de serotonina plasmática y de melatonina gastrointestinal y plasmática en la lubina.
6. Determinar si la suplementación dietaria de melatonina modifica las concentraciones de melatonina gastrointestinal y plasmática en la lubina.
7. Comprobar la influencia del suplemento dietético de triptófano y de melatonina en el cortisol plasmático y en los ritmos de actividad en lubina.



III. CAPÍTULOS EXPERIMENTALES

III. CAPÍTULOS EXPERIMENTALES

1. SINCRONIZACIÓN POR LA LUZ DE LOS RITMOS CIRCADIANOS DE ACTIVIDAD EN LA TENCA (*Tinca tinca*)

M.J. Herrero, J.A. Madrid y F.J. Sánchez-Vázquez

Universidad de Murcia. Departamento de Fisiología. Facultad de Biología. 30100 Murcia.

1.1. Resumen

En este artículo se analizan los ritmos de actividad locomotora de la tenca (*Tinca tinca*). Para ello, se llevaron a cabo tres experimentos con 24 animales, de 20 g de peso corporal, mantenidos por parejas en acuarios de 60 litros. En cada tanque, unos sensores infrarrojos conectados a un ordenador, sirvieron para registrar los movimientos de los peces en todo momento. El primer experimento fue diseñado para estudiar el marcapasos circadiano bajo condiciones de curso libre (pulsos ultradianos LD 40':40', y DD) y tras invertir el ciclo LD. Los resultados obtenidos demuestran que la tenca presenta un patrón de actividad estrictamente nocturno, con un ritmo endógeno evidente en el 45,8% de los peces analizados. En el segundo experimento se analizó la influencia de distintos fotoperiodos (LD 6:18, 12:12, 18:6 y 22:2) en la actividad locomotora. Los resultados mostraron que la actividad de la tenca está restringida a las horas de oscuridad, incluso bajo fotoperiodos extremadamente largos. El tercer experimento examinó el efecto de la intensidad lumínica en los ritmos de actividad locomotora. Al exponer a los peces a intensidades lumínicas decrecientes (300:0 lux, 30:0 lux, 3:0 lux y 0,3:0 lux), manteniendo un fotoperiodo constante (LD 12:12), se comprobó que, en todos los casos, el mayor porcentaje de actividad locomotora se daba durante las horas de completa oscuridad (0 lux). En resumen, los resultados muestran claramente que: (a) la tenca es una especie de comportamiento estrictamente nocturno; y (b) sus ritmos de actividad diaria se sincronizan paulatinamente tras invertir el ciclo LD y persisten bajo condiciones de curso libre, señalando así su naturaleza circadiana. No obstante, la luz ejerce una poderosa influencia sobre los ritmos de actividad, ya que (c) la duración de la fase activa está controlada directamente por la fotofase; y (d) la conducta estrictamente nocturna persiste aun bajo condiciones de luz muy tenue (0,3 lux). Estos hallazgos aumentan el conocimiento que se tiene del

comportamiento de la tenca y pueden ser de ayuda para la gestión en acuicultura de esta especie, por ejemplo, adaptando las estrategias de alimentación a su conducta nocturna.

Palabras clave: actividad locomotora, ritmo endógeno, marcapasos circadiano, ritmo circadiano, ritmo diario, sincronización, curso libre, fotoperiodo, intensidad lumínica, comportamiento, patrón de actividad nocturna, *Tinca tinca*.

1.2. Introducción

Los ritmos biológicos forman parte del proceso de adaptación de los seres vivos al ambiente. Su importancia estriba en que ajustan los procesos internos con los cambios periódicos externos, preparando así al organismo para situaciones predecibles y repetitivas (Aschoff, 1981). Se sabe que el patrón rítmico diario de la actividad locomotora de los peces se sincroniza a través del ciclo de luz-oscuridad (LD) (Thorpe, 1978).

Para examinar el carácter endógeno de los ritmos de actividad locomotora, se suele aislar a los animales de cualquier estímulo temporal externo mediante el uso de oscuridad constante (DD), luz constante (LL) o pulsos LD ultradianos: son las llamadas “condiciones de curso libre”. El uso de pulsos LD ultradianos se debe a que, en estudios anteriores con peces, este ciclo LD ha demostrado ser un factor estabilizador que impide la disociación rápida de múltiples osciladores circadianos (Ericsson y Van Veen, 1980; Sánchez-Vázquez *et al.*, 1996; Sánchez-Vázquez *et al.*, 1998b).

El periodo endógeno (*tau*) que muestran los vertebrados superiores bajo condiciones de curso libre, es muy estable y constituye una de las características de los ritmos circadianos. Sin embargo, los peces poseen un sistema circadiano más flexible, pudiendo mostrar dualidad de fase (dualismo nocturno/diurno) e inestabilidad de *tau* (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1995b). Como la duración del periodo de los ritmos circadianos de curso libre suele ser diferente de 24 horas, los organismos ajustan sus marcapasos internos en función de estímulos temporales externos, tales como la disponibilidad de comida, la luz o los cambios diarios de temperatura; si bien la luz es el sincronizador (“*zeitgeber*”) de mayor importancia en la mayoría de los casos (Ali, 1992).

Conocer en profundidad los ritmos de las diferentes especies de peces puede ser de utilidad para mejorar la gestión de las pesquerías y la práctica de la acuicultura. No obstante, la información

disponible sobre los ritmos locomotores de los peces es limitada, y todavía existe controversia acerca de si las distintas especies muestran ritmos diurnos, nocturnos, crepusculares, o patrones mixtos. Es más, en muchos casos no queda claro en absoluto si los ritmos diarios son inducidos externamente por el ciclo LD o por un marcapasos circadiano interno (Iigo y Tabata, 1996).

La tenca (*Tinca tinca*) es un ciprínido cuya consideración como especie de cultivo aumenta día a día en la cría de peces de agua dulce, un mercado dominado por la trucha arcoiris. Los consumidores aprecian su buen sabor y es muy valorada tanto en la pesca recreativa como en acuariofilia. Sus hábitos de alimentación no están muy especializados y, a pesar de que sus tasas de crecimiento no son especialmente elevadas, presenta valores reproductivos altos. Además, su alto contenido en ácidos grasos poli-insaturados hace que esta especie sea especialmente indicada para el consumo humano.

Aunque Siegmund (1969) ya observó que la actividad de las tencas se producía sobre todo de noche, y durante el día tendían a esconderse en el fondo, se sabe muy poco acerca de la organización circadiana de esta especie. El objetivo de nuestro estudio fue analizar la actividad locomotora de la tenca (*Tinca tinca*), así como los factores que controlan su ritmicidad locomotora diaria; y determinar el carácter endógeno de dicho ritmo. Para ello, se registró la actividad locomotora de los peces bajo condiciones de curso libre (pulsos LD ultradianos y DD), y se realizaron estudios de resincronización tras la inversión de los ciclos LD. Asimismo, se investigó la sincronización a la luz mediante su exposición a fotoperiodos de distinta duración (LD 18:6; 12:12; 6:18 y 2:22) y distintas intensidades lumínicas (300, 30, 3, 0,3 lux) sobre los ritmos de actividad diaria.

1.3. Material y métodos

Animales e infraestructura

Este estudio se llevó a cabo en un laboratorio de Cronobiología de la Universidad de Murcia bajo condiciones ambientales estrictamente controladas, dentro de una cámara completamente aislada. En total, se estudiaron 24 tencas de aproximadamente 20 g de peso corporal, procedentes del Centro de Acuicultura “Las Vegas del Guadiana” (Badajoz, España). Los peces se colocaron por parejas en acuarios de 60 litros de agua dulce, permitiendo que se aclimataran antes de empezar el

experimento. Los acuarios disponían de un filtro individual, un difusor de oxígeno y tres tubos de PVC (32 mm de diámetro, 200 mm de largo) dispuestos de modo que formaban un refugio triangular. Encima de todos los tanques, unos tubos de luz fluorescente (15 W, GRO-LUX, Sylvania, Alemania) proporcionaban una intensidad lumínica media de 300 lux a nivel de la superficie del agua. Se controló el fotoperiodo de forma automática mediante un reloj digital programable (Datamicro, Orbis, España). Se mantuvo la temperatura del agua en 20°C manteniendo estable la temperatura de la habitación con un termostato electrónico, con fluctuaciones de apenas $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ entre el día y la noche.

Se proporcionó alimento (un 1% de su peso corporal) a los ciprínidos una vez al día, a intervalos irregulares, mediante un comedero automático para impedir que cualquier rutina periódica pudiera actuar como sincronizador. Se limpió el acuario cada 3 ó 4 días, eliminando las heces y los gránulos restantes con un sifón; para no interferir con los registros, esta acción se realizaba en las horas de luz, cuando los peces no estaban activos sino, habitualmente, escondidos en los tubos de PVC. Cada dos semanas, se sustituyó el 20% del volumen de agua. Para asegurar las condiciones de aislamiento y evitar que los peces se vieran entre sí, los laterales de los tanques se cubrieron con plástico negro. Frente a cada acuario, a 10 cm del fondo y 7 cm de la pared lateral, se instalaron fotocélulas de infrarrojos (Omron, E3S-AD62, Japón). Cuando un pez nadaba en este área y atravesaba el haz de luz, se generaba una señal que quedaba registrada en el ordenador, con una frecuencia de almacenamiento de datos de 1 cada 10 minutos.

Procedimiento experimental

Se diseñaron tres experimentos para profundizar en el conocimiento de los ritmos de actividad diaria de las tencas, su naturaleza circadiana, así como su sincronización a la luz, siendo utilizados los mismos peces en los tres experimentos:

- Ritmos diarios de origen endógeno

Se registraron los ritmos diarios de actividad motora bajo un ciclo LD 12:12 (luces encendidas a las 8:00 h y apagadas a las 20:00 h), hasta que las tencas desarrollaron un patrón diario bien definido. Para estudiar la resincronización tras invertir el ciclo LD, se cambió a DL durante 11 días, doblando una de las fases de luz (luces encendidas a las 20:00 h y apagadas a las

8:00 h). Al invertir el ciclo LD, se analizó la influencia del marcapasos interno, ya que los ritmos controlados de forma endógena requieren cierto número de ciclos para resincronizarse.

Posteriormente, los ritmos circadianos se estudiaron bajo condiciones de curso libre, exponiendo a los peces a pulsos ultradianos LD (40' de luz y 40' de oscuridad) durante 10 días y pasando luego a oscuridad constante (DD) durante otros 14 días. Para restablecer la sincronización a la luz y reajustar el marcapasos circadiano, se permitió que los peces se sincronizaran con un ciclo LD 12:12 durante al menos diez días, antes de exponerlos a condiciones DD.

- Influencia de la duración del fotoperiodo

Con el fin de examinar si la fase de actividad de la tenca tiene una duración constante, independientemente del número de horas de luz, o si circunscriben su actividad a la oscuridad, se expuso a los peces a fotoperiodos de distintas duraciones, comprendidos entre 2 y 18 horas de luz. Así, del fotoperiodo inicial (LD 12:12) se pasó primero a LD 6:18 (durante 9 días) y después, se aumentó a LD 18:6 (10 días) y LD 22:2 (9 días).

- Efecto de la intensidad lumínica decreciente

A continuación, se investigó la sincronización de los ritmos circadianos a la luz, reduciendo la intensidad de ésta (progresivamente y en varias fases), desde 300 a 0,3 lux, bajo condiciones LD 12:12. En primer lugar, se expuso a los peces a ciclos LD de 300:0 lux durante 9 días, poniendo especial cuidado en que hubiera realmente 0 lux durante la escotofase. Posteriormente, se redujo la intensidad lumínica cubriendo los tubos fluorescentes con papel de aluminio perforado, para así conseguir una luz homogénea cercana a 30 lux sobre toda la superficie del agua, sin alterar el espectro lumínico. Más adelante, la intensidad lumínica de la fase de luz se redujo a 3:0 lux (durante 9 días) y luego a 0,3:0 lux (10 días), colocando un filtro blanco sobre el papel de aluminio. Para estudiar la sincronización tras cambiar el ciclo LD, se invirtió el fotoperiodo y se registró la actividad locomotora durante otros 8 días.

La intensidad lumínica se midió con un luxómetro digital (Minilux, MX-Elektronik, Alemania), capaz de detectar valores de hasta 0,001 lux.

Análisis de datos

Los datos recogidos en el ordenador de registro fueron transferidos a un segundo ordenador para su análisis. Para ello se utilizó un *software* de cronobiología (Temps, v.1, 179 por Díez-Noguera, Universidad de Barcelona) y también el programa Microsoft Excel. Los actogramas se realizaron a doble trazo para una mejor visualización, y los trazos de actividad se suavizaron mediante media móvil. La duración de los periodos circadianos (*tau*) se estudió utilizando el análisis del periodograma de Sokolove–Bushell, en el programa Temps. Además de los actogramas, también se obtuvieron las ondas medias diarias.

Los porcentajes de actividad nocturna se calcularon mediante hoja de cálculo de Excel, utilizando los datos combinados de todos los tanques y comparando los recuentos hechos durante la escotofase con los realizados durante la fase de luz. Con el fin de examinar las diferencias significativas en los porcentajes de actividad nocturna bajo diferentes intensidades lumínicas, los datos fueron transformados en arcoseno antes de ser sometidos a ANOVA; después, se llevó a cabo una comparación de medias mediante el test *post hoc* de Tukey. Se consideró significativo un nivel de confianza del 95%. Se usó el análisis de regresión lineal para correlacionar el recuento de actividad diurna y nocturna con el fotoperiodo.

1.4. Resultados

- Ritmos circadianos y ritmos diarios

Bajo condiciones de LD 12:12, todas las tencas mostraron un patrón bien definido de actividad locomotora nocturna. Los datos recogidos de todos los tanques durante todo el experimento arrojaron un valor medio de actividad nocturna de $97,7 \pm 0,4\%$ (media \pm SEM), indicando que la tenca es una especie de actividad locomotora estrictamente nocturna.

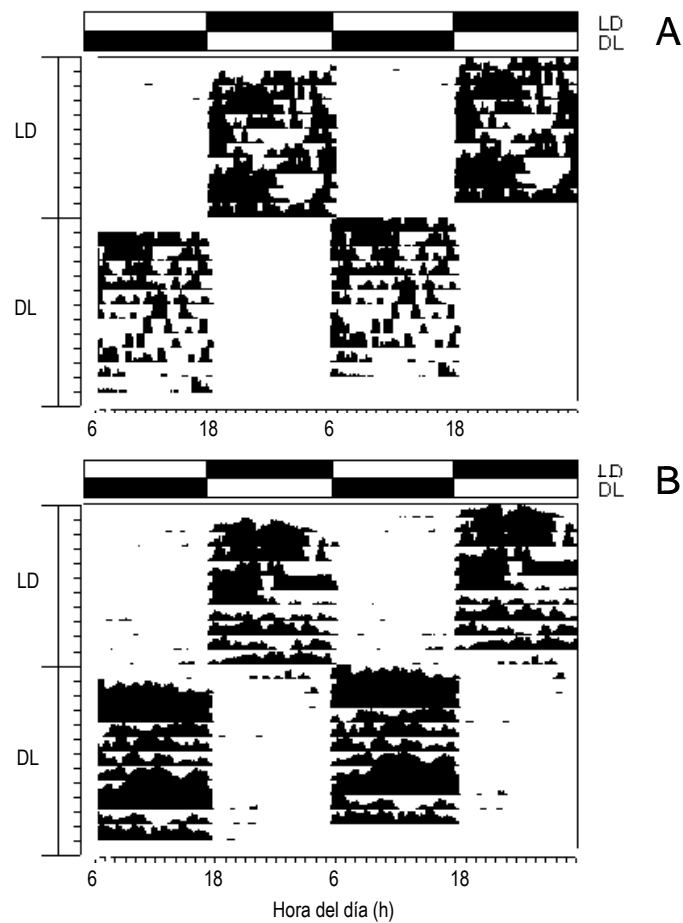


Fig. 1. Actogramas de dos tencas representativas bajo LD 12:12, y tras inversión del fotoperiodo (DL 12:12) doblando la fase de luz del día 11. Las barras blancas y negras en la parte superior del gráfico indican las fases de luz y oscuridad, respectivamente. Tras la inversión del ciclo LD, la mayoría de los peces se sincronizaron con gran rapidez sin ciclos de transición (A), aunque algunos de ellos se sincronizaron gradualmente (B).

Con el fin de estudiar la sincronización tras cambiar el ciclo LD, se invirtió el fotoperiodo de LD 12:12 a DL 12:12 doblando la duración de una fase de luz. En general, la resincronización al nuevo ciclo LD fue bastante rápida. Muchas tencas ajustaron su actividad al ciclo DL retrasando 12 horas el comienzo de la fase activa, sin alterar su duración (Figura 1A). Pese a la fuerte influencia de la luz, que ejerce un efecto enmascarante, algunas tencas (3 de las 12) desarrollaron una resincronización gradual tras la inversión del fotoperiodo. Durante los 2 ó 3 primeros días del nuevo ciclo LD, estos peces exhibieron alguna actividad durante la fase de luz, seguramente como reminiscencia de la fase activa previa (noche subjetiva). Esta actividad diurna residual fue disminuyendo paulatinamente hasta unirse con la fase principal de actividad, es decir, con la fase nocturna (Figura 1B).

Tras estos experimentos, se puso a prueba el carácter endógeno del ritmo bajo condiciones de curso libre. Para ello, se sometió a las tencas a pulsos ultradianos LD; después, tras un periodo de resincronización a LD 12:12, fueron sometidas a condiciones de oscuridad constante. Bajo DD, los ritmos de actividad diaria de algunas tencas no se debilitaron, sino que perduraron aun en ausencia de señales diarias externas (Figura 2).

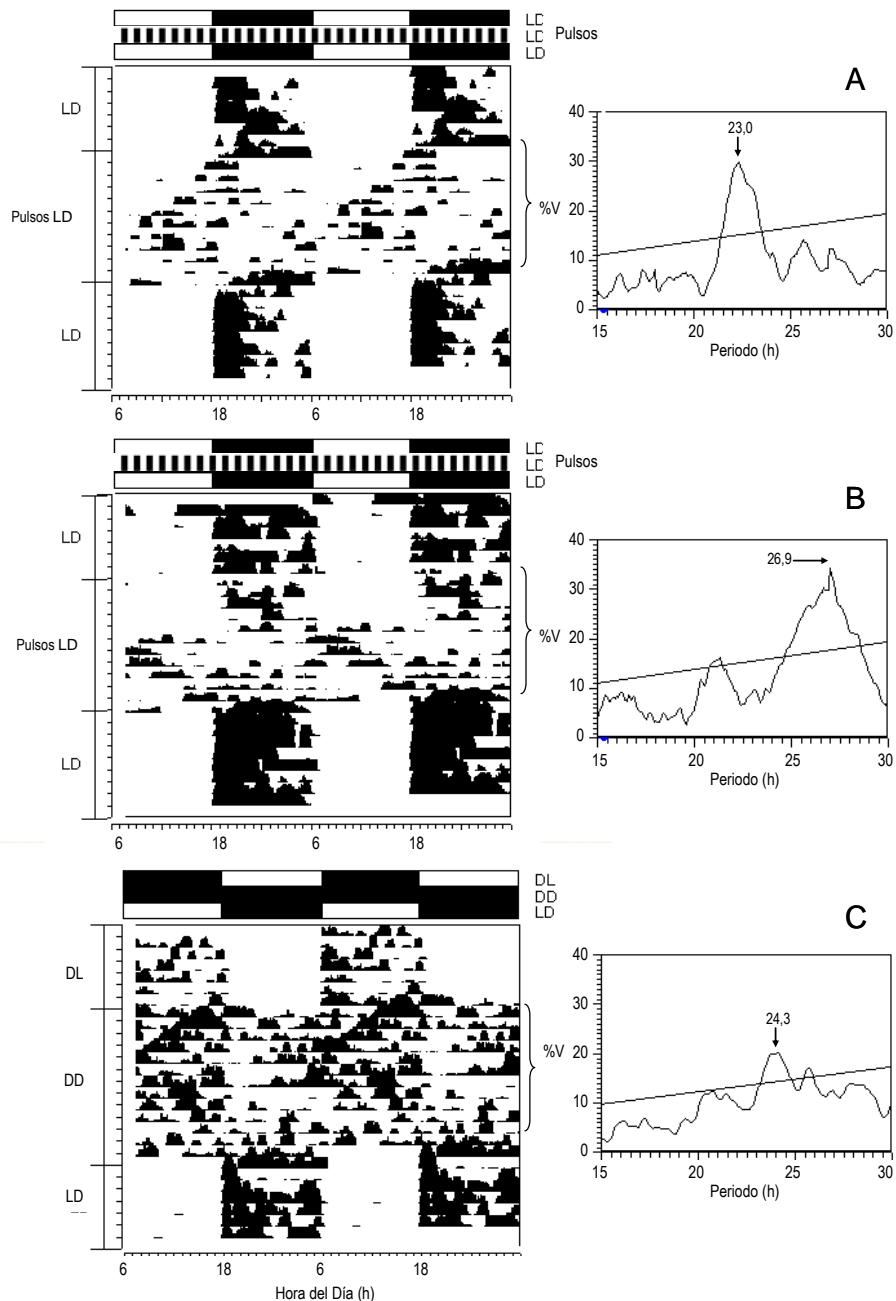


Fig. 2. Actograma (paneles de la izquierda) y análisis del periodograma (paneles de la derecha) de tencas bajo condiciones de curso libre: pulsos ultradianos LD 40':40' (A y B) y oscuridad constante (C). Los peces exhibieron ritmos de curso libre con valores de τ inferiores (A) y superiores (B) a 24 horas. La descripción de esta figura coincide con la de la figura 1.

En la Tabla 1, se muestran las duraciones de los periodos de los ritmos de curso libre, calculados mediante el análisis del periodograma. Se obtuvieron valores de *tau* significativos en el 50% de los tanques (6 de los 12), con valores medios de 27,3 h y 21,9 h, para los acuarios con valores *tau* mayores (n=4) y menores de 24 h (n=2), respectivamente. Tras una rapidísima resincronización posterior a LD 12:12, los peces se expusieron a condiciones de oscuridad constante (DD). Bajo estas condiciones, se observó periodicidad endógena en el 41,7 % de los acuarios (5 de los 12), con valores medios de *tau* de 21,2 h y 25,4 h, para los acuarios con valores menores (n=3) y mayores de 24 h (n=2), respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis del periodograma de los ritmos circadianos de actividad de las tencas bajo pulsos LD 40':40' y bajo oscuridad constante (DD).

<i>Tau</i> (h)												
Pez n.º	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
Pulsos LD	23,0	ns	28,6	ns	27,5	ns	26,9	ns	ns	26,2	20,8	ns
DD	ns	ns	24,3	26,4	ns	ns	ns	ns	21,4	ns	21,0	21,3

No se observaron diferencias significativas en el valor de *tau* entre los peces sometidos a pulsos LD de corta duración y los sometidos a oscuridad total. Sólo en dos de los tanques (el 3 y el 11) se pudo calcular *tau* para ambas situaciones (DD y pulsos de luz): los valores en el n.º 11 fueron de aproximadamente 21 h en ambas situaciones, y en el n.º 3 los valores fueron de 28,8 h bajo condiciones de pulsos de luz, y de 24,3 h en DD.

- Influencia de la duración del fotoperiodo

La influencia del fotoperiodo para controlar la duración de la actividad nocturna se examinó reduciendo gradualmente el número de horas de oscuridad en el ciclo LD, desde 18 hasta 2 h. Para ello, la hora de apagado de las luces fue postergándose paulatinamente desde las 12:00 h hasta las 18:00, las 0:00 y las 4:00 h, manteniendo la hora de encendido a las 6:00 h (Figura 3). Las tencas respondieron de forma idéntica en todos los tanques. Bajo LD 6:18, su fase de actividad se

expandió hasta abarcar por completo el periodo de oscuridad de 18 horas del nuevo fotoperiodo. Al cambiar el ciclo a LD 12:12, los peces se adaptaron rápidamente, reduciendo su actividad a las 12 horas sin un ciclo de transición aparente.

Al aumentar gradualmente el fotoperiodo, los peces fueron acortando su fase de actividad para ajustarse al periodo de oscuridad decreciente. Incluso bajo un ciclo extremo LD 22:2, con sólo dos horas de oscuridad, las tencas concentraron su actividad locomotora en las horas nocturnas.

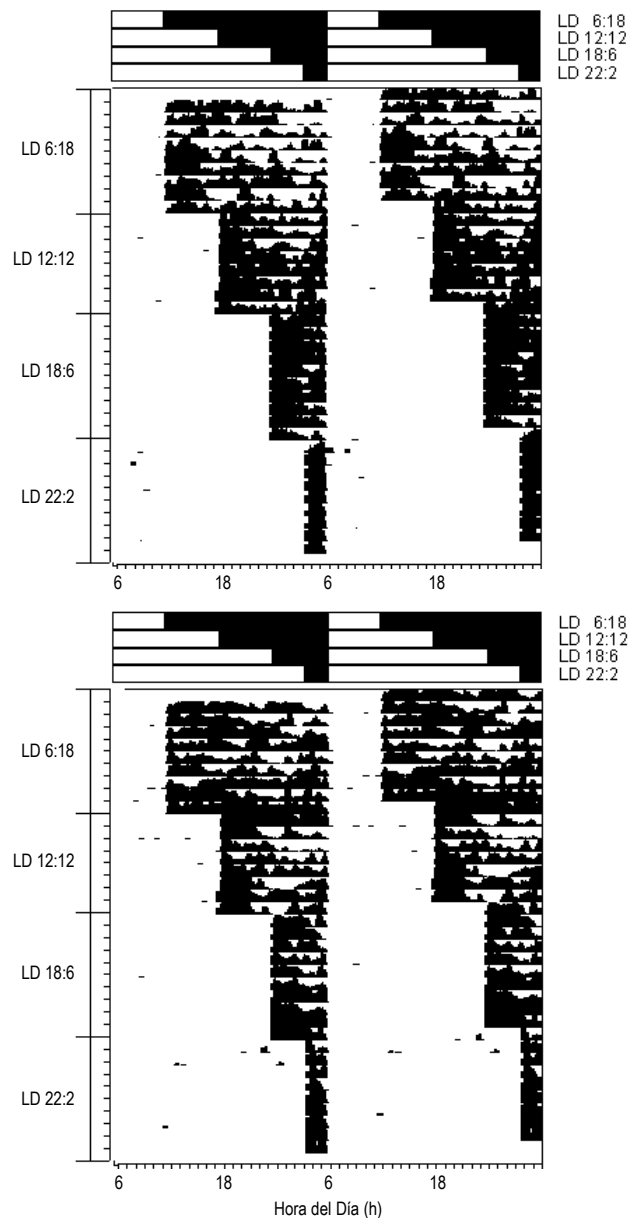


Fig. 3. Actogramas representativos de tencas expuestas a fotoperiodos crecientes. La descripción de la figura coincide con la de la figura 1.

En general, la actividad de las tenca aumentó bruscamente tras apagar las luces y se mantuvo estable a lo largo de la fase de oscuridad, para después decaer tras el encendido (Figura 4). No obstante, se produjo un aumento de la actividad más pronunciado inmediatamente después de apagar las luces, bajo fotoperiodos más cortos (Figuras 4B, 4C y 4D).

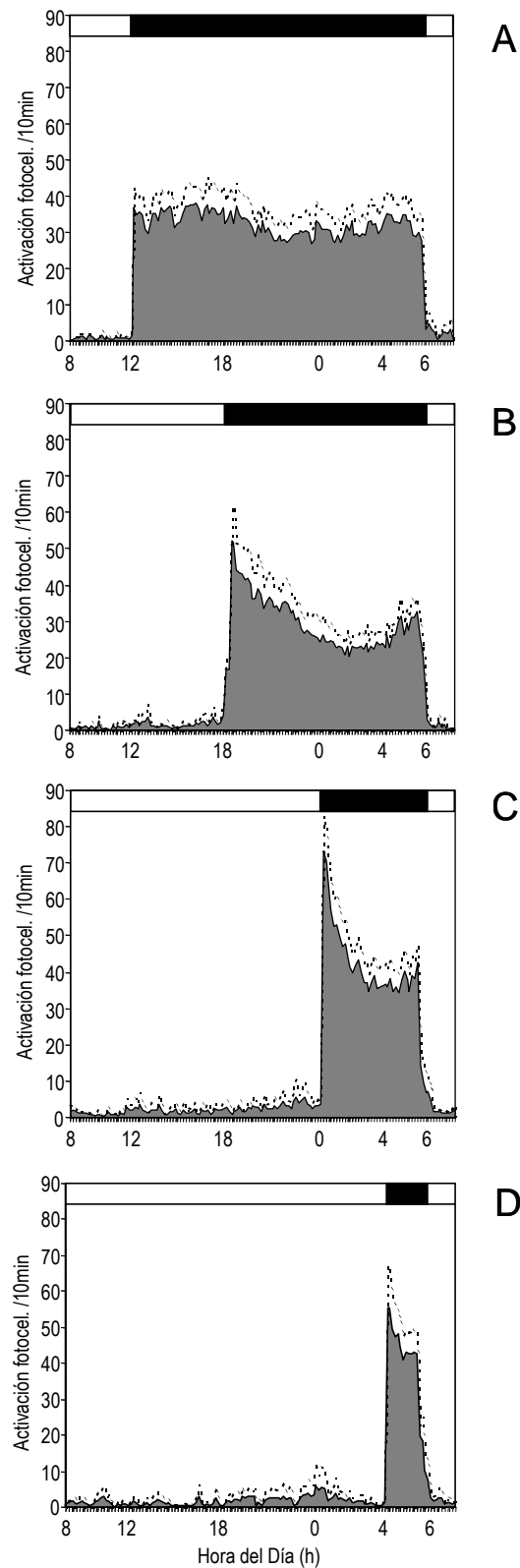


Fig. 4. Ondas medias diarias de tencas bajo fases de luz crecientes, con fases de oscuridad de 18 horas (A), 12 horas (B), 6 horas (C) y 2 horas (D). La duración de la fase de oscuridad viene indicada por la barra negra encima de cada gráfica. Los valores representan la media \pm SEM (n = 11).

Merece la pena destacar que los niveles de actividad media durante la escotofase se mantuvieron estables entre 30 y 40 interrupciones del haz de luz cada 10 minutos, independientemente de la duración de la fase de oscuridad, dando a entender que la duración del fotoperiodo afecta al nivel total de actividad diaria. De hecho, la actividad diaria disminuyó de forma directamente proporcional a la disminución de la duración de la escotofase. Los porcentajes de actividad nocturna también disminuyeron de forma directamente proporcional a la fase de oscuridad, aunque el efecto fue menos pronunciado, como refleja la menor pendiente de la curva (Figura 5). Así, los porcentajes de actividad durante las horas de oscuridad en LD 6:18, 12:12, 18:6 y 22:2 fueron respectivamente del 75%, 50%, 25% y 8,3%; mientras que la actividad nocturna pasó a constituir el 96%, 94%, 86% y 74% de la actividad diaria total.

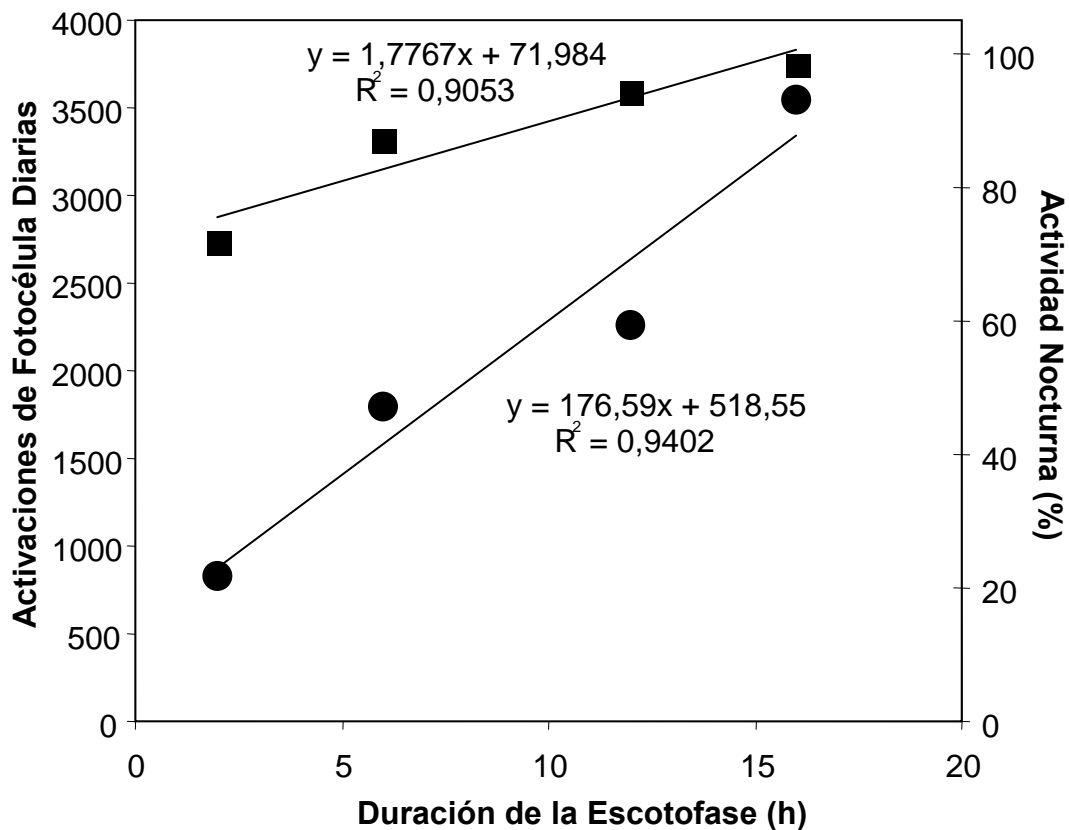


Fig. 5. Análisis de regresión lineal de los recuentos de actividad diaria (eje izquierdo, círculo) y de actividad nocturna (eje derecho, cuadrados), en función de la duración de la fase de oscuridad.

- Efecto de la intensidad lumínica decreciente

Debido a que la luz resultó ser un factor decisivo para el control de la actividad locomotora de las tencas, investigamos cómo afectaba la intensidad lumínica a la actividad nocturna. Con este propósito, la intensidad lumínica fue reduciéndose progresivamente en un factor de 10 a lo largo de tres etapas: de 300 lux a 30, 3 y a 0,3 lux respectivamente. En general, tras disminuir las intensidades lumínicas, las tencas mostraron un ritmo bien definido de actividad nocturna. Ahora bien, bajo una luz tenue (3 y 0,3 lux), se detectó algún nivel de actividad durante el día; y, en algunos casos, los peces adelantaron el comienzo de su actividad anticipándose al apagado de las luces (Figura 6).

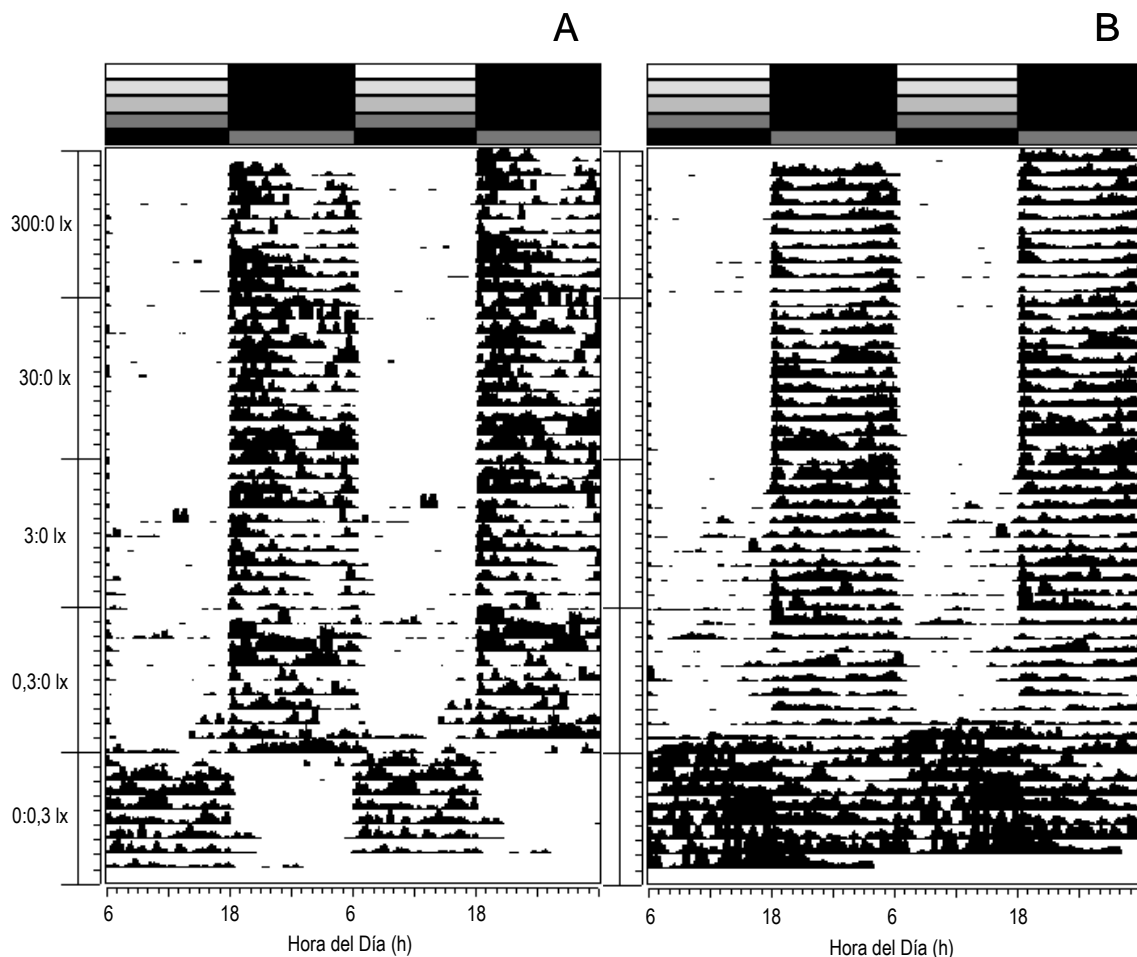


Fig. 6. Actogramas de tencas en condiciones de LD 12:12 e intensidades lumínicas decrecientes (300 lux, 30 lux, 3 lux y 0,3 lux). La fase experimental final consistió en una inversión del fotoperíodo. Tras invertir el ciclo LD (0:0,3 lux), los peces se sincronizaron muy rápidamente. La mayoría de los peces exhibió ritmos diarios bien definidos (A); mientras que algunos se desincronizaron, y su patrón de actividad diaria perdió su definición (B). La descripción de la figura coincide con la de la Fig. 1.

Al reducir la intensidad lumínica media de 300 a 30 lux, las tencas mostraron una actividad nocturna media del $96,3 \pm 0,8\%$ (media \pm SEM), mientras que su actividad locomotora durante las horas de luz fue prácticamente nula, a pesar de que la intensidad lumínica había sido reducida. Bajo una intensidad lumínica de 3 lux, la actividad de los animales continuó siendo marcadamente nocturna, con una ligera disminución de la actividad nocturna (los porcentajes bajaron al $84,8 \pm 0,6\%$). Después, se redujo la intensidad lumínica aún más, hasta 0,3 lux, para determinar si los ritmos de actividad nocturna se volvían más difusos y encontrar así el umbral a partir del cual las tencas se desincronizaban con el ciclo LD. Si bien el porcentaje de actividad nocturna se redujo significativamente ($76,4\% \pm 0,7\%$), las tencas mantuvieron un claro patrón de actividad nocturna incluso ante una intensidad lumínica tan baja (Figura 7).

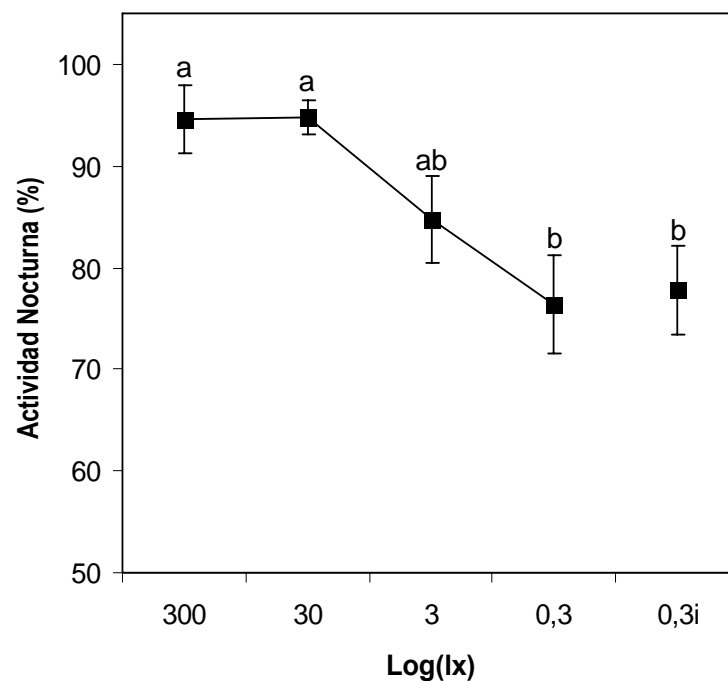


Fig. 7. Actividad nocturna de las tencas (porcentajes) bajo diferentes intensidades lumínicas (300 lux, 30 lux, 3 lux y 0,3 lux) y tras la inversión del fotoperiodo (0,3 lux). Las letras indican valores medios significativamente diferentes (ANOVA, test *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$).

Debido a que cabía la posibilidad de que las tencas se hubiesen sincronizado con el ciclo LD, manteniendo posteriormente sus ritmos de actividad de forma independiente a la intensidad lumínica, llevamos a cabo una prueba de sincronización real a un ciclo LD de 0,3:0 lux, invirtiendo el fotoperiodo de LD 12:12 (0,3:0 lux) a DL 12:12 (0:0,3 lux). Bajo estas condiciones, la mayoría de las

tencas respondió invirtiendo su ritmo de actividad al periodo de oscuridad total, evitando así la luz tenue (Figura 6A). De hecho, el porcentaje de actividad nocturna se mantuvo en $77,8 \pm 1,3\%$ y no fue muy distinto del observado antes de la inversión LD (Figura 7). No obstante, algunos peces se desincronizaron tras cambiar el ciclo LD: su patrón de actividad diaria se hizo difuso y entraron en curso libre, con un τ medio de 24,7 h (Figura 6B).

1.5. Discusión

La conclusión principal que se desprende de los resultados es que los ritmos de actividad de las tencas están dirigidos de forma endógena por un marcapasos circadiano, aunque pueden ser modulados intensamente por la luz. La luz ejerce un importante efecto de enmascaramiento, bloqueando a menudo la expresión del ritmo biológico. Así, bajo nuestras condiciones de laboratorio, las tencas se comportaron como una especie estrictamente nocturna y mostraron muy poca actividad durante el día, momento en que los peces se ocultaban en el refugio. Los efectos enmascarantes de la luz y la sincronización a ella podrían explicar por qué la mayoría de los peces se resincronizaron de forma prácticamente inmediata tras invertir el ciclo LD, pues sólo tres peces mostraron actividad diurna de transición durante los primeros 2 ó 3 días de resincronización (Fig. 1B). Aunque una respuesta circadiana tan débil podría sugerir que los ritmos diarios son dirigidos de forma exógena por la luz, el hecho de que los ritmos de actividad persistieran bajo condiciones de curso libre apunta a la existencia de un mecanismo interno de sincronización. Sin embargo, esos ritmos endógenos sólo aparecieron en el 45,8% de los peces, con valores de τ abarcando desde 20,8 a 28,6 h. La marcada influencia de la luz apareció también bajo diferentes situaciones fotoperiódicas, pues la duración de la fase de oscuridad determinó de forma directa la duración de la actividad (Fig. 3). Además, no hace falta exponer a las tencas a intensidades lumínicas muy potentes para poder definir las como “estrictamente nocturnas”, ya que bajo una luz muy tenue (0,3 lux) también siguieron sincronizadas al ciclo LD (Fig. 6).

Los ritmos diarios de los peces han sido clasificados en tres categorías, en función de la distribución de la actividad entre las horas de luz y las de oscuridad: diurnos, nocturnos y crepusculares (Eriksson, 1978). Debería añadirse una cuarta categoría, puesto que algunas especies pueden mostrar dualidad de fase, alternando entre comportamiento diurno y nocturno (Sánchez- Vázquez *et al.*, 1995; Brännäs y Alanärä, 1997) según la época del año, factores sociales, etc.

Con mucha frecuencia, los peces de agua dulce muestran signos de actividad típicamente nocturna (Müller, 1967). Como muestra, el siluro suele ser considerado una especie nocturna (Tabata *et al.*, 1989; Trajano y Menna-Barreto, 1995). No obstante, algunas especies de agua dulce como la trucha arcoiris son diurnas; y otras, como el carpín dorado, muestran dualidad de fase (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1996). Un estudio previo indicaba que el patrón de actividad diaria de las tencas era esencialmente nocturno (Siegmund, 1969), si bien el mismo autor señalaba que también podían estar activas durante las horas crepusculares (Siegmund y Wolff, 1973). En nuestro estudio, las tencas expuestas a cambios bruscos de intensidad lumínica (luces encendidas y apagadas de forma repentina) exhibieron conductas locomotoras estrictamente nocturnas, con un 97,7% de su actividad concentrada en la escotofase. Por tanto, esta especie debe clasificarse dentro de la categoría de peces nocturnos. Tal y como se observa en los roedores, no son necesarias ondas rectangulares del ciclo LD (encendido y apagado brusco de luces) para sincronizar los ritmos circadianos; de hecho, se sabe que las transiciones progresivas tras los cambios de fase LD facilitan la resincronización (Usui *et al.*, 1989). En los peces, no hay muchos datos acerca del efecto de los ciclos LD con transiciones cambiantes entre luz/oscuridad (sinusoidal, descendente o ascendente en dientes de sierra) sobre sus ritmos conductuales. En nuestro experimento, el perfil de actividad diaria de las tencas alcanzó su nivel máximo al comienzo de la escotofase (Fig. 4), aunque es necesario investigar más para saber hasta qué punto se relaciona este comportamiento con la ausencia de un verdadero periodo crepuscular.

Los cambios en el ciclo LD han sido utilizados con asiduidad para investigar el sistema circadiano, tomando el número de ciclos de transición necesarios para la sincronización como un indicador de la potencia del mecanismo endógeno de sincronización. Por lo general, los peces necesitan muy pocos ciclos de transición para resincronizarse con un nuevo ciclo LD. El *Notegominus crysoleucas* ("golden shiner"), por ejemplo, sólo necesita 2 ó 3 días para resincronizarse tras una inversión de 12 horas (Laguë y Reeb, 2000); mientras que la lubina necesita sólo un día (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1995b). Sin embargo, en la anguila babosa (mixínido también llamado "babosa de mar") tras una inversión de 6 horas, los ciclos de transición se prolongaron durante más de una semana hasta la sincronización completa (Ooka-Souda *et al.*, 1985). En otras especies de peces teleósteos, también se ha observado la resincronización casi inmediata como respuesta a las inversiones del fotoperiodo, sugiriendo que una influencia débil del marcapasos circadiano y un poderoso efecto enmascarante o sincronizador de la luz, podría ser característica común en el comportamiento circadiano de las especies pertenecientes a este orden.

La participación del componente endógeno en los ritmos de actividad diaria de las tencas parece ser débil, porque no todos los peces mostraron valores de τ significativos, y aquellos que lo mostraron, lo hicieron con un alto grado de variabilidad (Tabla 1). En comparación con los mamíferos, la proporción de peces con ritmicidad circadiana es relativamente baja. En condiciones de oscuridad constante, sólo el 41,7% de las tencas mostraron un valor de τ significativo, mientras que el porcentaje aumentó hasta el 50% al aplicar pulsos LD ultradianos. La presencia de ritmos de curso libre en aproximadamente el 50% de los individuos estudiados, es algo común en otras especies de peces. Por ejemplo, en el carpín dorado, ligo y Tabata (1996) encontraron que un 57%, 57% y 67% de los peces en condiciones de DD, LL y pulsos LD respectivamente, se comportaron rítmicamente. En otras especies, sin embargo, la presencia del sistema circadiano aparece de forma más consistente y se han detectado ritmos de curso libre en un mayor porcentaje de individuos, observándose que la constancia de las condiciones desempeña un papel importante para evitar que el marcapasos circadiano se debilite. Así, en especies diurnas de peces tales como la trucha, la ritmicidad circadiana es más clara bajo LL (83,8%) y bajo pulsos LD ultradianos (66,7%) que bajo una luz tenue constante (16,7%) (Sánchez-Vázquez y Tabata, 1998). Dado que las tencas no exhibieron actividad durante la fase de luz, nuestro estudio no incluye un examen de los ritmos circadianos bajo condiciones de LL. Bajo DD y pulsos LD, los ritmos de curso libre fueron considerablemente inestables y variables, con valores de τ entre 21 y 26,4 en DD, y entre 20,8 y 28,6 para los pulsos LD. Los valores de τ para DD y pulsos LD fueron diferentes en cada uno de los acuarios por lo general, salvo un caso en el que casi coincidieron (Tabla 1). Dado que tanto la inestabilidad en las periodicidades de curso libre como la variabilidad intraespecífica e interespecífica parecen ser comunes en los peces (Tabata *et al.*, 1989; Sánchez-Vázquez y Tabata, 1998), habría que considerar los valores de τ con desconfianza a la hora de utilizarlos para caracterizar a una especie en particular. Es más, la postura clásica ante los ritmos circadianos de los peces considera que son muy flexibles y están controlados por un sistema circadiano relativamente débil, intensamente influenciado por el ambiente (la luz, en particular). Si bien mucho de lo anterior es cierto y parece estar refrendado por los resultados obtenidos en tencas, determinadas especies de peces sí que muestran ritmos circadianos estables y sólidos. Así ocurre con un lábrido como el *Halichoeres chrysus*, que presenta un ritmo de curso libre y una sincronización para el inicio de la actividad tan precisos que permiten predecir cuál será la curva de respuesta (Gerkema *et al.*, 2000). En muchos estudios realizados con otras especies, la ritmicidad tendía a desaparecer en 7-10 días (ligo y Tabata, 1996). Sin embargo, no ocurrió así con las tencas, pues se observó ritmicidad circadiana durante los 14 días del periodo DD. Aun así, no sabemos si las tencas son capaces de mantener la ritmicidad durante tanto tiempo como el *P. atemi* o el *E.*

burgeri, cuyas periodicidades endógenas han sido observadas hasta incluso después de tres meses (Ooka-Souda *et al.*, 1985).

Al exponer las tencas a fotoperiodos de distinta duración, éstas restringieron su actividad locomotora a la fase de oscuridad, independientemente de su duración (desde 18 hasta 2 horas); y la luz demostró ser un factor más importante para la sincronización que el marcapasos circadiano. En otras especies de peces también se ha observado que la luz determina el patrón de actividad; por ejemplo, la trucha concentra su actividad durante el día (Boujard y Leatherland, 1992a); y la lubina, dependiendo de si su comportamiento es diurno o nocturno, restringe su actividad a las fases de luz y oscuridad, bajo fotoperiodos decrecientes (de LD 12:12 a 0,25:23,75) y crecientes (de LD 12:12 a 23,75:0,25), respectivamente (Aranda *et al.*, 1999).

En un estudio anterior (Escudero-García *et al.*, 1997), en el que las tencas pudieron elegir la intensidad lumínica en un rango entre 0 y 2.000 lux, el 99,9% decidió permanecer en la zona de menor intensidad lumínica, independientemente de la estación o de la temperatura del agua. Estas observaciones concuerdan con nuestros resultados en los que las tencas fueron expuestas a diferentes intensidades lumínicas, mostrándose inactivas durante las horas de luz, incluso con intensidades lumínicas muy bajas. De hecho, aunque el porcentaje de actividad nocturna a 0,3 lux se redujo significativamente, todavía representó el 76,4% de la actividad diaria. Además, al invertir el fotoperiodo, la mayoría de las tencas se resincronizaron con el nuevo ciclo LD manteniendo un porcentaje similar de actividad nocturna (Fig. 7), lo que pone de relieve la débil participación del sistema circadiano y la gran capacidad de la luz para sincronizar y actuar como un factor enmascarante, aun con una baja intensidad lumínica. Estos resultados contrastan con los publicados sobre el siluriforme *Ictalurus nebulosus*, que fue perdiendo de forma gradual sus hábitos nocturnos al ser expuesto a ciclos LD con diferencias decrecientes entre la luz y la oscuridad (120:0,1 lux, 10:0,01 lux, 1:0,001 lux) (Eriksson, 1978). Nuestros resultados pueden ser interpretados como una respuesta a la necesidad que tienen las tencas de ajustarse a un nicho ecológico estrictamente nocturno que, independientemente del marcapasos circadiano, requiere un sistema preciso de detección de las variaciones luz-oscuridad, así como la capacidad de sincronizarse con ellas. Estas observaciones están de acuerdo con la conclusión de Gerkema *et al.* (2000), quienes expusieron que un menor control de la actividad por parte del marcapasos circadiano se relaciona directamente con una mayor sensibilidad hacia el sincronizador o *zeitgeber*. Durante el día, las tencas están a cubierto, ya sea escondidas bajo los fondos fangosos de lagos y ríos, o bien a la sombra de plantas cuando la luz irradia con muy baja intensidad (Perrow *et al.*,

1996). Parece razonable pensar que el mecanismo que controla la actividad diaria se base principalmente en ciclos LD externos que son percibidos a través de los ojos laterales y la glándula pineal, tal y como se ha sugerido en el caso del *Silurus asotus* (Tabata *et al.*, 1991). Además, si los sentidos de las tencas funcionan bajo intensidades lumínicas normales y su apego a la oscuridad es una cuestión de preferencia (cfr. experimento 3, LD 0,3:0 lux), puede que elijan un nicho nocturno para evitar a los depredadores diurnos, posiblemente aves y lucios.

En conclusión, nuestros resultados muestran que: (a) la tenca es una especie estrictamente nocturna; y (b) los ritmos de actividad diaria se resincronizan de forma gradual tras invertir el ciclo LD y persisten bajo condiciones de curso libre, lo que sugiere un origen circadiano. Sin embargo, la luz influye intensamente en la actividad, puesto que (c) la duración de la fase activa es controlada de forma directa por el fotoperiodo, y (d) el comportamiento estrictamente nocturno se mantiene aun en condiciones de luz muy tenue (0,3 lux). Estos hallazgos proporcionan un mayor conocimiento del comportamiento rítmico de la tenca y cómo se ve afectado por la luz, y podrían ser de ayuda para optimizar la gestión del cultivo de la tenca, por ejemplo, para diseñar eficazmente las estrategias de alimentación teniendo en cuenta su conducta nocturna.

1.6. Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada parcialmente por el Proyecto AGL2001-0593-C03-01 del MCYT, concedido a FJSV. Los autores también quieren expresar su agradecimiento al personal del Centro de Acuicultura “Las Vegas del Guadiana” (Junta de Extremadura, Badajoz), en especial a C. Fallola, por facilitar los peces, por sus consejos y su amabilidad.

1.7. Referencias bibliográficas

Ali, M.A. Rhythms in Fishes. 1992. En M.A. Ali, ed. New York. Plenum Press.

Aranda, A.; Madrid, J.A.; Zamora, S.; Sánchez-Vázquez, F.J. 1999. Synchronizing effect of photoperiod on the dual phasing of demand-feeding rhythms in sea bass. *Biol. Rhythm Res.* 30: 392-406.

Aschoff, J. 1981. Biological rhythms. En: J. Aschoff, ed. *Handbook of behavioral neurobiology*, Vol 4. New York. Plenum Press.

Boujard, T.; Leatherland, J.F. 1992a. Demand-feeding behaviour and diel pattern of feeding activity in *Oncorhynchus mykiss* held under different photoperiod regimes. *J. Fish Biol.* 40: 535-544.

Brännäs, E.; Alanärä, A. 1997. Is diel dualism in feeding activity influenced by competition between individuals? *Can. J. Zool.* 75: 661-669.

Eriksson, L.O. Nocturnalism versus diurnalism, dualism within fish individuals. 1978. En J.E. Thorpe, ed. *Rhythmic activity of fishes*. London. Academia Press: 69-90.

Eriksson, L.O.; Van Veen, T. 1980. Circadian rhythms in the brown bullhead, *Ictalurus nebulosus* (Teleostei). Evidence for an endogenous rhythm in feeding, locomotor, and reaction time behaviour. *Can. J. Zool.* 58: 1899-2097.

Escudero-Garcia, J.C.; Garcia-Ceballos, E.; Martin-Gallardo, J.; Perez-Regadera, J.J. 1997. Model for the study of the selection of environmental parameters in freshwater fish. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 44: 359-375.

Gerkema, M.P.; Videler, J.J.; de Wiljes, J.; van Lavieren, H.; Gerritsen, H.; Karel, M. 2000. Photic entrainment of circadian activity patterns in the tropical labrid fish *Halichoeres chrysus*. *Chronobiol. Int.* 17: 613-622.

Iigo, M.; Tabata, M. 1996. Circadian rhythms of locomotor activity in the goldfish *Carassius auratus*. *Physiol. Behav.* 60: 775-781.

Laguë, M.; Reeb, S.G. 2000. Phase-shifting the light-dark cycle influences food-anticipatory activity in golden shiners. *Physiol. Behav.* 70: 55–59.

Müller, K. 1967. Schreiber. Eine Methode zur Messung der lokomotorischen Aktivität von Süßwasserfischen. *Oikos*. 18: 135-136.

Ooka-Souda, S.; Kabasawa, H.; Kinoshita, S. 1985. Circadian rhythms in locomotor activity in the hagfish *Eptatretus burgeri*, and the effect of reversal of light-dark cycle. *Zool. Sci.* 2: 749-754.

Perrow, M.R.; Jowitt, A.J.D.; Johnson, S.R. 1996. Factors affecting the habitat selection of tench in a shallow eutrophic lake. *J. Fish Biol.* 48: 859-870.

Sánchez-Vázquez, F.J.; Madrid, J.A.; Zamora, S. 1995. Circadian rhythms of feeding activity in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L: dual phasing capacity of diel demand-feeding pattern. *J. Biol. Rhythms*. 10: 256-266.

Sánchez-Vázquez, F. J.; Madrid, J. A.; Zamora, S.; Iigo, M.; Tabata, M. 1996. Demand feeding and locomotor circadian rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*: Dual and independent phasing. *Physiol. Behav.* 60: 665–674.

Sánchez-Vázquez, F. J.; Tabata, M. 1998. Circadian rhythms of demand-feeding and locomotor activity in rainbow trout. *J. Fish Biol.* 52: 255–267.

Sánchez-Vázquez, F.J.; Azzaydi, M.; Martínez, F.J.; Zamora, S.; Madrid, J.A. 1998b. Annual rhythms of demand-feeding activity in sea bass: Evidence of a seasonal phase inversion of the diel feeding pattern. *Chronobiol. Int.* 15: 607–622.

Siegmund, R. 1969. Lokomotorische Aktivität und Ruheverhalten bei einheimischen Süßwasserfischen (*Pisces, Percidae, Cyprinidae*). *Biol. Zbl.* 88: 295-312.

Siegmund, R.; Wolff, D. L. 1973. Laboruntersuchungen und Freiwasserbeobachtungen zur Schwimmaktivität einheimischer Süßwasserfische. *Fischerei Forsch.* 11: 107-116.

Tabata, M.; Minh-Nyo, M.; Niwa, H.; Oguri, M. 1989. Circadian rhythm of locomotor activity in a teleost, *Silurus asotus*. Zoo. Sci. 6: 367-375.

Tabata, M.; Minh-Nyo, M.; Oguri, M. 1991. The role of the eyes and the pineal organ in the circadian rhythmicity in the catfish, *Silurus asotus*. Nippon Suisan Gakkaishi. 57: 607-612.

Thorpe, J.E. 1978. Rhythmic Activity of Fishes. J.E. Thorpe, ed. London. Academic Press.

Trajano, E.; Menna-Barreto, L. 1995. Locomotor activity pattern of Brazilian cave catfishes under constant darkness (Siluriformes, Pimelodidae). Biol. Rhythm Res. 26: 341-353.

Usui, S.; Takahashi, Y.; Honda, Y.; Ebihara, S. 1989. Circadian behavioural rhythms during various light-intensity cycles in rats. Physiol. Behav. 46: 521-528.

2. RITMOS DE ALIMENTACIÓN A DEMANDA Y SINCRONIZACIÓN POR EL ALIMENTO DE LOS RITMOS DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN LA TENCA (*Tinca tinca*)

M. J. Herrero ¹, M. Pascual ², J. A. Madrid ¹ y F. J. Sánchez-Vázquez ¹

¹ Universidad de Murcia. Departamento de Fisiología. Facultad de Biología. 30100 Murcia.

² Centro de Acuicultura «Las Vegas del Guadiana». 06195 Villafranco del Guadiana, Badajoz.

2.1. Resumen

La tenca (*Tinca tinca*) se ha descrito como una especie estrictamente nocturna cuyos ritmos de actividad locomotora son de naturaleza endógena, si bien están fuertemente influenciados por la luz. Aparte de la luz, otra serie de factores ambientales tales como la hora de la alimentación pueden actuar como sincronizadores del sistema circadiano en los peces; en este sentido, la información sobre los ritmos de alimentación de la tenca es muy escasa. El presente estudio describe los ritmos diarios de alimentación voluntaria de la tenca y analiza el papel que tiene la hora de la alimentación en la sincronización de sus ritmos de actividad locomotora. Cuando se les permitió accionar dispensadores de alimento activados por sensores de tracción, las tencas mostraron un comportamiento estrictamente nocturno tanto al aire libre como en el laboratorio. Su actividad locomotora continuó siendo estrictamente nocturna con independencia de que fueran alimentadas durante la escotofase (D-FEEDING) o durante la fotofase (L-FEEDING). No obstante, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos por lo que respecta al crecimiento o la ingesta de alimento. En cualquier caso, a diferencia de lo que ocurrió con la L-FEEDING, la D-FEEDING provocó una clara actividad anticipatoria al alimento (FAA). Además, ante la posibilidad de alimentarse en ambos momentos del día, las tencas mostraron una clara preferencia por la alimentación nocturna (D-FEEDING). Por último, en peces expuestos a oscuridad constante (DD), la hora de la alimentación actuó como un verdadero sincronizador (“zeitgeber”), observándose FAA. Al someter a los animales a condiciones de ayuno en DD, la actividad locomotora entró en curso libre, y en 6 de los 12 individuos se obtuvieron resultados significativos en el análisis del periodograma. Bajo DD, los peces se resincronizaron cuando se reanudó la alimentación habitual, y algunas tencas presentaron FAA. Los resultados obtenidos mostraron la existencia de un oscilador encarrilado por la alimentación (FEP) en las tencas.

Palabras clave: sincronización por alimentación, ritmo de alimentación, dispensador automático, actividad locomotora, sincronizador, *zeitgeber*, oscilador encarrilado por la alimentación, LEP, FEP, FAA, anticipación, estrategias de alimentación, tenca, *Tinca tinca*.

2.2. Introducción

Los peces no acostumbran a alimentarse de forma continua, sino en determinados momentos del día. La ritmicidad en la actividad alimentaria es un fenómeno ampliamente distribuido en los peces (Madrid *et al.*, 2001). Una característica distintiva de los peces es que suelen presentar un sistema circadiano mucho más flexible que el de vertebrados superiores (Oishi, 1991), con diferencias tanto interespecíficas como intraespecíficas. La flexibilidad en el comportamiento que puede observarse en otras especies de peces, tal y como ocurre con la dualidad de fase de la lubina (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1995b), no aparece en el caso de la tenca, una especie de ciprínido estrictamente nocturna e intensamente sincronizada a la luz, que apenas muestra variaciones entre individuos (Siegmund, 1969). Aunque todavía no han sido descritos los ritmos de alimentación de la tenca, su comportamiento nocturno lleva a pensar que prefieren alimentarse de noche; sin embargo, a pesar de estos ritmos tan marcados, la alimentación de las tencas en cautividad se lleva a cabo durante el día, en horario laboral. Dado que en acuicultura los costes por alimentación representan un 40-50% de los costes totales de producción (Molina-García *et al.*, 1999), deberían optimizarse las estrategias de alimentación con el objetivo de mejorar la producción; esto requeriría que se tomaran en consideración los ritmos biológicos de alimentación de la especie (Madrid *et al.*, 2001; Boujard y Leatherland, 1992). La tenca es la segunda especie de agua dulce más importante en la acuicultura española (Molina-García *et al.*, 1999), a continuación de la trucha arcoiris. Si bien constantemente se crean nuevas piscifactorías dedicadas a la cría de esta especie y se consiguen avances para mejorar la composición de su dieta, todavía falta definir una estrategia adecuada de alimentación.

En este trabajo se han estudiado los ritmos biológicos de alimentación de las tencas a través del empleo de alimentadores a demanda: los peces los activaban mediante un sensor conectado al dispensador y liberaban así una cantidad limitada de alimento (Rozin y Mayer, 1961; Adron *et al.*, 1973; Landless, 1976). Una vez descritos sus ritmos naturales de alimentación, se estudió el comportamiento de esta especie de pez, estrictamente nocturna, tras la privación temporal de alimento durante el día o la noche, así como los posibles efectos en su crecimiento. En otras especies de ciprínidos, como el *Couesius plumbeus*, se observa un ritmo diurno, y ritmos

circadianos de curso libre bien definidos bajo condiciones constantes (Kavaliers, 1979; Reeb, 2002). No obstante, se ha observado a esta última especie alimentándose por la noche en el lago Ontario (Emery, 1973), aunque fue imposible afirmar si se alimentaban con más asiduidad de noche, durante el día o al anochecer. Con el fin de aclarar estas cuestiones en las tencas e investigar el efecto de la comida en la sincronización de su actividad locomotora, nuestro diseño experimental comparó la sincronización por la luz con la sincronización por alimentación en las tencas.

Hasta el momento se han publicado pocos estudios acerca de los ritmos biológicos de los peces pero, en la mayoría de las especies, parecen estar controlados por un sistema endógeno o marcapasos circadiano que define la duración de la fase de actividad y la fase de descanso, modulado por estímulos periódicos exógenos que ajustan el marcapasos al ambiente. Estos estímulos exógenos no sólo incluyen factores abióticos, tales como la luz, la temperatura y la concentración de oxígeno; sino también factores bióticos, como la abundancia de presas, interacciones intraespecíficas o interespecíficas o la necesidad de evitar a los depredadores (Madrid *et al.*, 2001). El sincronizador más relevante es el ciclo luz/oscuridad del fotoperiodo, pero también se sabe que el acceso periódico a la comida puede sincronizar los ritmos (Boulos y Terman, 1980). En este sentido, han sido dos las teorías comúnmente aceptadas que sugieren que los ritmos circadianos son controlados de forma endógena. La primera supone la existencia de un oscilador principal endógeno encarrilado por señales lumínicas (LEP) en el que puede quedar memorizada la hora de la alimentación; puede además aparecer actividad anticipatoria al alimento (FAA), estable incluso al interrumpir el suministro de alimento. Frente a este modelo de un LEP único, la teoría multioscilaria LEP-FEP sostiene la existencia de dos osciladores diferentes: uno sincronizado por la luz (LEP) y otro por el alimento (FEP) (Mistlberger, 1994). Se ha usado este segundo modelo para explicar el sistema circadiano de los mamíferos, observándose a su vez que ambos osciladores se acoplan y solapan (Edmons y Adler, 1977; Stephan, 1986; Jilge y Stähle, 1993). Ya que en los peces sigue sin saberse la ubicación anatómica exacta de estos osciladores, esta teoría ha sido probada de forma funcional en otras especies de peces (Boujard y Leatherland, 1992; Spieler, 1992; Sánchez-Vázquez y Madrid, 2001), pero nunca antes ha sido investigada en una especie estrictamente nocturna como la tenca. En el primer capítulo de la presente tesis, se comprobó que los ritmos de actividad locomotora de la tenca presentan un componente endógeno, si bien la luz ejerce un importante efecto de enmascaramiento, y con ella se consigue una rápida sincronización al cambiar el ciclo de luz/oscuridad. Con todo, nunca se había explorado el papel que desempeña el momento de la alimentación como estímulo externo para sincronizar los ritmos circadianos de

actividad en esta especie, por lo que son necesarios nuevos experimentos sobre su sincronización a la hora de la alimentación bajo condiciones de DD, y sobre la existencia de un oscilador encarrilado por la alimentación (FEP).

En este estudio se abordan los ritmos diarios de alimentación de las tencas, su respuesta a programas de alimentación con restricción, bien durante el día o bien durante la noche, y el papel de la disponibilidad de comida en la sincronización de su ritmo circadiano, con el fin de revelar su conducta alimentaria y los mecanismos endógenos que impulsan los ritmos biológicos en un pez de comportamiento estrictamente nocturno.

2.3. Material y métodos

Animales e infraestructuras

Los experimentos en interior se llevaron a cabo con 12 tencas (91 g de peso corporal medio) mantenidas individualmente en acuarios de agua dulce de 60 litros, usando los mismos peces para los tres experimentos. Un tubo de luz fluorescente (15 W, AGRO-LUX, Sylvania, Alemania) iluminaba cada uno de los acuarios, proporcionando una intensidad lumínica media de 300 lx en la superficie del agua. Cada acuario disponía a su vez de un filtro individual, un difusor de oxígeno y un refugio de PVC. El fotoperiodo se controlaba de forma automática a través de un reloj digital programable (Datamicro, Orbis, España). Se mantuvo el agua a una temperatura constante de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, estabilizando la temperatura de la habitación mediante un termostato electrónico. En frente de cada acuario, a 10 cm del fondo y 7 cm de la pared lateral bajo el dispensador de alimento, un sensor de infrarrojos (Omron, E3S-AD62, Japón) conectado a un ordenador, registraba continuamente los movimientos del pez al acercarse a la zona donde caía la comida. La frecuencia con la que se registraron los datos fue de 10 minutos.

El experimento al aire libre se llevó a cabo en primavera, en el Centro de Acuicultura «Las Vegas del Guadiana» (Badajoz, España), con 300 peces (1 kg de peso medio corporal) mantenidos en un estanque de 120 m². El fotoperiodo medio fue de 15 horas (de 4:10 h a 18:50 h) y la temperatura del agua osciló en torno a 24°C.

Procedimiento experimental

- Ritmos de alimentación: actividad alimentaria voluntaria en interior y al aire libre

En interior. Para estos experimentos se utilizó un fotoperiodo constante de 12:12 (L:D). Cada acuario disponía de un dispensador: un aparato comercial automático de alimentación (Eheim, 3581 000, Alemania), adaptado al experimento mediante un sensor de desplazamiento (una varilla sumergida hasta unos 5 cm aproximadamente) y conectado a un ordenador. Cuando un pez empujaba el sensor, el contenedor de alimento giraba y dejaba caer unos cuantos gránulos de pienso. El nivel de recompensa alimentaria quedó establecido en 5,5 g/kg de peso corporal. La comida de los contenedores se rellenaba cada tres días. El experimento se prolongó durante 60 días.

Al aire libre. Los ritmos de alimentación se estudiaron también en condiciones de cultivo. Tres dispensadores comerciales (Innovaqua, IN-2082, España), cada uno con un reservorio con capacidad para 40 kg de alimento y un disco vibrador en el fondo, se transformaron en dispensadores automáticos mediante un sensor de tracción (un cable flexible) y se conectaron a un dispositivo de almacenamiento de datos para realizar un seguimiento permanente. Para activar el dispensador, el pez tenía que morder el extremo del sensor y tirar de él. El nivel de recompensa quedó establecido en 0,057 g/kg de peso corporal. Los datos provenientes de los dispensadores se registraron durante todo el tiempo que duró el experimento.

- Sincronización por la luz y la alimentación de los ritmos locomotores bajo condiciones LD

Los peces se pesaron antes del experimento. Se mantuvo un fotoperiodo constante L:D 12:12 (encendido de luces a las 10:00 h, apagado a las 22:00 h) durante todo el experimento. En la primera fase, se proporcionó alimento (el 1,5% del peso corporal) una vez al día mediante dispensadores programables y, una hora más tarde, se recogían y retiraban los gránulos no ingeridos. Los peces estaban distribuidos en dos grupos de seis acuarios cada uno. El primer grupo sólo recibía comida durante la escotofase (a las 9:00 h, grupo D-FEEDING), mientras que el otro era alimentado únicamente durante la fotofase (a las 15:00 h, grupo L-FEEDING). Una hora después, se retiraba la comida no ingerida de todos los acuarios y, una vez seca, se pesaba para determinar el consumo de alimento y comparar los resultados de ambos grupos. El contenido original de agua en

el alimento (7%), fue medido y sustraído del alimento seco para hacer los cálculos. Esta fase del experimento se prolongó durante 30 días, tras los cuales los peces se pesaron para calcular la eficiencia de su crecimiento según la tasa de crecimiento específico (SGR) y el índice de conversión del alimento (FCR). La SGR se define como el porcentaje medio del peso corporal que se gana por día durante un periodo de tiempo, y es útil para predicciones de crecimiento y comparaciones de los grupos. El FCR expresa la relación entre la ganancia de peso del pez y la cantidad de alimento ingerida (véase fórmula más adelante).

Durante la segunda fase del experimento, que también duró 30 días, se proporcionó alimento dos veces al día a las mismas horas que en la fase anterior, dando a los animales la oportunidad de elegir entre D-FEEDING y L-FEEDING. En ambos casos, una hora más tarde se procedía a retirar el alimento no consumido.

- Sincronización por la hora de la alimentación de los ritmos locomotores bajo condiciones DD

Para estudiar el efecto que tiene la hora de la alimentación como sincronizador exógeno, se proporcionó el alimento (0,4% del peso corporal) a una hora establecida mediante un dispensador programable, bajo condiciones de oscuridad constante (DD). Tras el segundo experimento, hubo un periodo de sincronización a un ciclo L:D 12:12 (luces encendidas a las 9:00 h, apagadas a las 21:00 h) de 40 días, durante el cual la comida se ofreció siempre a las 8:00 h. Cuando los peces se habían sincronizado con esta hora de la alimentación (desarrollando incluso actividad anticipatoria), se les expuso durante 15 días a DD, manteniendo la hora de la alimentación a las 8:00 h, para después someterlos a ayuno en las mismas condiciones de DD durante otros 10 días. Por último, la comida volvió a ofrecerse a las 8:00 h durante 15 días para comprobar si los animales se resincronizaban con la hora de la alimentación.

Análisis de datos

Las demandas de alimento, por un lado, y las veces que los animales activaban la fotocélula interrumpiendo el haz de luz, por otro, se registraron continuamente, quedando almacenadas en un ordenador a intervalos de 10 minutos. Los datos se analizaron usando un programa de

cronobiología (Temps, v.1, 179 por Dr. Díez Noguera, Barcelona) y la base de datos de Microsoft Excel. Con el programa Temps, los resultados pueden ser presentados como actogramas dobles para una mejor visualización. Los datos del dispositivo de almacenamiento utilizado en el experimento al aire libre se trasladaron al ordenador con LogIT Lab, v.2.03 (SCC Research y DCP Microdevelopments, Reino Unido), y exportados a Excel para su análisis y representación gráfica. Los tests estadísticos utilizando la t-Student se realizaron con SPSS. La eficiencia alimentaria y el crecimiento relativo de los peces se valoraron mediante el cálculo respectivo del índice de conversión del alimento (FCR) y la tasa de crecimiento específico (SGR), de acuerdo con las fórmulas:

$$\text{FCR} = \text{Ingesta de alimento (g)} / \text{Incremento de la biomasa}$$

$$\text{SGR} = (\text{Ln [peso corporal final]} - \text{Ln [peso corporal inicial]}) / \text{días} * 100$$

La FAA fue cuantificada calculando, de forma individualizada, el tiempo transcurrido entre la hora de la alimentación y el aumento de la actividad anticipatoria (2,5 veces por encima de la actividad de referencia) sin inflexiones (Stephan, 1997). Se obtuvo el nivel de actividad de referencia calculando el número de veces que se interrumpía el haz de luz entre 8 y 12 h antes del encendido de las luces, para los experimentos LD; y antes de la hora de la alimentación, en el experimento 3 bajo condiciones de oscuridad constante (Aranda *et al.*, 2001a).

2.4. Resultados

- Ritmos de alimentación: actividad alimentaria voluntaria en interior y al aire libre

En interior. Cuando las tencas mostraron sus preferencias alimentarias mediante dispensadores a demanda, tanto la actividad alimentaria como la locomotora fueron estrictamente nocturnas (98% de la alimentaria y 99,3% de la locomotora). Tras instalar los dispensadores a demanda, la primera activación tuvo lugar el mismo día en dos de los acuarios, y al día siguiente en los otros cuatro. Sin embargo, varias tencas no aprendieron a hacer uso de los dispensadores (n=6), pues de un día para otro no se mantenía estable el número de demandas. Si se considera todo el periodo experimental en el que las tencas mantuvieron niveles de demanda relativamente estables, éstas activaron el comedero para demandar una cantidad diaria de alimento equivalente al 3,63% de su peso corporal. La actividad alimentaria fue bimodal y en fase con los ritmos de

actividad locomotora, alcanzando su nivel máximo al principio de la escotofase y presentando un segundo pico justo antes del encendido de las luces. En la Figura 1, se aprecian los niveles medios de actividad locomotora y alimentaria.

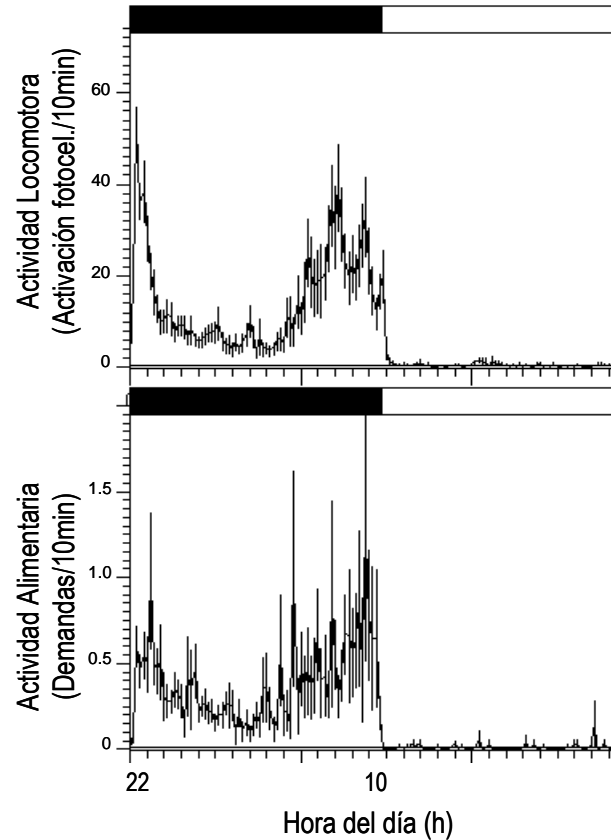


Fig. 1. Ondas de actividad locomotora y de alimentación media diaria en tencas individuales bajo condiciones de laboratorio (LD 12:12). Las barras negras en la parte superior de cada gráfico indican la duración de la fase de oscuridad. Los valores representan la media \pm SEM de seis animales durante los 60 días del experimento.

Al aire libre. Tanto el entorno natural como el hecho de estar en grupo sirvieron, al parecer, para estimular en los peces el uso y aprendizaje de los dispensadores automáticos. Las tencas empezaron a activar el sensor desde el primer día, alcanzando en 20 días un nivel de demanda estable de aproximadamente el 0,85% de su peso corporal (Fig. 2).

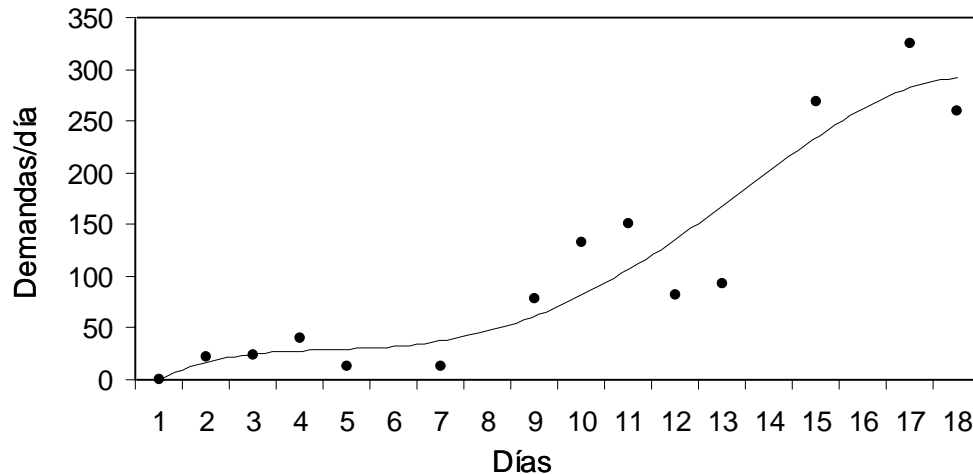


Fig. 2. Evolución de la actividad de alimentación voluntaria en tencas al aire libre (véase texto para más detalles). Los valores representan el número de demandas de alimento por día, registradas durante los 18 días siguientes a la instalación de los dispensadores automáticos.

Las pautas de demanda diaria de alimento fueron estrictamente nocturnas, sin incrementos significativos al anochecer o al amanecer, como ocurría en condiciones de laboratorio. Las demandas nocturnas (de las 18:50 h a las 4:10 h., coordenadas W006° 58', N38° 53', Astronomical Applications Dept., U.S. Naval Observatory, EEUU) supusieron el 93,1% de todas las demandas, un 6,2% tuvieron lugar por la mañana temprano (antes de las 8:30 h) y sólo un 0,7% durante el resto del día (Fig. 3).

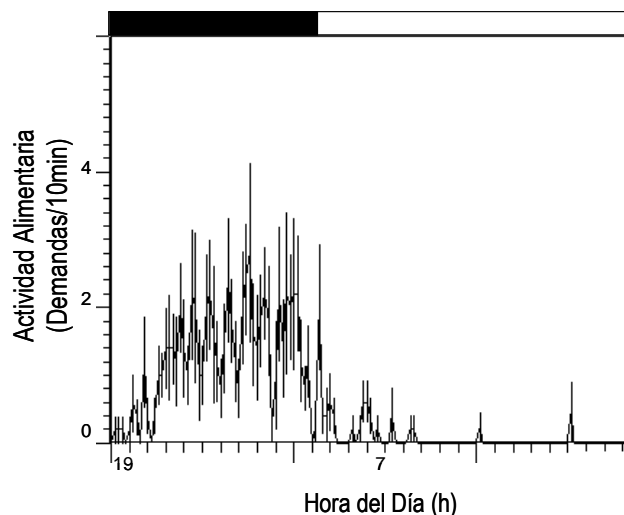
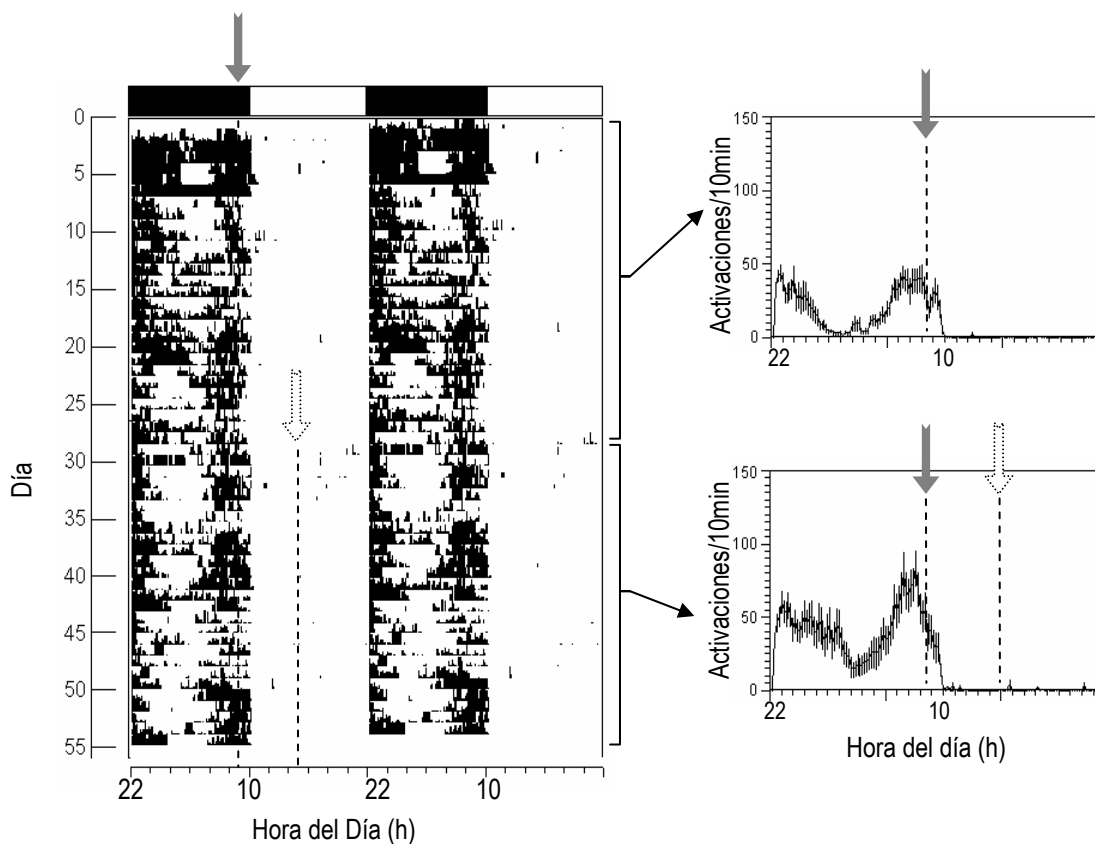


Fig. 3. Onda de la actividad diaria media de alimentación voluntaria en tencas al aire libre bajo el fotoperiodo natural (LD 15:9). Los valores representan la media \pm SEM ($n = 3$).

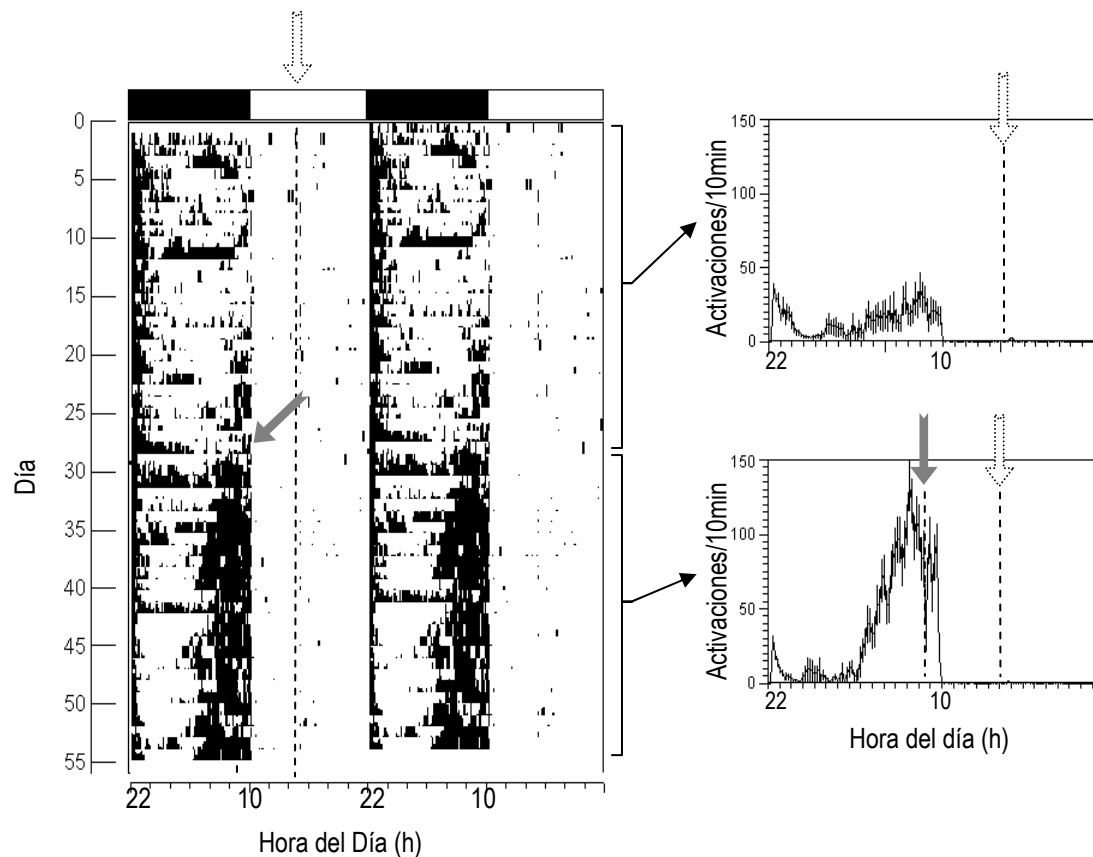
- Sincronización por la luz y por la alimentación de los ritmos locomotores bajo condiciones de LD

En el segundo experimento se comparó un grupo de peces alimentado durante una hora en la escotofase (Fig. 4A) con un segundo grupo alimentado de igual manera durante la fotofase (Fig. 4B).

Fig. 4. Actograma doble y ondas medias diarias de la actividad locomotora de las tenca en condiciones de alimentación programada. Las flechas en las ondas indican los momentos del día en los que un dispensador programable suministraba alimento con regularidad:



4A) Una tenca representativa del grupo de D-FEEDING. Durante los primeros 30 días, sólo se proporcionó alimento una vez al día antes del encendido de las luces; y luego se añadió una segunda comida a mitad de la fotofase durante otros 30 días. Obsérvese cómo los animales desplegaron una clara actividad anticipatoria previa a la comida nocturna, sin cambio aparente en la actividad locomotora tras introducir la comida diurna.



4B) Una tenca representativa del grupo de L-FEEDING. Mismos detalles experimentales que en el caso anterior, salvo que, en principio, el alimento sólo se suministró a mitad de la fotofase; la segunda comida se añadió una hora antes del encendido de las luces. La comida diurna no provocó ninguna actividad anticipatoria. Al proporcionar comida también durante la escotofase, los animales incrementaron significativamente su actividad locomotora nocturna, y también mostraron actividad anticipatoria.

Las pautas diarias de actividad locomotora fueron nocturnas en ambos grupos y, curiosamente, no se registró actividad locomotora en el grupo de L-FEEDING a la hora de la alimentación. Ambos grupos exhibieron un aumento de la actividad locomotora tras el apagado de las luces, y otro justo antes de su encendido (más evidente en el grupo de D-FEEDING). Este último aumento podría estar relacionado con la anticipación al alimento (FAA), puesto que superó en 2,5 veces la actividad de referencia en 4 de los 6 acuarios, con una duración de 240 ± 27 minutos antes de la comida. Las pautas nocturnas de actividad locomotora no presentaron ningún cambio al empezar a suministrar alimento a ambos grupos dos veces al día (véase Material y métodos). Con este nuevo horario de alimentación, el grupo de L-FEEDING se sincronizó con la alimentación nocturna y mostró actividad locomotora anticipatoria. En comparación, aunque se observó un

incremento de la actividad locomotora previa al encendido de las luces, al suministrar alimento también en este periodo (véase ondas medias diarias en la Fig. 4B) se produjo un aumento más acentuado de la actividad, tres veces mayor que la de referencia (FAA), en 5 de los 6 acuarios, con una duración de 276 ± 91 minutos. Al alimentar a los peces sólo una vez al día, se observó una mayor ingesta de alimento en el grupo de D-FEEDING durante los primeros días (Fig. 5A). Muy pronto, el grupo de L-FEEDING incrementó su tasa de alimentación superando incluso la del grupo de D-FEEDING y recuperándose de las raciones inferiores de los días anteriores. Al final, la ingesta de alimento en ambos grupos resultó estar bastante equilibrada, con niveles medios del 0,473% del peso corporal para el grupo de L-FEEDING y del 0,488% para el de D-FEEDING. Dado que ambos grupos ingirieron similares cantidades de alimento, no mostraron diferencias significativas en la SGR ni en el FCR (t-test para la SGR, $F = 1,419$; $P = 0,71$) (t-test para el FCR, $F = 1,675$; $P = 0,8$).

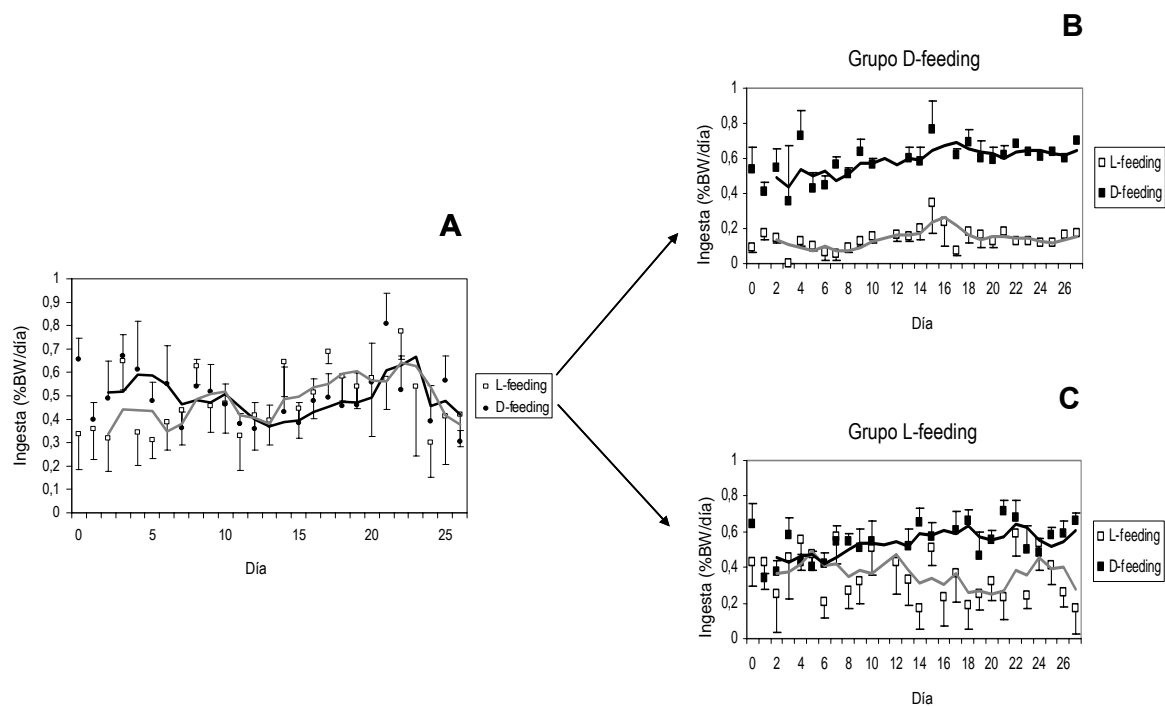


Fig. 5. (A) Media móvil de la ingesta de alimento representada por líneas, para tencas a las que se suministró sólo una comida diaria —bien durante la escotofase (D-FEEDING), bien durante la fotofase (L-FEEDING)—, los puntos representan la ingesta diaria de alimento. No se observaron diferencias significativas en la ingesta de alimento de ambos grupos. (B, C) Media móvil de la ingesta de alimento tras introducir una segunda comida diaria con el fin de proporcionar una comida diurna al grupo de D-FEEDING (B) y una comida nocturna al grupo de L-FEEDING (C). El grupo de D-FEEDING no cambió sus preferencias horarias, mientras que el grupo de L-FEEDING fue sincronizándose paulatinamente con la comida suministrada durante la escotofase.

Durante la segunda fase del experimento, en la que se dispensó comida a ambos grupos dos veces al día, los animales de D-FEEDING continuaron alimentándose de noche, como antes (Fig. 5B); mientras que los animales de L-FEEDING cambiaron su hora de alimentación de la fotofase a la escotofase, se alimentaron a buen ritmo desde el primer día y mostraron estar plenamente sincronizados con el nuevo horario nocturno a partir del sexto día (Fig. 5C).

- Sincronización por la hora de la alimentación de los ritmos locomotores en condiciones DD

Al alimentar a las tencas una vez al día a una hora fija en condiciones de DD, la actividad locomotora de todos los peces se sincronizó con la hora de la alimentación, y 7 de los 12 animales presentaron actividad anticipatoria (258 ± 34 min), mostrando una relación estable de la fase de actividad ("*fase alfa*") con la alimentación, concentrada alrededor de la hora de la alimentación (Fig. 6).

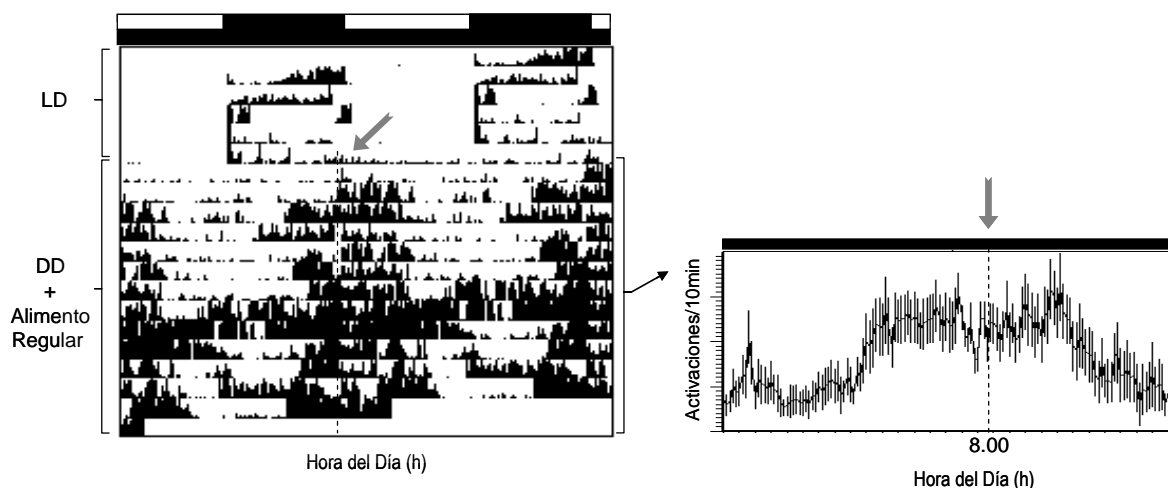
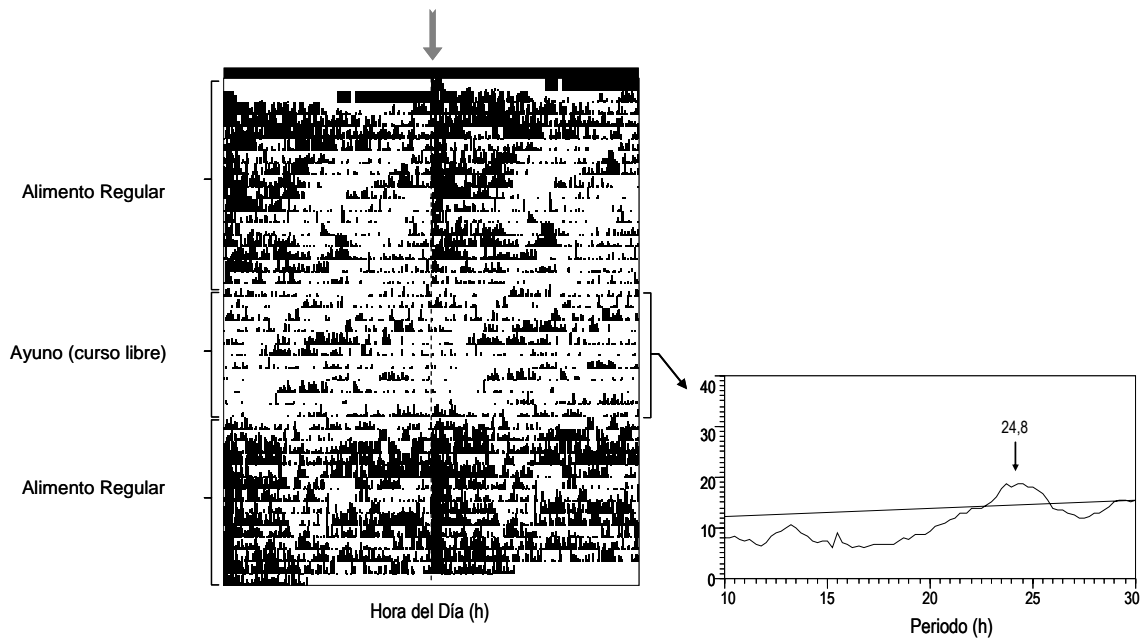


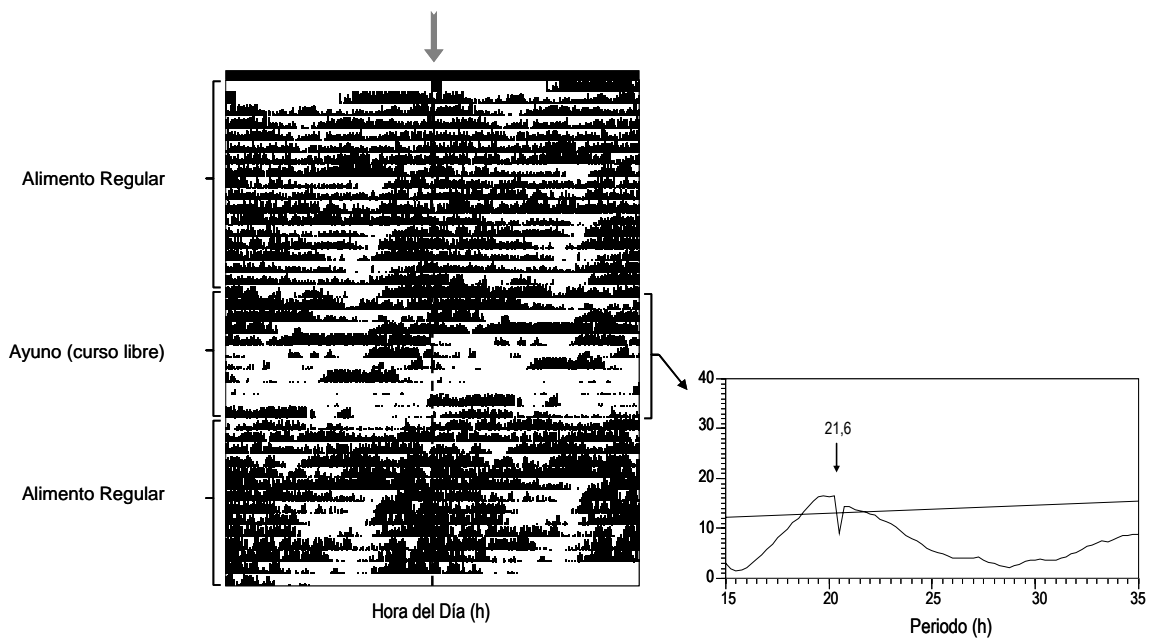
Fig. 6. Actograma de doble trazo (panel izquierdo) y onda media (panel derecho) de la actividad locomotora de una tenca representativa durante la transición de LD 12:12 a DD, con una comida diaria suministrada una hora antes del encendido de las luces (8:00 h), tal y como indica la flecha. Las barras blancas y negras en la parte superior de los gráficos indican las fases de luz y oscuridad, respectivamente. Los peces mostraron sincronización con la hora de la alimentación. Se observó actividad anticipatoria al alimento y actividad posterior a la alimentación.

Tras suministrar una comida diaria a las 8:00 h en condiciones de DD durante 15 días, se privó de alimento a los animales (Fig. 7).

Fig. 7. Actograma (panel izquierdo) y análisis del periodograma (panel derecho) representativos de tenca en condiciones de curso libre y DD. Al principio, se proporcionó alimento regularmente a las 8:00 h, y los peces se sincronizaron rápidamente con la hora de la alimentación. Más adelante, se interrumpió el suministro de alimento y los peces en ayuno entraron en curso libre. Por último, se restableció la alimentación regular: tras volver a la alimentación diaria programada y restringida, la mayoría de los peces se sincronizaron con gran rapidez.



7A) Ejemplo de tenca con periodo endógeno (τ) superior a 24h.



7B) Ejemplo de tenca con periodo endógeno (τ) inferior a 24h.

La ritmicidad persistió en condiciones de oscuridad total pese a la ausencia de comidas y 6 de los 12 peces mostraron ritmos circadianos de curso libre con periodos endógenos (*tau*) variables, como se aprecia en la Tabla 1.

Tabla 1. Análisis del periodograma de la actividad locomotora circadiana en tencas mantenidas en oscuridad constante (DD), tras suprimir la alimentación regular diaria.

Pez n.º	<i>Tau</i> (h)											
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
DD _{ayuno}	24.8	23.0	24.3	21.5	ns	ns	ns	21.5	21.6	ns	ns	ns

Se obtuvieron valores de *tau* significativos, calculados mediante análisis del periodograma, en el 50% de los acuarios (6 de 12), con valores medios de 24,5 h en los tanques con valores de *tau* mayores de 24 horas (n = 2) y de 21,9 h en aquellos con valores menores de 24 horas (n = 4). En DD, al restablecer la alimentación regular, fueron necesarios 1 ó 2 ciclos de transición para que los ritmos locomotores se resincronizaran con la hora de alimentación, de manera que *tau* fuera igual a 24 horas. Se observó actividad anticipatoria en 5 acuarios, cuatro de los cuales ya la habían mostrado en la fase anterior (Fig. 8).

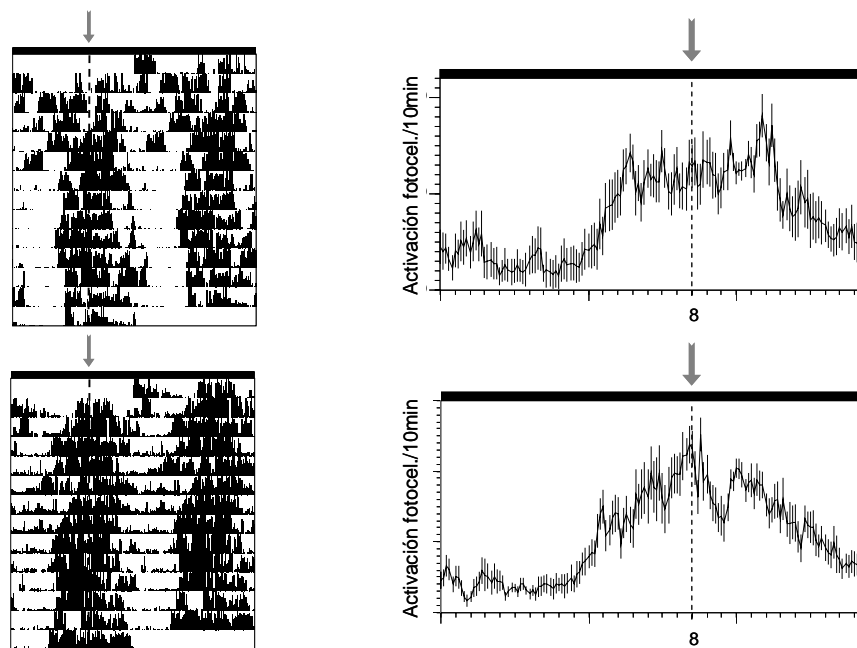


Fig. 8. Actograma de doble trazo (panel izquierdo) y onda media (panel derecho) de la actividad locomotora de dos tencas representativas, en condiciones de DD y una vez restablecida la alimentación

regular (8:00 h) tras un periodo sin estímulos alimentarios ni lumínicos (véase el experimento 3). La flecha indica la hora de la comida, y las barras negras en la parte superior de los gráficos representan las condiciones de oscuridad constante. Los peces mostraron sincronización con la hora de la alimentación, y pudo observarse tanto FAA como actividad posterior a la alimentación.

2.5. Discusión

Este estudio proporciona por vez primera, información sobre los ritmos alimentarios de la tenca, estrictamente nocturnos, cuya aplicación práctica puede ser de utilidad en la gestión de centros de acuicultura. Además, los ritmos de actividad locomotora y alimentaria aparecieron en fase, presentando ambos picos durante la escotofase. Si bien los ritmos natatorios y de alimentación no tienen por qué estar en fase en todas las especies de peces (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1996), tanto la actividad locomotora como la de alimentación de tencas mantenidas de forma individual en el laboratorio siguieron un patrón bimodal, que alcanzaba sus niveles máximos después del ocaso y antes del amanecer. Sin embargo, este patrón bimodal no apareció en el grupo de tencas mantenidas al aire libre, sino que fue sustituido por un patrón de alimentación estable a lo largo de toda la noche. En algunas especies de peces, la expresión de los ritmos circadianos de alimentación está influida por las interacciones sociales, y la conducta de alimentación varía dependiendo de si se mantiene a los peces en grupo o de forma individual (Kavaliers, 1980a; 1980b), tal y como ocurre con la trucha alpina (*Salvelinus alpinus*), cuyas pautas de alimentación individual cambian al ser agrupadas, según las jerarquías establecidas entre los distintos individuos (Brännäs *et al.*, 2005). En el caso del siluro europeo (*Silurus glanis*), los individuos por separado son arrítmicos, pero en grupos de tres o más aparecen ritmos de alimentación estables y estrictamente nocturnos (Boujard, 1995). Aun así, la diferencia en la conducta de los animales en interior o al aire libre podría atribuirse a las especiales condiciones de temperatura e intensidad lumínica constantes, y a la duración y transición de los fotoperiodos a los que fueron expuestos.

También fue diferente el periodo de tiempo que necesitaron ambos grupos para aprender a usar los dispensadores automáticos. Los estudios con lubinas han mostrado que el periodo que necesitan para aprender a utilizar el mecanismo mordiendo y tirando, es más corto cuanto mayor es el número de individuos del grupo (Rubio *et al.*, 2004). En el caso que nos ocupa, el periodo de aprendizaje de las tencas fue más corto al aire libre, puede que debido a la tendencia de la tenca a formar cardúmenes (Siegmund, 1969) o a un fenómeno estadístico relacionado con el tamaño del grupo.

En el segundo experimento, la actividad locomotora continuó siendo nocturna incluso cuando sólo se suministraba el alimento durante la fotofase (grupo de L-FEEDING). La comida en horario diurno no cambió los ritmos natatorios de los animales: siguieron siendo nocturnos, por lo que no exhibieron actividad locomotora anticipatoria previa a la hora de la alimentación. Esto significa que los peces de L-FEEDING sólo salían de su refugio (donde se escondían hasta la noche) tras recibir estímulos externos provenientes del alimento que caía en el agua; recogían algunos gránulos y volvían rápidamente a su refugio, sin más actividad locomotora hasta la escotofase. Por el contrario, se ha observado que otros ciprínidos de ritmos locomotores más flexibles, como el carpín dorado, concentran sus ritmos de actividad cerca de la hora de la alimentación (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1997); o que, como ocurre con el *Notemigonus crysoleucas* (Reebs y Laguë, 2000), muestran FAA independientemente de la fase en que se les dispense el alimento.

Las ventajas biológicas de la sincronización del sistema circadiano a comidas periódicas han sido analizadas al detalle (Sánchez-Vázquez y Madrid, 2001). En los mamíferos, los horarios de alimentación diaria pueden sincronizar ritmos circadianos de FAA, no sólo para respuestas conductuales (acercamiento hacia el reservorio de comida, ratones que corren en una rueda giratoria, etc.), sino también para funciones gastrointestinales y metabólicas, y muchos de estos ritmos persisten durante varios ciclos si se interrumpe la alimentación (Boulos y Terman, 1980). Diversos procesos biológicos se activan en previsión de acontecimientos externos periódicos, permitiendo al organismo evitar riesgos y aprovechar la comida disponible con mayor eficiencia (Sánchez-Vázquez y Madrid, 2001). Siguiendo este razonamiento, si el comportamiento estrictamente nocturno de las tencas y la anticipación al alimento que muestran en la oscuridad supone algún tipo de ventaja, cabría esperar diferencias entre los animales de L-FEEDING y los de D-FEEDING, en lo que respecta a la ingesta de comida o al crecimiento. Sin embargo, ni la ingesta se redujo cuando las tencas fueron alimentadas de día, ni su tasa de crecimiento muestra diferencias significativas con la de los animales de D-FEEDING. Estudios anteriores han documentado una tasa de crecimiento relativamente baja en tencas bajo condiciones de laboratorio (Steffens, 1995). Quizás un experimento de mayor duración, con mayor número de réplicas y/o bajo diferentes condiciones de mantenimiento, habría servido para revelar diferencias significativas en el crecimiento, ya que así ha ocurrido con otras especies de peces cuyo aprovechamiento de la alimentación fue mucho más eficiente al adaptarla a los ritmos de apetito propios de la especie (Kadri, 1991; Bolliet *et al.*, 2001a). No obstante, de acuerdo con nuestros resultados y teniendo en cuenta que la tenca es una especie estrictamente nocturna, es bastante notable la habilidad de este

pez para mantener la eficiencia y la ingesta de alimento cuando sólo dispone de comida durante la fotofase. Al observar que de día se alimentaban sin cambiar sus pautas de actividad y manteniendo sus tasas de crecimiento, podríamos suponer que sus preferencias nocturnas en la alimentación forman parte de una estrategia codificada en sus genes para eludir a los depredadores diurnos puesto que, en principio, las tencas también son capaces de alimentarse durante la fotofase si hay alimento disponible, dando base a la idea de que esta plasticidad les permite aumentar sus posibilidades de supervivencia en entornos variables.

El hecho de que los peces alimentados durante la escotofase fueran capaces de anticiparse al alimento supuso una diferencia importante entre los dos grupos. En realidad, la falta de actividad anticipatoria en los peces alimentados durante la fotofase es atribuible al efecto enmascarante de la luz, que inhibía su actividad locomotora durante el día.

En la siguiente fase del experimento, al dar la posibilidad a ambos grupos de alimentarse de día o de noche, quedó patente que las tencas prefieren alimentarse en la oscuridad. Estas preferencias de las tencas pueden ser relevantes para las estrategias de alimentación que siguen los centros de acuicultura. Como ya ha sido observado en experimentos de laboratorio aún no publicados, al suministrar alimento durante la fotofase sin retirarlo una hora después, como sí ocurría en nuestro experimento, sino dejándolo en los tanques, las tencas pueden llegar a esperar hasta la noche para alimentarse, dando lugar a que la comida pierda propiedades nutritivas. Es más, no respetar los ritmos naturales de alimentación puede ser causa de estrés, con el consiguiente efecto negativo en el bienestar de los animales. Por tanto, habiendo expuesto en este estudio la capacidad que tienen las tencas de alimentarse a voluntad, se recomienda usar dispensadores que les permitan hacerlo, para que las tencas se alimenten de acuerdo con sus ritmos nocturnos de alimentación.

Además, observamos que en el grupo de L-FEEDING se produjo un importante incremento de la actividad previa al encendido de las luces cuando también comenzaron a recibir comida durante la escotofase, comportamiento no observado mientras sólo fueron alimentadas durante la fotofase. Se trata de una conducta bastante peculiar, puesto que se evidenció la existencia de actividad locomotora anticipando el encendido de las luces y la comida. Estos resultados sugieren que, hasta cierto punto, el incremento de actividad previa al encendido de las luces interactuó con la FAA, provocando que aumentara su intensidad. Más aún, la capacidad de anticiparse al alimento

indicaba que, de alguna manera, la hora de la alimentación sincronizaba los ritmos de las tencas y actuaba como un auténtico *zeitgeber*.

Para probar que la hora de la alimentación actuaba como un verdadero sincronizador al suministrar comida según un horario regular, los peces se mantuvieron en oscuridad constante, evitando así los efectos enmascarantes de la luz. Bajo tales condiciones no entraron en curso libre y la alimentación programada consiguió sincronizar los ritmos locomotores. Estos resultados son coherentes con un modelo LEP-FEP en el que, tras eliminar los estímulos lumínicos, el suministro regular del alimento sirve para encarrilar la actividad locomotora (FEP). Algunos animales, además, mostraron anticipación al alimento. No obstante, esta situación es compatible también con un modelo de LEP único, en el que la fase LD está tan bien memorizada que, tras imponer condiciones de DD, el ciclo endógeno persiste durante unos días, y si la actividad del marcapasos se mantiene suficientemente, aparece FAA durante ese periodo (Reebs y Lagüë, 2000). No obstante, al suprimir la alimentación regular en estas condiciones de oscuridad constante, los ritmos locomotores entraron en curso libre en seis de los tanques; además, al restablecerla, los peces volvieron a sincronizarse y la mitad de ellos mostró FAA. Este comportamiento no puede explicarse mediante un modelo de LEP único en el que, tras entrar los peces en curso libre, no habría otro estímulo aparte de la luz para sincronizarse; puesto que en este experimento la alimentación sincronizó la actividad de los peces y lo que es más, generó FAA. En los vertebrados superiores, el periodo endógeno expresado bajo condiciones de curso libre es muy estable, pero se han observado valores de *tau* variables en muchas especies de peces. En el primer capítulo de la presente tesis, sobre sincronización de la actividad por la luz en tencas, también se han observado valores de *tau* variables con proporciones similares a los de la sincronización por la alimentación. Siguiendo la definición de encarrilamiento, la alimentación diaria programada y restringida actuó como sincronizador para las tencas. En otras especies, tales como el *Misgurnus anguillicaudatus* (Naruse y Oishi, 1994) y el *Salmo salar* (Juell *et al.*, 1994), también se ha observado que la alimentación suministrada con regularidad actúa como sincronizador. Sin embargo, se han realizado pocos experimentos para probar de forma funcional el FEP en los peces. Se han utilizado diferentes procedimientos experimentales para probarlo en truchas (Bolliet *et al.*, 2001b), lubinas (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1995a) y carpines dorados (Aranda *et al.*, 2001; Sánchez-Vázquez *et al.* 1997); pero los resultados no siempre han permitido distinguir si los ritmos habían sido sincronizados por un único LEP con un marcapasos suficientemente mantenido o por un FEP. Al suministrar comida a la lubina —una especie con dualidad de fase— sólo durante la fase contraria (luz u oscuridad) a la que utiliza para alimentarse, sus pautas de alimentación cambiaron consecuentemente (Sánchez-

Vázquez *et al.*, 1995a), sugiriendo que la comida puede ser uno de los factores que determinan que el sistema circadiano cambie de diurno a nocturno o viceversa. Por el contrario, en otras especies de peces tales como el *Piaractus brachipomus*, los patrones de actividad locomotora están sincronizados principalmente por la alternancia entre el día y la noche, viéndose poco influenciados por la disponibilidad de alimento (Baras, 2000). Este fue el caso también de las tencas, que no sólo comieron siguiendo sus ritmos diarios de alimentación nocturna, sino que lo hicieron a su vez durante la fotofase, sin sincronizar su actividad locomotora. A pesar de todo, cuando se eliminaba la luz en experimentos en oscuridad constante, los peces continuaban sincronizando su actividad locomotora basándose en la información alimentaria; esto no concuerda con la teoría de un LEP único, puesto que los peces no sólo se sincronizaron a la luz, sino que mantuvieron pautas locomotoras organizadas cuando se les suministró comida diariamente a la misma hora, en condiciones de oscuridad, respaldando y confirmando así la existencia de un FEP, que se enmascara fácilmente por la luz.

En resumen, tanto los ritmos locomotores como los de alimentación voluntaria de las tencas mostraron ser estrictamente nocturnos. Aunque no se apreciaron diferencias en la ingesta de alimento entre los peces alimentados de día y los alimentados de noche, se mantuvo su patrón nocturno de actividad locomotora, y sólo mostraron FAA cuando se les proporcionó alimento durante la escotofase. Bajo condiciones de DD, la alimentación programada sincronizó la actividad locomotora de las tencas, que entró en curso libre en 6 de los 12 tanques al suprimir la comida y se resincronizaron al restablecer la alimentación. Los resultados obtenidos sugieren que la hora de la alimentación actúa como sincronizador, encarrilando un FEP que queda fácilmente enmascarado por la luz.

2.6. Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por los proyectos AGL2001-0593-C03-01 del MCYT y Acción Concertada EU-QLRT-2001-00989 concedido a FJSV. Los autores quieren expresar su agradecimiento a todo el personal del Centro de Acuicultura «Las Vegas del Guadiana» (Badajoz, España), y en especial a P. Moreno y C. Fallola, por su ayuda con el experimento al aire libre.

2.7. Referencias bibliográficas

Adron, J.W.; Grant, P.T.; Cowey, C.B. 1973. A system for the quantitative study of the learning capacity of rainbow trout and its application to the study of food preferences and behavior. *J. Fish Biol.* 5: 625-636.

Aranda, A.; Madrid, J.A.; Sánchez-Vázquez, F.J. 2001a. Influence of light on feeding anticipatory activity in goldfish. *J. Biol. Rhythms.* 16: 56-65.

Baras, E. 2000. Day-night alternation prevails over food availability in synchronising the activity of *Piaractus brachypomus* (Characiadae). *Aquat. Living Resour.* 13: 115-120.

Bolliet, V.; Mezian, A.; Boujard, T. Effects of feeding time on feed intake and growth. 2001a. En: D. Houlihan; M. Jobling; T. Boujard, eds. *Food intake in fish.* Oxford. Blackwell Science Ltd.: 233-249.

Bolliet, V.; Aranda, A.; Boujard, T. 2001b. Demand-feeding rhythms in rainbow trout and European catfish. Synchronisation by photoperiod and food availability. *Physiol. Behav.* 73: 625-633.

Boujard, T.; Leatherland, F. 1992. Circadian rhythms and feeding time in fish. *Environ. Biol. Fish.* 35: 109-131.

Boujard, T. 1995. Diel rhythms of feeding activity in the European catfish, *Silurus glanis*. *Physiol. Behav.* 58: 641-645.

Boulos, Z.; Terman, M. 1980. Food availability and daily biological rhythms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 4: 119-131.

Brännäs, E.; Berglund, U.; Eriksson, L.O. 2005. Time learning and anticipatory activity in groups of Arctic charr. *Ethology*, 111: 681-692.

Edmons, S.C.; Adler, N.T. 1977. Food and light as entrainers of circadian running activity in the rat. *Physiol. Behav.* 18: 915-919.

Emery, A.R. 1973. Preliminary comparisons of day and night habits of freshwater fish in Ontario lakes. J. Fish. Res. Board Can. 30: 761-774.

Jilge, B.; Stähle, H. 1993. Restricted food access and light-dark: Impact of conflicting zeitgebers on circadian rhythms of the rabbit. Am. J. Physiol. 264: 708-715.

Juell, J.E.; Ferno, A.; Furevik, D.M.; Huse, I. 1994. Influence of hunger level and food availability on the spatial distribution of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in sea cages. Aquacult Fish Manage. 25: 439-451.

Kadri, S.; Metcalfe, N.; Huntingford, A. Thorpe, J.E. 1991. Daily feeding rhythms in Atlantic salmon in sea cages. Aquaculture. 92: 219-224.

Kavaliers, M. 1979. Pineal involvement in the control of circadian period of the lake chub, *Couesius plumbeus*. J. Exp. Zool. 209: 33-40.

Kavaliers, M. 1980a. Circadian activity of the white sucker, *Catostomus commersoni*: comparison of individuals and shoaling fish. Can. J. Zool. 58: 1399-1403.

Kavaliers, M. 1980b. Social groupings and circadian activity of the killifish, *Fundulus heteroclitus*. Biol. Bull. 158: 69-76.

Landless, P.J. 1976. Demand-feeding behaviour of rainbow trout. Aquaculture. 7: 11-25.

Madrid, J.A.; Boujard, T.; Sánchez-Vázquez, F.J. Feeding rhythms. 2001. En: D. Houlihan; M. Jobling; T. Boujard, eds. Food intake in fish. Oxford. Blackwell Science Ltd.: 189-215.

Mistlberger, R.E. 1994. Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanism. Neurosci. Biobehav. Rev. 18: 171-195.

Molina-García, A.; Claver-Farías, I.; García-Martínez, I. Situación actual de la acuicultura en España. 1999. En: Libro blanco de la Acuicultura en España. Madrid. Centro de Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación: 39-70.

Naruse, M.; Oishi, T. 1994. Effects of light and food as zeitgebers on locomotor activity rhythms in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. Zool. Sci. 11: 113-119.

Oishi, T. Fishes. 1991. En Y. Chiba; K. Takahashi, eds. Handbook of Chronobiology. Tokyo. Asakura Shoten: 69-78.

Reeb, S.G.; Laguë, M. 2000. Daily food-anticipatory activity in golden shiners: a test of endogenous timing mechanisms. Physiol. Behav. 70: 35-43.

Reeb, S.G. 2002. Plasticity of diel and circadian rhythms in fishes. Rev. Fish Biol. Fisher. 12: 349-371.

Rozin, P.; Mayer, J. 1961. Regulation of food intake in the goldfish. Am. J. Physiol. 201: 968-974.

Rubio, V.C.; Vivas, M.; Sánchez-Mut, A.; Sánchez-Vázquez, F.J.; Coves, D.; Dutto, G.; Madrid, J.A. 2004. Self-feeding on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) under laboratory and farming conditions using a string sensor. Aquaculture. 233: 393-403.

Sánchez-Vázquez, F.J.; Zamora, S.; Madrid, J.A. 1995a. Light-dark and food restriction cycles in sea bass: effect of conflicting zeitgebers on demand-feeding rhythms. Physiol. Behav. 58: 705-714.

Sánchez-Vázquez, F.J.; Madrid, J.A.; Zamora, S. 1995b. Circadian rhythms of feeding activity in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L: dual phasing capacity of diel demand-feeding pattern. J. Biol. Rhythms. 10: 256-266.

Sánchez-Vázquez, F.J.; Madrid, J.A.; Zamora, S.; Iigo, M.; Tabata, M. 1996. Demand-feeding and locomotor circadian rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*: dual and independent phasing. Physiol. Behav. 60: 665-674.

Sánchez-Vázquez, F.J.; Madrid, J.A.; Zamora, S.; Tabata, M. 1997. Feeding entrainment of locomotor activity rhythms in the goldfish is mediated by a feeding-entrainable circadian oscillator. J. Comp. Physiol. 181: 121-132.

Sánchez-Vázquez, F.J.; Madrid, J.A. Feeding Anticipatory Activity. 2001. En: D. Houlihan; M. Jobling; T. Boujard, eds. Food intake in fish. Oxford. Blackwell Science Ltd.: 216-232.

Siegmund, R. 1969. Lokomotorische Aktivität und Ruheverhalten bei einheimischen Süßwasserfischen (*Pisces, Percidae, Cyprinidae*). Biol. Zbl. 88: 295-312.

Spieler, R.E. Feeding-entrained circadian rhythms in fishes. 1992. En M.A. Ali, ed. Rhythms in Fishes. New York. Plenum: 137-147.

Steffens, W. 1995. The tench, a neglected pond fish species. Pol. Arch. Hydrobiol. 42: 161-180.

Stephan, F.K. 1986. Interaction between light- and feeding-entrainable circadian rhythms in the rat. Physiol. Behav. 38: 127-133.

Stephan, F.K. 1997. Calories affect zeitgeber properties of the feeding entrained circadian oscillator. Physiol. Behav. 62: 995-1002.

3. RITMOS DIARIOS DE SELECCIÓN DE MACRONUTRIENTES MEDIANTE ALIMENTADORES A DEMANDA EN EJEMPLARES DE TRUCHA ALPINA (*Salvelinus alpinus*) MARCADOS INDIVIDUALMENTE

M.J. Herrero¹, E. Brännäs², J.A. Madrid¹ y F.J. Sánchez-Vázquez¹

¹ Universidad de Murcia. Departamento de Fisiología. Facultad de Biología. 30100 Murcia.

² Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas. Departamento de Acuicultura. S-901 83. Umeå, Suecia.

3.1. Resumen

El propósito de este estudio es probar la viabilidad de una nueva técnica que combina el uso de marcas electrónicas internas (*PIT tags*) con alimentadores a demanda, para profundizar en el conocimiento de la conducta alimentaria y la selección dietaria en individuos dentro de un grupo de peces. Para ello, se distribuyeron grupos de 20 truchas alpinas (*Salvelinus alpinus*) marcadas con *PIT tags* (*Passive Integrated Transponder*) en cuatro tanques. En cada tanque se instalaron tres dispensadores a demanda, que inicialmente liberaban una dieta estándar. Más tarde, se rellenó cada uno de los dispensadores con diferentes dietas incompletas de macronutrientes que, adecuadamente combinadas, podían proporcionar una dieta completa. Posteriormente se procedió a intercambiar el contenido de los dispensadores y por último, se estudió aisladamente a los individuos más activos de cada tanque, para comprobar si defendían la dieta previamente seleccionada. Nuestros resultados mostraron que los dispensadores fueron accionados por uno o varios peces dominantes (máximo 4 individuos, en la mayoría de los tanques), que se los repartieron espacial y temporalmente, de forma que cada pez se decantó por dispensadores específicos en diferentes momentos. En algunos casos, esta territorialidad impidió que, tras el aislamiento de los individuos más activos, se mantuvieran los patrones de selección previos. Los porcentajes de macronutrientes seleccionados fueron: un 52,8% de proteína, un 20,2% de lípidos y un 27% de carbohidratos (existiendo diferencias entre individuos, entre tanques o tras el aislamiento de los más activos). Este estudio prueba la utilidad de la técnica, por lo que se espera que se convierta en una metodología rutinaria dentro de la investigación alimentaria y conductual. Asimismo, se discuten las mejoras a realizar para el perfeccionamiento de esta metodología.

Palabras clave: conducta alimentaria, ritmos alimentarios, selección dietaria, dietas de macronutrientes, ingesta, dominancia, jerarquía, individuo, *PIT tags*, trucha alpina, *Salvelinus alpinus*.

3.2. Introducción

Desde que fueron desarrollados los alimentadores a demanda, dispositivos que permitían a los peces demandar comida accionando un resorte (Rozin y Mayer, 1961; Adron *et al.*, 1973; Landless, 1976), se ha investigado exhaustivamente la conducta de alimentación voluntaria de diversas especies de peces. La mayoría de investigadores ha utilizado dicho sistema de alimentación para estudiar los ritmos alimentarios y diseñar así estrategias adecuadas para su alimentación en acuicultura (Madrid *et al.*, 2001).

Además, los alimentadores a demanda se han utilizado también en experimentos de selección múltiple en los que, usando dos o más dispensadores, se ha estudiado la preferencia de los peces por diferentes dietas completas, diferentes tamaños de los gránulos de alimento e incluso por colores determinados (Kentouri *et al.*, 1995; Alanärä y Brännäs, 1993; Linner y Brännäs, 1994). Otros estudios sobre selección de macronutrientes han probado no sólo la capacidad de los peces para seleccionar voluntariamente una dieta adecuada, sino también los beneficios de alimentar a los peces mediante composiciones dietarias basadas en dietas seleccionadas voluntariamente, puesto que una composición alimentaria apropiada optimiza la ingesta de alimento y sirve para compatibilizar el bienestar de los animales con los sistemas de producción (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1998a; Sánchez-Vázquez *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2003). Sin embargo, no se ha estudiado aún la forma en que la selección dietaria de cada individuo influye en la selección final del grupo.

Los grupos de truchas alpinas ubicados en tanques, se organizan según una jerarquía bien definida (Noakes, 1980) y algunos individuos dominantes presentan más actividad que otros (Winberg *et al.*, 1993; Höglund *et al.*, 2001). La jerarquía social consigue resolver la pugna por los recursos mediante señales sociales, tales como el oscurecimiento de la piel, que indican subordinación y reducen la pérdida de energía y el número de disputas innecesarias (O'Connor *et al.*, 1999; Höglund *et al.*, 2000). Los individuos dominantes, tratando de monopolizar la comida, los lugares donde resguardarse y las oportunidades reproductivas, ocupan las mejores zonas en ambientes heterogéneos (Harwood *et al.*, 2003). Existen diferentes factores que pueden influir en la dominancia, tales como las diferencias innatas (por motivos genéticos o maternas), el tamaño, la

experiencia social previa o el hecho de llegar primero a un sitio (*prior residency*) (Sloman *et al.*, 2002). La formación de jerarquías sociales estables puede ocurrir tras agresiones entre los individuos, tales como persecuciones y mordeduras. Tras el establecimiento de la jerarquía, las interacciones sociales pueden provocar el incremento de las concentraciones plasmáticas de cortisol en los miembros subordinados, así como una inhibición general de su comportamiento (Larson *et al.*, 2004; Gilmour *et al.*, 2005). Esta inhibición conductual ha permitido que se utilicen las marcas electrónicas mediante *PIT tags*, identificando a los individuos que realizan las demandas, como un método para estudiar las jerarquías en los peces (Alanära y Brännäs, 1993; Brännäs *et al.*, 1994; Alanära y Brännäs, 1996). Otras técnicas para estudiar el comportamiento de un individuo dentro de un grupo, consisten en la observación directa o la grabación en vídeo de los peces marcados, sin embargo requieren un mayor esfuerzo tanto para la adquisición de datos como para el análisis de los resultados. Se han llevado a cabo algunos estudios interesantes acerca de la dominancia en diferentes especies de peces; pero, hasta donde nosotros sabemos, nunca se ha investigado el efecto de la dominancia en la selección dietaria.

Los experimentos realizados con dispensadores a demanda en truchas y truchas alpinas a las que se suministra una dieta única, revelan que un alto porcentaje de las demandas las efectúan los mismos individuos, mientras que los otros peces sólo accionan los dispensadores en raras ocasiones (Alanära y Brännäs, 1996). Los individuos dominantes no sólo accionan el mecanismo para alimentarse ellos mismos, sino que también lo hacen para alimentar al resto de los peces del tanque (Alanära y Brännäs, 1996). Sin embargo, los dominantes suelen crecer más y mejor que el resto de individuos; además, éstos últimos suelen presentar un nivel más elevado de hormonas de estrés, lo que podría contribuir a retardar su crecimiento (Eijke y Schreck, 1980; Gilmour *et al.*, 2005).

En relación con los ritmos de alimentación, se ha descrito que los grupos de truchas alpinas se alimentan durante las 24 horas del día (Johnston, 2002). En primavera, otoño e invierno, la máxima actividad alimentaria se produce en el periodo comprendido entre el ocaso y el alba, mientras que en verano la actividad alimentaria se hace más diurna (Jørgensen y Jobling, 1989). Este patrón de actividad depende en su mayor parte de la disponibilidad de alimento, lo que lleva a pensar que, durante el periodo en el que los peces se alimentan más, sus ritmos se hacen menos estrictos con el fin de tener un mejor acceso a los recursos, garantizando una alimentación más eficaz que asegure un crecimiento óptimo. La preferencia por la alimentación nocturna durante el invierno podría ser el resultado de la búsqueda de un punto de equilibrio entre la abundancia de

alimento y la disminución del riesgo que suponen los predadores de sangre caliente, tales como aves o mamíferos (Fraser *et al.*, 1993; Fraser *et al.*, 1995).

Pero los patrones diarios de ingesta de alimento pueden explicarse también mediante las interacciones sociales específicas del grupo, puesto que los peces subordinados cambian sus ritmos de actividad diarios (y aceptan el estrés que esto conlleva), con el fin de evitar la competencia con los peces dominantes, tal y como se ha observado en el *Ictalurus punctatus* (Randolph y Clemens, 1976), el salmón del Atlántico (Kadri *et al.*, 1997), la trucha común (Alanära y Brännäs, 1997; Alanära *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002) y la trucha alpina (Alanära y Brännäs, 1997). En estos grupos de peces en los que algunos individuos son nocturnos y otros diurnos, se dice que existe dualismo concurrente (Alanära y Brännäs, 1997).

El alto precio de la trucha alpina y sus elevadas tasas de crecimiento (tanto a bajas temperaturas como en altas densidades), han contribuido a extender su explotación en acuicultura (Heasman y Black, 1998). En su entorno natural, la trucha alpina es carnívora, se alimenta de una gran variedad de criaturas acuáticas y terrestres y puede tardar 10 años en alcanzar un peso de 3 kg. En condiciones de explotación intensiva, se consigue este peso en menos de 4 años mediante el control de la temperatura del agua, la luz y el suministro de una dieta de alta energía; pero una mayor comprensión de la nutrición y de las prácticas alimentarias de esta especie reduciría aún más este tiempo (Johnston, 2002).

El objetivo principal de este estudio ha sido analizar por primera vez la efectividad de una técnica nueva, que combina el uso de dispensadores a demanda conteniendo dietas incompletas de macronutrientes, con el uso de marcadores electrónicos (*PIT tags*) que permiten registrar el comportamiento de un individuo dentro de un grupo de peces. Con este fin, se ha investigado la conducta alimentaria individual de truchas alpinas marcadas con *PIT tags* y su capacidad para seleccionar voluntariamente una composición dietaria, mediante el uso de dispensadores a demanda que liberaban dietas cuya composición en macronutrientes era incompleta PF, PC y PFC (P = proteína, F = grasa y C = carbohidratos).

3.3. Material y métodos

Animales e infraestructura

El experimento se realizó en una habitación aislada del laboratorio para la investigación con peces de la Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas (Umeå, Suecia). Se utilizaron 4 tanques de 1 m³ con 20 truchas alpinas en cada uno, desde enero (temperatura alrededor de los 6°C) hasta julio (temperatura aproximada de 18°C). El sistema de seguimiento utilizado para identificar a los peces se basó en marcas con un transmisor pasivo integrado (*PIT tags* o marcas PIT), inyectadas con varios meses de antelación en una estrecha zona localizada en el área posterior de la aleta pectoral de cada individuo (Brännäs y Alanärä, 1993). El agua de los tanques fue filtrada y oxigenada, manteniéndose constante su salinidad en 3 g/kg. Los animales se expusieron a un ciclo luz-oscuridad de LD12:12 (de 8:00 a 20:00 h), generado mediante tubos fluorescentes situados sobre los tanques y conectados a un reloj programable.

En cada tanque se instalaron 3 dispensadores a demanda (Sternor START FEEDER 907, Suecia) equidistantes a lo largo del borde del tanque, provistos de un sensor de estiramiento para reducir la posibilidad de activación accidental, y de temporizadores electrónicos para controlar el tiempo durante el que suministran alimento y ajustar así la recompensa. El sensor, del tipo “morder y tirar”, consistía en un hilo de pesca con una bola de plástico en su extremo con forma de gránulo, suspendido a unos 5 cm bajo la superficie del agua. La recompensa que obtenían los peces tras su activación era de 0,61 g de alimento granulado (aproximadamente 6 gránulos). Junto a cada resorte, una antena reconocía por sus marcas electrónicas (*PIT tags*) al individuo que accionaba el mecanismo (Brännäs y Alanärä, 1993). Un ordenador recibía la señal generada y almacenaba los siguientes datos: hora, tanque, dispensador e individuo. Se comprobó a diario el correcto funcionamiento de los dispensadores y el nivel de alimento, rellenándolo con una dieta estándar en la primera fase del experimento y con dietas incompletas de macronutrientes en las siguientes fases.

La ingesta total de los peces se calculó indirectamente a partir de las señales registradas por la antena. Para comprobar la efectividad del método, se llevaron a cabo anotaciones de la cantidad de pienso con la que se rellenaba cada comedero en dos de los cuatro tanques, comparándose esta cifra con la deducida a partir de los registros de la antena.

Se seleccionaron truchas alpinas de tamaño similar, cuyo peso corporal no difiriera en más de un 25%, con el fin de reducir la agresividad entre los individuos. Los peces escogidos no habían alcanzado la madurez, y presentaban un peso medio de 60-70 g al principio del experimento. La densidad de almacenamiento fue de unos 20 kg/m³.

Dietas experimentales

En la primera fase del experimento, se utilizó la siguiente proporción de macronutrientes en la dieta estándar (expresados como porcentaje del total de macronutrientes en materia seca): P = 58%, F = 29% y C = 13% (Tabla 1). Durante la segunda fase experimental, se dispusieron tres dietas incompletas de macronutrientes en sendos dispensadores a demanda, con el fin de que los peces se vieran obligados a demandar de todos ellos para regular la ingesta de nutrientes específicos. La proporción de cada dieta fue: PF = 75:25; PC = 75:25 y PFC = 10:45:45. Las cantidades de otros nutrientes, tales como vitaminas y sales minerales, fueron suficientes para cubrir las necesidades generalmente aceptadas para los peces (da Silva y Oliva-Teles, 1998).

TABLA 1

COMPOSICIÓN DE LA DIETA

	PC	PF	PFC	Estándar
Ingredientes (g/100 g de dieta)				
Caseína y gelatina (6:1)	55,4	55,4	7,39	43,5
Dextrina	18,475	0,0	33,255	9,75
Grasa*	0,0	18,475	33,255	21,75
Vitaminas + minerales	2,0	2,0	2,0	2,0
CO ₃ Ca/(PO ₃ H)Ca	4,0	4,0	4,0	4,0
Almidón	15,5	15,5	15,5	15
Alginato de Na	4,6	4,6	4,6	4

% Macronutrientes

Proteínas	75	75	10	58
Carbohidratos	25	0,0	45	13
Grasa	0,0	25	45	29

* Aceite de pescado: Aceite de soja (3:1)

* Dieta comercial estándar: 50% P, 25% F, 11,2% C, 8.8% Cenizas, 5% Humedad.

Procedimiento experimental

El experimento constó de 4 fases diferentes:

- a. Fase 1: dieta estándar. El diseño de la primera fase del experimento buscó facilitar a los peces los procesos de aclimatación al laboratorio y el aprendizaje del uso del dispensador a demanda. Para ello, se rellenaron con dieta estándar los tres dispensadores de cada tanque. Una vez alcanzada una demanda estable, empezó la segunda fase del experimento con las dietas de macronutrientes.
- b. Fase 2: dietas de macronutrientes. Se elaboraron dietas con fórmulas incompletas, con el fin de forzar a los peces a seleccionar entre los tres dispensadores para obtener una dieta completa y equilibrada. La composición de las dietas se ha representado según el modelo triangular propuesto por Aranda *et al.* (2000), donde cada eje representa el porcentaje de un macronutriente: las intersecciones señalan la composición de la dieta seleccionada (Fig. 5).
- c. Fase 3: intercambio del contenido entre dos dispensadores. Tras cuarenta días de registro, se intercambió el contenido de dos de los dispensadores automáticos con dietas PF y PC respectivamente, en dos de los cuatro tanques (tanque 1 y 2), para comprobar si los peces defienden la composición de la dieta seleccionada previamente.
- d. Fase 4: eliminación de los peces con bajo nivel de demandas. Como prueba final, se dejó solos en los tanques a los peces más activos, con el fin de investigar en mayor profundidad el papel de los individuos en la selección de macronutrientes. En los tanques 1 y 3 sólo se dejó un pez por tanque. En los tanques 2 y 4 quedaron, respectivamente, ocho y nueve individuos.

Análisis de datos

Los datos obtenidos por el sistema de registro fueron sometidos a un primer procesamiento mediante sendos programas diseñados por Sánchez-Vázquez en Q-basic. El primero de ellos eliminaba los registros provocados por la mera proximidad de los peces a la antena, para dejar sólo los registros asociados a activaciones de los comederos. El segundo programa agrupaba los datos previamente seleccionados en intervalos de diez minutos, para poder procesarlos con el programa de análisis de series temporales, El Temps v. 1.179 (Díez-Noguera) y obtener tanto actogramas dobles (escala temporal de 48 h) de la actividad alimentaria, como ondas medias diarias. Dentro de cada grupo, se definió como peces activos aquellos cuyas activaciones del sensor supusieron más de un 3-7% de las demandas totales. Mediante la hoja de cálculo Excel (Microsoft), se determinó el número de actuaciones de cada pez y se hizo una representación para cada dispensador, con el fin de estudiar la selección dietaria individual y la selección total de cada tanque. Cada individuo se codificó mediante dos números, separados por un punto: el primero indicaba el tanque; el segundo, el puesto concreto dentro del ranking de actividad de los individuos, clasificados de mayor a menor actividad, teniendo en cuenta el número de demandas voluntarias realizadas en la primera fase del experimento. Así, el pez #1.2 era el segundo individuo más activo del tanque 1.

3.4. Resultados

Se registraron las demandas de todos los tanques durante las 24 h del día, observándose en los individuos más activos una ligera tendencia a la alimentación nocturna (69,5% de demandas nocturnas, frente a un 30,5% de demandas diurnas durante los primeros días del experimento). En todos los tanques, de 1 a 4 peces de los 20 presentes accionaban el sensor con mayor frecuencia, realizando de un 60% a un 85% de las demandas totales (Fig. 1).

En el tanque 1, durante aquellas fases del experimento en las que hubo 20 peces por tanque, el individuo más activo realizó de media un 25,9% de las actuaciones totales, el segundo más activo supuso el 21,3%, mientras que el tercero fue el causante de un 18,7%. El resto de los peces completó el 34,2% restante, con 3 de ellos presentando una mayor actividad que los otros, con registros individuales en un rango del 4-7%. De forma parecida, en el tanque 2 hubo un pez que realizó el 32% de las demandas y los 3 siguientes activaron el sensor de alimentación en un 20,7%,

16,8% y 12%, respectivamente; mientras que otros dos peces llevaron a cabo cada uno un 4,5% de las demandas y los individuos restantes no llegaron al 3%. En el tanque 3, la mayoría de las demandas las realizó un solo pez (75,4%), mientras que otros dos individuos llevaron a cabo el 5,6% y el 4,9%, respectivamente. El resto de los peces activaron el comedero menos de un 3%. En el tanque 4, un solo pez realizó el 40,3% de las demandas y los otros dos individuos más activos provocaron el 27,3% y el 17,9%, respectivamente. El resto de los peces accionó el resorte menos de un 3%.

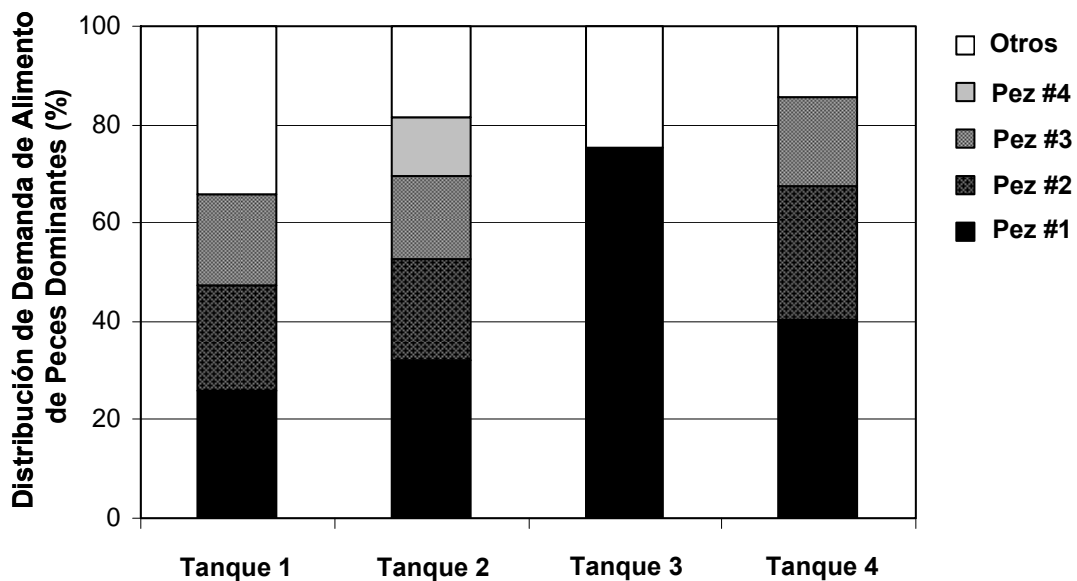


Fig. 1. Porcentaje de las demandas llevadas a cabo por los peces dominantes, responsables de un 60% a un 85% del total de las demandas, en cada uno de los cuatro tanques, durante las fases experimentales 1, 2 y 3 (20 peces por tanque). Los peces se han ordenado según su número de demandas, esto es, #1 indica el pez más activo. Las demandas llevadas a cabo por el resto de los peces también están globalmente representadas.

No obstante, se observó que a pesar de mantenerse los mismos peces en las tres primeras fases experimentales, los peces más activos durante la primera fase del experimento no fueron necesariamente los más activos durante la fase 2 y la 3, es decir, a lo largo del experimento se reconfiguraron las relaciones sociales en algunos tanques (Fig. 2).

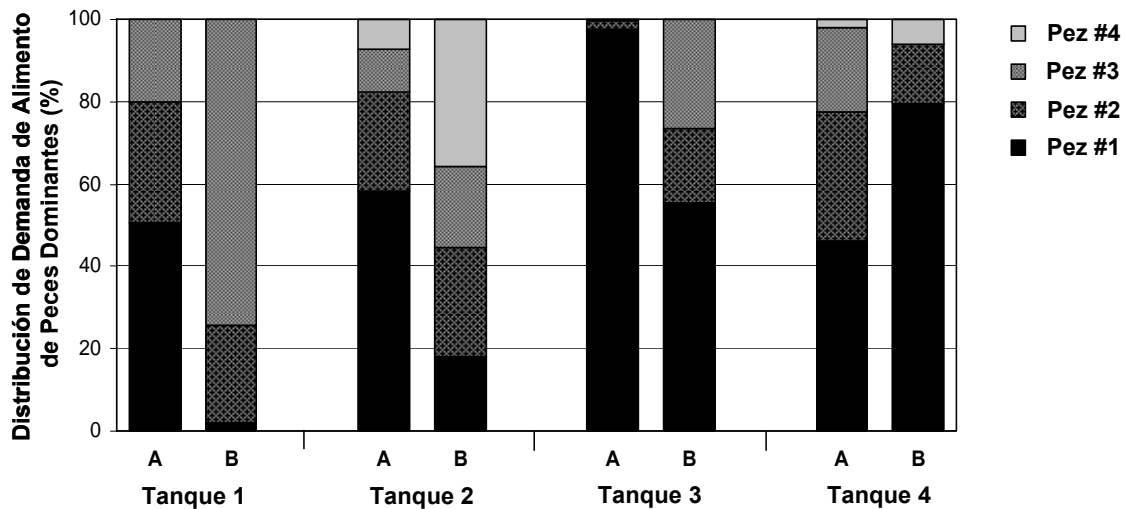


Fig. 2. Variación de la dominancia en la activación de los alimentadores a demanda, tras el cambio del contenido de los dispensadores. Porcentaje de las demandas llevadas a cabo por los peces dominantes, responsables de aproximadamente el 60-85% del total de las demandas, en cada uno de los cuatro tanques, durante los primeros días del experimento (A) y tras el cambio del contenido de los dispensadores (B). El pez #1 representa el individuo más activo durante la primera fase, que no siempre era el más activo durante la siguiente fase.

Con respecto a la distribución temporal, no fueron los mismos individuos los que activaron los dispensadores durante la fotofase que los que lo hicieron en la escotofase. En algunos casos, un pez concreto activaba unos dispensadores determinados durante el periodo de oscuridad y otros diferentes durante el periodo de luz (como fue el caso del pez #1.2); o incluso alguno cambió su patrón diario de actividad a lo largo del experimento (como ocurrió con ese mismo pez) (Fig. 3 y Fig. 4).

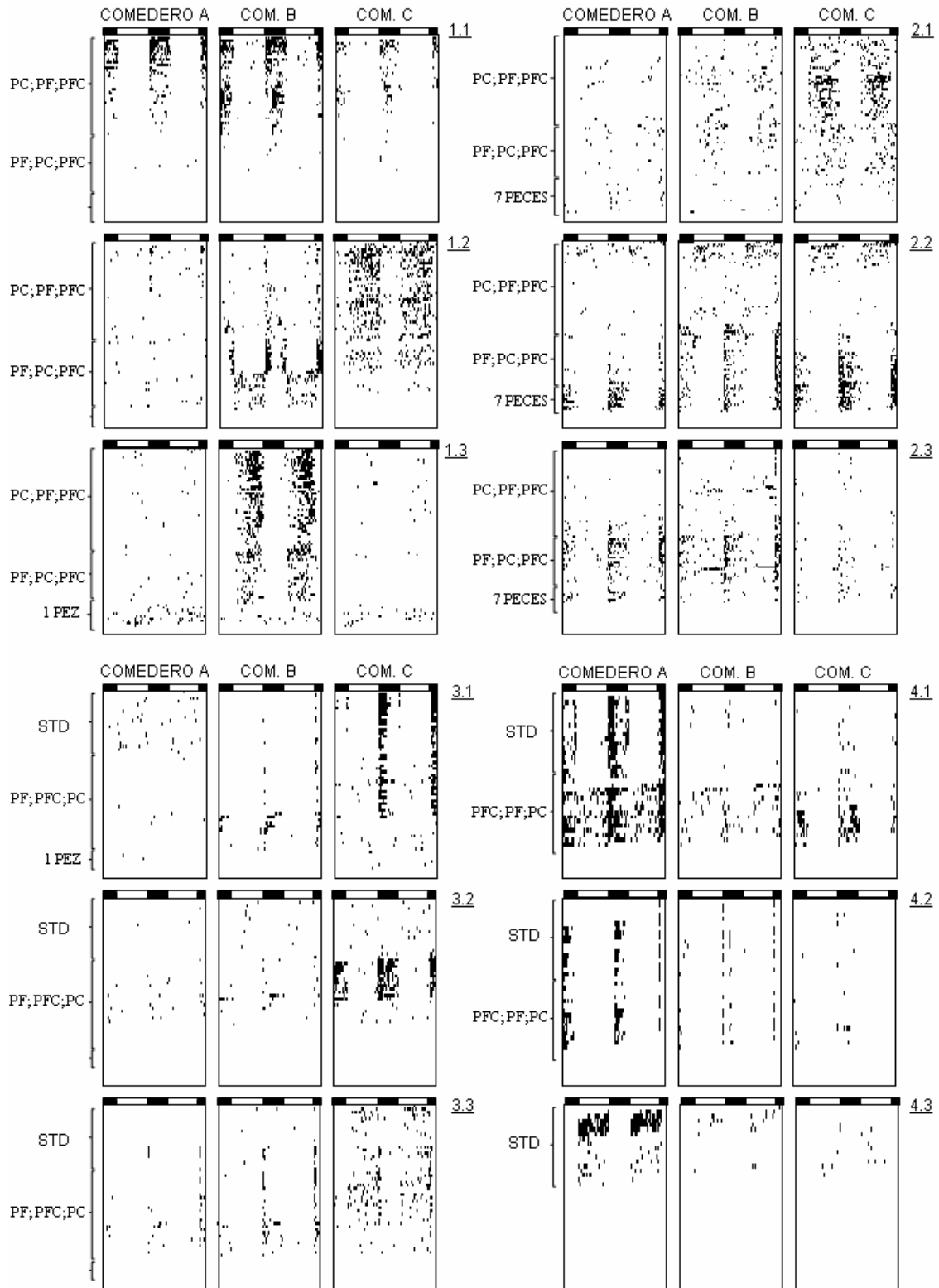


Fig. 3. Actogramas de las demandas efectuadas a lo largo del experimento de cada dispensador (A, B o C) de los 3 peces más activos en cada tanque. Las barras blancas y negras situadas sobre las gráficas, indican la fase de luz y de oscuridad, respectivamente. Las fases del experimento y el contenido de los dispensadores están representados en la parte izquierda de los actogramas. La mayoría de los peces mostraron ritmos diarios muy definidos, sin embargo, también se observó peces que demandaban de un

comedero durante la noche, y durante el día de otro diferente (p. ej. fish #1.2). Además, algunos peces invirtieron su fase de actividad, especialmente tras cambiar el contenido de los alimentadores (p.ej. pez #2.2). Se observó dualismo concurrente en algunos dispensadores (p.ej. dispensadores B o C en tanque 1, dispensador C en tanque 3 o A en tanque 4...).

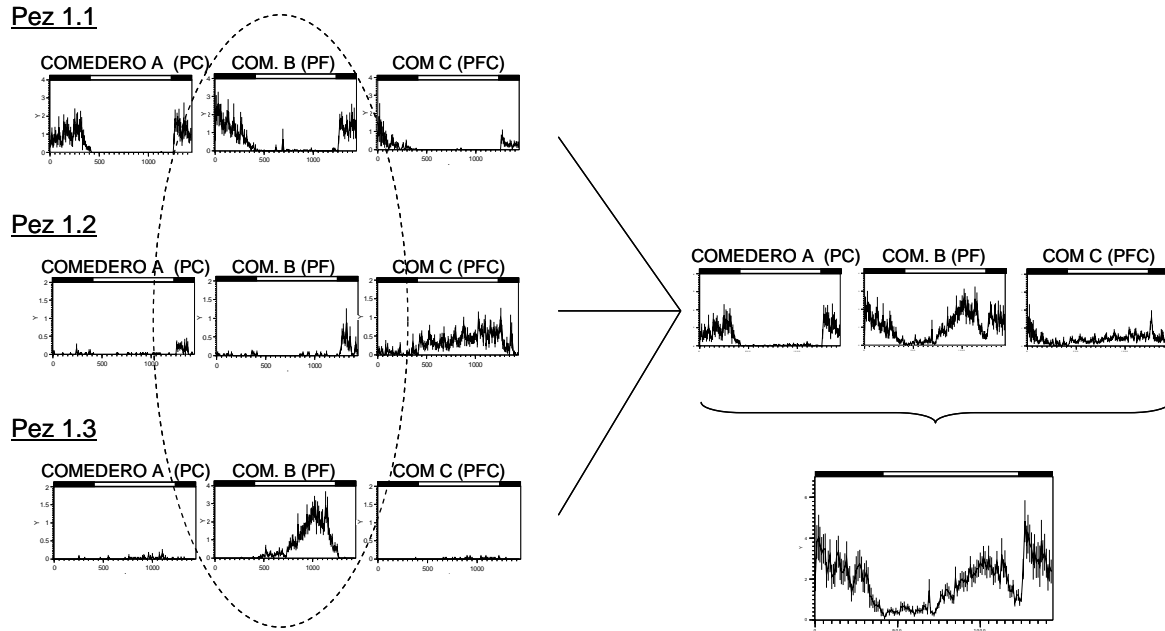


Fig. 4. Ondas medias de las demandas de cada dispensador (A, B or C) llevadas a cabo por los tres peces más activos del tanque 1, durante la primera fase del experimento (36 días). Las gráficas de la derecha muestran la actividad conjunta de los tres peces, para representar el dualismo concurrente, que es especialmente apreciable en el caso del dispensador B para los tres peces. Se observó una tendencia hacia un incremento de la actividad alimentaria durante el periodo de oscuridad, si bien los peces activaron los comederos durante las 24 horas del día. La duración de la escotofase se indica con la barra negra en la parte superior de cada gráfica.

Los peces tendieron a defender una distribución temporal, así como sus dispensadores favoritos, mostrando una marcada territorialidad. El análisis de la selección realizada por los 16 peces dominantes y subdominantes de todos los tanques mostró que el macronutriente más demandado por 13 de ellos fue la proteína. Siendo la composición media seleccionada por los peces más activos de los cuatro tanques la siguiente: P = $52,8 \pm 7,7\%$, F = $20,2 \pm 5,4$ y C = $27,0 \pm 3,6$ (Fig. 5 y 6).

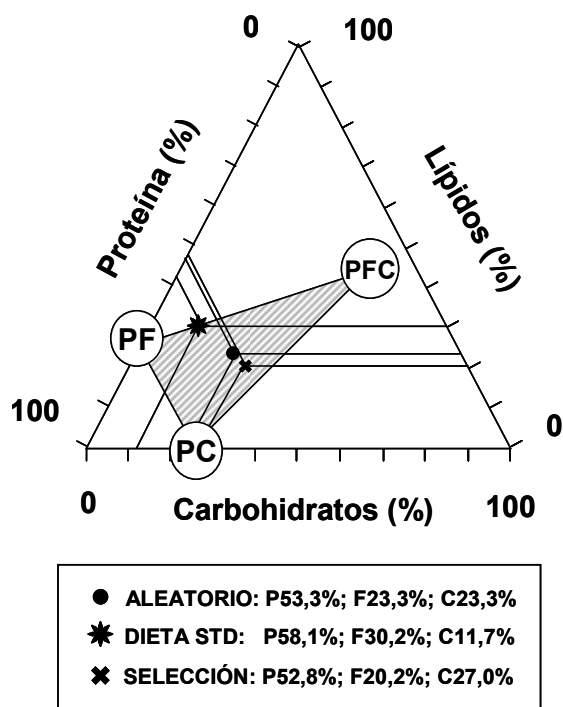


Fig. 5. Composición de la dieta seleccionada, representada según el modelo propuesto por Aranda *et al.* (2000). Cada eje representa el porcentaje de un macronutriente, la intersección indica la composición dietaria seleccionada. Según la composición de las dietas de macronutrientes ofrecidas, el área potencial de selección se representa por el triángulo rayado. La composición de la dieta estándar, basada en composiciones de dietas comerciales de varios productores de pienso, se representa con una estrella. El círculo representa la composición de la dieta resultado de una selección aleatoria. La cruz indica la composición autoseleccionada por los peces más activos de todos los tanques.

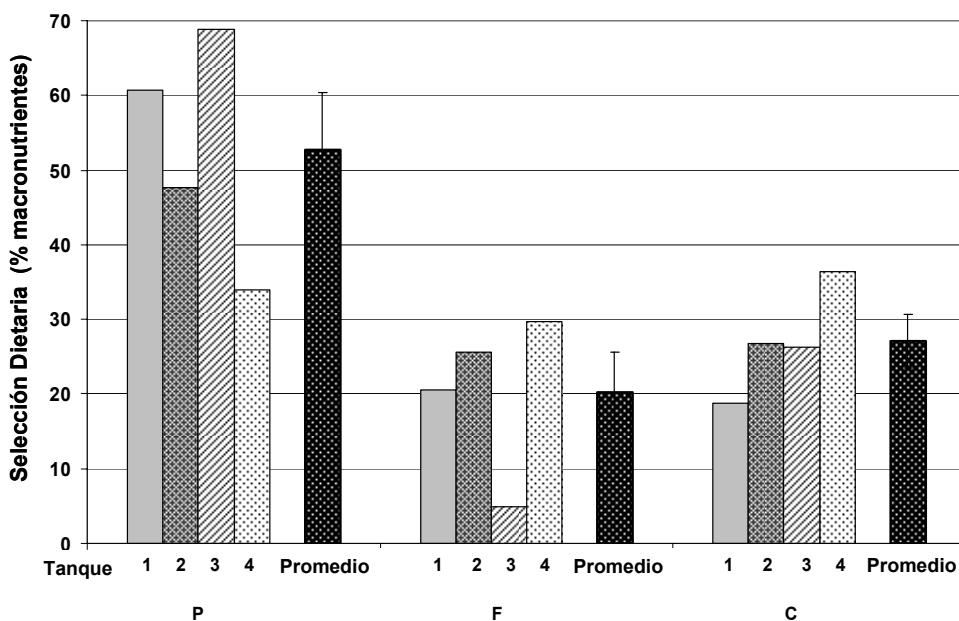


Fig. 6. Porcentaje de P, F y C seleccionado en cada tanque por los peces más activos y para los cuatro tanques (promedio), durante la segunda y tercera fase del experimento (20 peces por tanque). Los peces más activos que se consideraron para el cálculo de la media fueron 6, 3, 3 y 3 individuos en los tanques

1, 2, 3 y 4, respectivamente. En el tanque 1, se consideraron más individuos activos que los 3 seleccionados inicialmente, ya que algunos de los peces que no habían sido muy activos durante los primeros días de experimento, incrementaron posteriormente su actividad y se incluyeron en los cálculos, para alcanzar al menos el 80% de las demandas llevadas a cabo en cada tanque.

Cada individuo contribuyó de forma diferente a la selección global (Fig. 7). Se observó que cuando el individuo que activaba frecuentemente el sensor activaba mayoritariamente un dispensador concreto, continuaba demandando de este dispensador favorito sin tener en cuenta la composición de su contenido. Sin embargo, el pez no parecía quedar muy satisfecho puesto que, como se observó en el tanque 1, aumentó el número de veces que activó el sensor cuando el dispensador pasó de liberar PF a liberar PC (Fig. 8).

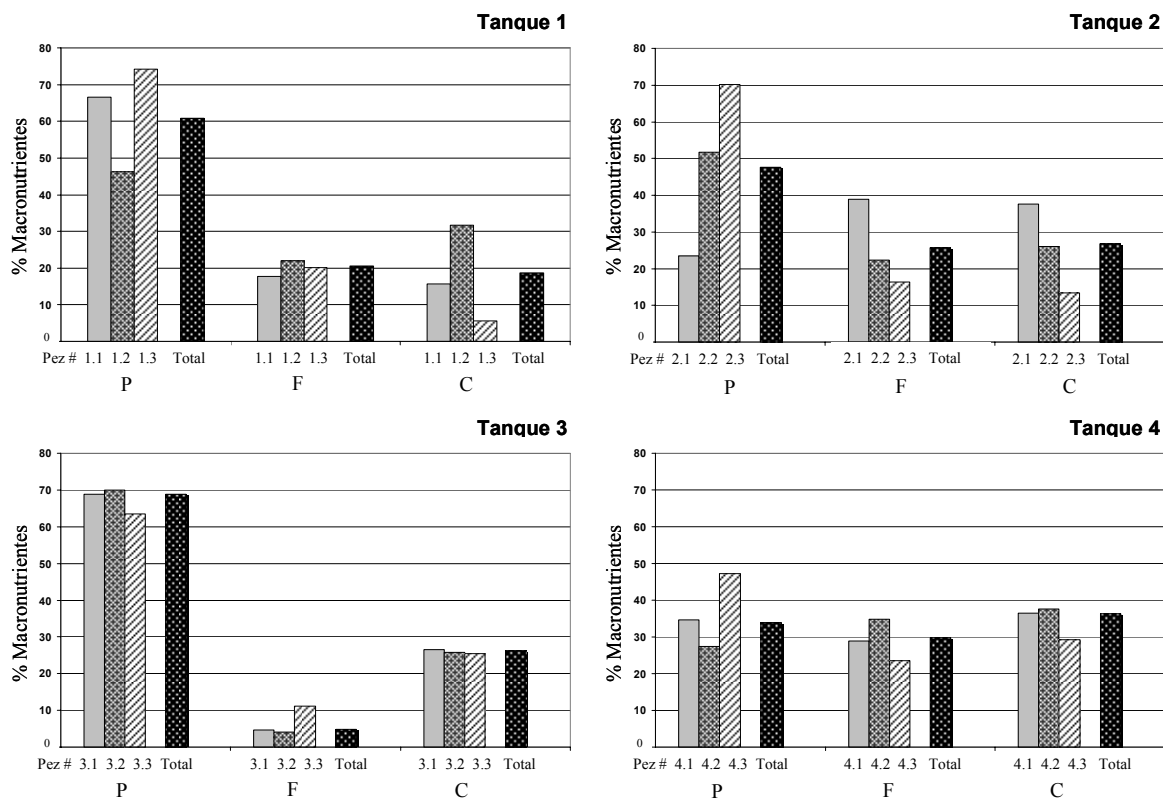


Fig. 7. Representación de la selección individual de los 3 peces más activos de cada tanque y la selección total. Con el fin de incluir al menos el 80% de las demandas llevadas a cabo, se analizó la selección de 3-6 peces dependiendo del tanque: tanque 1, n=6; tanque 2, n=4; tanque 3, n=3; tanque 4, n=3.

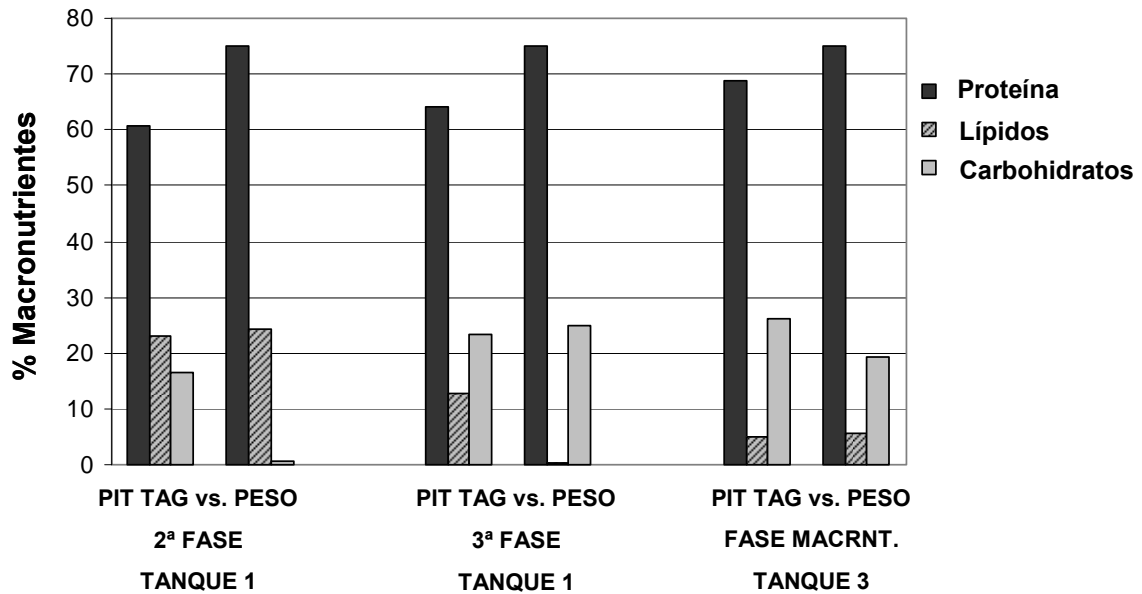


Fig. 8. Comparación de los datos entre los registros de la antena de *PIT tag* de los individuos más activos (en tanque 1, n=6; en tanque 3, n=3), con aquellos obtenidos a partir de la pesada del alimento con el que se rellenaba cada comedero. En el tanque 1, se representan la segunda y la tercera fase, para comparar los resultados tras cambiar el contenido de los dispensadores entre dos dietas de macronutrientes (PC con PF). En el tanque 3, sólo se ha representado la fase 1. En ambos tanques, las tendencias obtenidas por uno y otro método son similares, pero se observa una diferencia en los valores exactos.

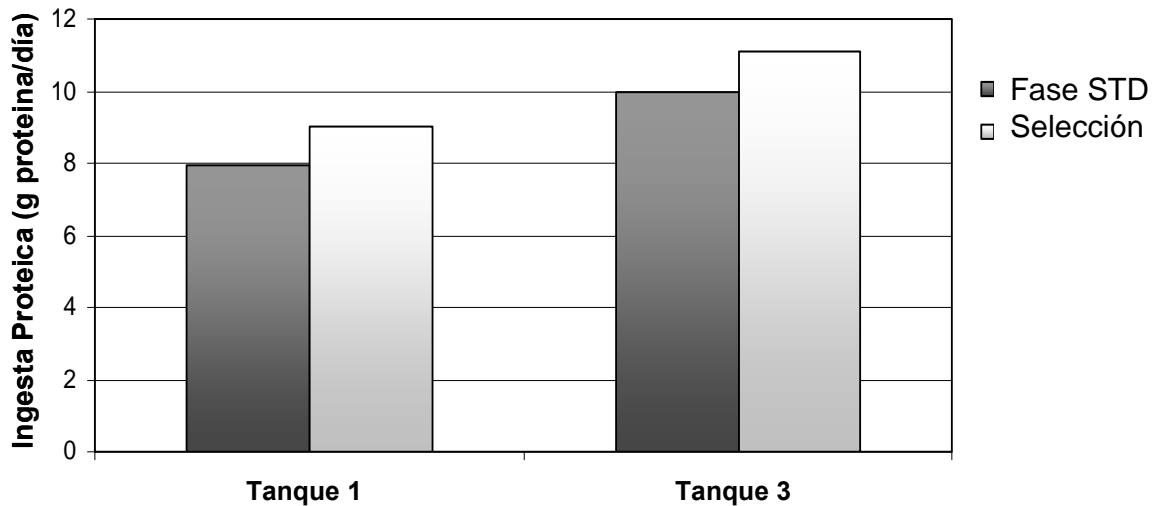


Fig. 9. Ingesta diaria de proteína en peso durante la primera fase experimental, cuando los dispensadores contenían dieta estándar, comparada con la fase 2 en la que los peces seleccionaron entre dietas de macronutrientes en tanque 1 y 3, respectivamente. Los cálculos se han llevado a cabo con los datos obtenidos de pesar el pienso colocado en cada dispensador. En el tanque 1, se ha representado la media de la segunda y la tercera fase. El peso del pienso colocado en los dispensadores 2 y 4 no se registró.

En el tanque 1, los peces más activos seleccionaron dietas más equilibradas, y demandaron un mayor porcentaje de P y menor de C (Fig. 7). No obstante, tras intercambiar el contenido de los dispensadores, los peces del tanque 1 siguieron demandando de sus dispensadores favoritos sin atender a la nueva dieta que contenían, con lo que incrementó su demanda de C y decreció la F. La proporción de proteínas contenida en los dos dispensadores en los que se intercambió el contenido se mantuvo constante durante ambas fases, puesto que se cambió una dieta PF por otra PC y viceversa, es decir, sólo se intercambiaron los lípidos por carbohidratos. En la Fig. 8, se puede apreciar la comparación entre el análisis de los resultados de los 3-6 individuos más activos, registrados a través de la antena *PIT tag*, con la cantidad de alimento liberado por los dispensadores. La tendencia fue similar, aunque las cifras presentaron algunas diferencias. Para los casos en los que se anotó el pienso relleno en los comederos, la media resultante del análisis de las demandas de los peces dominantes al calcular los datos recogidos a través de la antena, fue de P = 64,5%, F = 13,5% y C = 22%; mientras que la composición de la dieta según el peso del alimento introducido en los dispensadores fue de P = 75%, F = 10% y C = 15%. Esta discrepancia se debe por un lado a la contribución a las demandas totales de los peces subordinados, que no se han tenido en cuenta en los datos registrados mediante la antena, y por otro, al hecho de que un suceso único pudo haber sido contabilizado más de una vez, o bien que existiera variabilidad en la liberación de alimento tras cada activación del sensor.

En el caso del tanque 1, puede apreciarse (sobre todo en la representación del alimento disponible) que la demanda de proteínas se mantuvo constante durante ambas fases, pero en la segunda fase disminuyó la de lípidos y aumentó la de carbohidratos, debido a que los peces siguieron demandando del mismo dispensador tras cambiar las dietas. Esto podría también estar indicando que los peces equilibran la ingesta de proteínas (Fig. 9), pero habría que llevar a cabo más pruebas intercambiando las dietas de los dispensadores para poder confirmarlo. En el tanque 2, la desviación entre los peces a la hora de seleccionar la dieta de macronutrientes fue mayor que en el tanque 1, aunque la selección total del grupo fue equilibrada. En el tanque 3, las variaciones entre las diferentes selecciones individuales fueron mínimas y además, los niveles de proteínas fueron similares tras cambiar la dieta de los dispensadores de PC a PF. En estos tres tanques, el macronutriente más demandado fue la proteína, y la media de sus dietas seleccionadas dio como resultado una dieta con una composición de P = $57,6 \pm 7,6\%$, F = $18 \pm 6,9\%$ y C = $24,4 \pm 2,9\%$. Sin embargo, en el tanque 4 se obtuvo una dieta de composición poco equilibrada (P = 33,9%, F = 29,8% y C = 36,3%), lo que distorsionó la media de los otros tres tanques. Tal y como sucedió en los otros tanques, el individuo más activo del tanque 4 continuó seleccionando la mayoría de las

veces la dieta de su dispensador favorito, aun tras haber cambiado su contenido de dieta estándar a dieta de macronutrientes.

Durante la última fase del experimento, al dejar en los tanques a los individuos dominantes se produjeron grandes variaciones en la dieta seleccionada y no se encontraron patrones claros y estables.

3.5. Discusión

La técnica propuesta permitió realizar un seguimiento del comportamiento alimentario individual, así como estudiar la selección dietaria de grupos de peces, conociendo la contribución de cada pez a la dieta final seleccionada. Los resultados de este estudio, en el que se prueba por primera vez esta metodología, mostraron que en grupos de truchas alpinas, desde el principio del experimento hubo algunos peces en todos los tanques que exhibieron una mayor actividad que el resto, registrando mayores niveles de demandas de alimento. En la mayoría de los tanques, entre 1 y 4 individuos de los 20 que componían los grupos, fueron responsables de incluso más del 80% de las activaciones del dispensador. Además, a pesar de observarse una preferencia nocturna generalizada, los dispensadores fueron activados durante las 24 h del día por peces diferentes, dándose el caso de segregación temporal de los dispensadores entre individuos. La selección global de la dieta fue el resultado de la contribución individual de varios peces, con diferencias en la selección de macronutrientes entre distintos individuos y tanques. La composición media seleccionada por los 16 peces más activos de los 4 tanques fue de P = 52,8%, F = 20,2% y C = 27%. Al intercambiar las dietas PC y PF entre dos dispensadores, la selección se vio ligeramente influida por efecto de la territorialidad, puesto que los peces siguieron demandando principalmente de sus dispensadores favoritos. Al retirar los individuos menos activos de los tanques, se vieron afectados los ritmos de actividad y la selección dietaria.

Alänära y Brännäs (1997) observaron que un 10-20% de las truchas alpinas más dominantes monopolizaban los sensores, mientras que un 60% de los peces casi nunca los activaba. Resultados similares fueron obtenidos en *Seriola quinqueradiata* (Sakakura y Tsukamoto 1998). Esta situación coincide con nuestros resultados, puesto que los sensores fueron monopolizados por un 5-20% de los peces, aproximadamente. Se observó a su vez, que los peces más activos durante la primera fase del experimento no fueron siempre los más activos durante la segunda, variando los patrones de actividad de cada pez a lo largo del tiempo.

Los dispositivos de alimentación a demanda también nos permitieron estudiar los ritmos de alimentación, que presentaron cierta tendencia hacia un patrón nocturno; si bien algunos peces mostraron patrones diurnos, nocturnos, crepusculares o incluso, como en varios casos estudiados aquí, patrones duales de alimentación, según los cuales los peces demandaban alimento de un dispensador durante la noche, de otro durante el día y de otro al amanecer y al anochecer. Esta observación concuerda con lo observado en otros estudios sobre truchas alpinas, que muestran que los sitios de alimentación que sólo funcionaban durante ciertas horas al día, eran visitados por los peces en diferentes momentos y de acuerdo con el rango social: los dominantes monopolizaban los mejores sitios de alimentación a las mejores horas (Brännäs, 1998). Al parecer, los individuos menos competitivos, sin la suficiente habilidad necesaria para defender el dispensador, demandan siguiendo un horario diverso, mientras que los perfiles más constantes se asocian a la dominancia (Alanärä y Brännäs, 1997). La hipótesis de que el dualismo de la actividad alimentaria diaria está influenciado por la competición entre individuos por los recursos alimentarios, se ha comprobado en otras especies, tales como el *Salmo salar*, observándose que los peces más grandes ingieren una mayor cantidad de pienso y se alimentan de forma constante a lo largo del día, mientras que los individuos más pequeños tienden a circunscribir su alimentación al principio y al final del día (Kadri *et al.*, 1997). Se ha encontrado este mismo comportamiento en la trucha arcoiris, especie en la que la mayor parte de individuos activaba los dispensadores durante el día, aunque algunas truchas se mostraron activas principalmente durante la noche, cuando los dominantes eran menos agresivos (Alanärä y Brännäs, 1997).

Se ha descrito que los patrones diarios de la trucha alpina varían con las estaciones: en primavera, otoño e invierno, la actividad alimentaria era máxima a última hora de la tarde, y la mayor parte del alimento se ingería en el periodo comprendido entre el ocaso y el alba. En cambio, durante el verano la actividad alimentaria presentaba un patrón más diurno (Jørgensen y Jobling, 1989). No se ha observado claramente este efecto en nuestro estudio, aunque algunos de los peces se hicieron más diurnos durante los últimos días del experimento, a medida que se acercaba el verano.

Además, se observó el efecto de la territorialidad. Los peces dominantes defendieron bien un dispensador, o bien un patrón definido de actividad alimentaria y varios dispensadores. Este reparto de los dispensadores entre los peces dominantes dificultó que la selección de la dieta fuera similar en todos los tanques, pues las relaciones sociales fueron diferentes en cada grupo. El mismo motivo provocó la obtención de patrones más equilibrados en la selección global de macronutrientes que en la individual, aunque la mayoría de los peces mostró una clara preferencia por la proteína.

Las contribuciones individuales tuvieron como resultado una selección global bastante equilibrada en 3 de los 4 tanques. En cualquier caso, la composición media de los cuatro tanques realizada por los grupos (P = 52,8%, F = 20,2% y C = 27%) se acercó a una selección aleatoria, pero también se aproximó a las proporciones descritas por Johnston (2002) para la dieta ideal de la trucha alpina: 59-62% P, 23-26% F y 15% C. Otras especies de peces, como la lubina, el sargo picudo, la trucha o el carpín dorado (*Carassius auratus*) mantuvieron su selección de macronutrientes aun después de diluir su concentración con materiales inertes o de encapsularlos en el interior de cápsulas de gelatina (Rubio *et al.*, 2003; Almaida-Pagán *et al.*, 2006; Sánchez-Vázquez *et al.*, 1999; Aranda *et al.*, 2000), lo que sugiere la existencia de mecanismos reguladores que tienden a equilibrar la ingesta de macronutrientes en respuesta a manipulaciones experimentales. En la trucha alpina, las variaciones entre tanques podrían deberse a las características diferentes de cada uno de los grupos, puesto que variaban tanto las relaciones sociales como las necesidades de cada individuo. No obstante, el incremento observado en las demandas de un dispensador al cambiar su contenido de alimento, lleva a pensar que la territorialidad mostrada por los peces más activos tuvo un papel preponderante a la hora de seleccionar una dieta de forma voluntaria, que originaba variaciones tolerables en todo caso puesto que la trucha alpina es una especie generalista que soporta una amplia gama de dietas (Johnson y Burns, 1984). Otra posibilidad, teniendo en cuenta que sólo se realizó un cambio del contenido entre una dieta PF y otra PC, podría ser que los peces estabilizan su ingesta de proteína, como se ha visto en otras especies (Almaida *et al.*, 2006) y por tanto, al ser ambas dietas ricas en ellas, continuaron demandando del mismo dispensador.

Aunque no variaron las tendencias generales, la dieta obtenida a través de los registros de la antena *PIT tag* no coincide exactamente con la cantidad total de alimento liberado por los dispensadores, siendo la media para los 3 casos estudiados de P = 64,5%, F = 13,5%, C = 22% (datos procedentes de los registros de demandas) y P = 75%, F = 10%, C = 15% (datos obtenidos de la pesada del alimento distribuido). Las ligeras diferencias pueden deberse a la actuación de los peces menos activos (no tenidos en cuenta en los cálculos mediante los registros de la antena), al hecho de que un suceso único pudo haber sido contabilizado más de una vez y a la variabilidad en la distribución de alimento de los dispensadores.

Al retirar a algunos individuos, los ritmos de actividad y la selección de macronutrientes se vieron afectados. Sin embargo, no se obtuvieron patrones reproducibles en todos los tanques, ya que aumentó la variabilidad de los patrones seleccionados por los individuos dominantes aislados.

Con el fin de superar las limitaciones de la metodología ensayada, en futuros estudios se deberían contemplar algunas modificaciones:

- a) Se debería incrementar el número de tanques estudiados para reducir la variabilidad causada por las particulares relaciones sociales dentro del grupo.
- b) Para el cálculo del alimento ingerido por los peces debería registrarse el alimento no consumido correspondiente a cada dieta.
- c) Se deben realizar rotaciones completas en las posiciones relativas de las dietas.

Es evidente que la optimización de la cría y engorde de la trucha alpina pasa necesariamente por la comprensión de los requisitos biológicos y físicos para su crecimiento, dieta y alimentación. En este sentido, la tecnología propuesta supone un avance metodológico importante para estudiar la selección dietaria individual y el comportamiento de los individuos dentro de un grupo.

3.6. Agradecimientos

Esta investigación ha estado parcialmente financiada por la Comisión Europea (Acción Concertada Q5CA-2001-989). Los autores también quieren expresar su agradecimiento a la Fundación Eroski por su beca concedida a MJHR.

3.7. Referencias bibliográficas

Adron, J.W.; Grant, P.T.; Cowey, C.B. 1973. A system for the quantitative study of the learning capacity of trout, *Salmo gairdneri*, and its application to the study of feeding preferences and behaviour. J. Fish Biol. 5: 625-636.

Alanärä, A.; Brännäs, E. 1993. A test of the individual feeding activity and food size preference in rainbow trout using demand feeders. Aquacult. Int. 1: 47-54.

Alanärä, A.; Brännäs, E. 1996 Dominance in demand-feeding behavior in Arctic charr and rainbow trout: the effect of stocking density. J. Fish Biol. 48: 242-254.

Alanärä, A.; Brännäs, E. 1997. Diurnal and nocturnal feeding activity in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Can J. Fish Aquat. Sci. 54: 2894-2900.

Alanärä, A.; Burns, M.D.; Metcalfe, N.B. 2001. Intraspecific resource partitioning in brown trout: the temporal distribution of foraging is determined by social rank. J. Anim. Ecol. 70: 980-986.

Almáida-Pagán, P.F.; Rubio, V.C.; Mendiola, P.; De Costa, J.; Madrid, J.A. 2006. Macronutrient selection through post-ingestive signals in sharpsnout seabream fed gelatina capsules and challenged with protein dilution. Physiol. Behav. 88: 550-558.

Aranda, A. ; Sánchez-Vázquez, F.J. ; Zamora, S. ; Madrid, J.A. 2000. Self-design of fish diets by means of self-feeders: validation of procedures. J. Physiol. Biochem., 56: 155-166.

Brännäs, E.; Alanärä, A. 1993. Monitoring the feeding activity of individual fish with a demand feeding system. J. Fish Biol. 42: 209-215.

Brännäs, E.; Lundkvist, H.; Prentice, E.; Schmitz, M.; Brännäs, K.; Wiklund, B.S. 1994. Use of the passive integrated transponder (PIT) in a fish identification and monitoring system for fish behavioural studies. Trans. Am. Fish. Soc. 123: 395-401.

Brännäs, E. 1998. Individual variation in distribution, activity and growth rate of Arctic charr kept in a three-tank system. J. Fish Biol. 53: 795-807.

Chen, W.; Naruse, M.; Tabata, M. 2002. The effect of social interactions on circadian self-feeding rhythms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *Physiol. Behav.* 76: 281-287.

Covès, D.; Beauchaud, M.; Attia, J.; Dutto, G.; Bouchut, C.; Bégout, M.L. 2006. Long-term monitoring of individual fish triggering activity on a self-feeding system: An example using European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 253: 385–392.

da Silva, J.G.; Oliva-Teles, A. 1998. Apparent digestibility coefficients of feedstuffs in seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquat. Living Resour.* 11: 187-191.

Eijke, C.; Schreck, C.B. 1980. Stress and social hierarchy rank in coho salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 109: 423-426.

Fraser, N.H.C.; Metcalfe, N.B.; Thorpe, J.E. 1993. Temperature-dependent switch between diurnal and nocturnal foraging in salmon. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 252: 135-139.

Fraser, N.H.C.; Heggenes, J.; Metcalfe, N.B.; Thorpe, J.E. 1995. Low summer temperatures cause juvenile Atlantic salmon to become nocturnal. *Can. J. Zool.* 73: 446-451.

Gilmour, K.M.; DiBattista, J.D.; Thomas, J.B. 2005. Physiological causes and consequences of social status in salmonid fish. *Integr. Comp. Biol.* 45: 263-273.

Harwood, A.J.; Griffiths, S.W.; Metcalfe, N.B.; Armstrong, J.D. 2003. The relative influence of prior residency and dominance on the early feeding behavior of juvenile Atlantic salmon. *Anim. Behav.* 65: 1141-1149.

Heasman, M.S.; Black, K.D. 1998. The potential of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), for mariculture. *Aquac. Res.* 29: 67-76.

Höglund, E.; Kolm, N.; Winberg, S. 2001. Stress-induced changes in brain serotonergic activity, plasma cortisol and aggressive behaviour in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) is counteracted by L-DOPA. *Physiol. Behav.* 74: 381-389.

Johnson, L.; Burns, B.L. En: L. Johnson, B.L. Burns, eds. 1984. Biology of the Arctic Charr. Winnipeg. University of Manitoba Press: 447-461.

Johnston, G. 2002. En: Arctic charr aquaculture. Oxford. Blackwell publishing: 272 pp.

Jørgensen; E.H.; Jobling, M. 1989. Patterns of food intake in Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, monitored by radiography. Aquaculture. 81: 155-160.

Jørgensen, E.H.; Jobling, M. 1990. Feeding modes in Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, L.: The importance of bottom feeding for the maintenance of growth. Aquaculture. 86: 379-386.

Kadri, S.; Metcalfe, N.B.; Huntingford, F.A.; Thorpe, J. E. 1997. Daily feeding rhythms in Atlantic salmon. II: size-related variation in feeding patterns of post-smolts under constant environmental conditions. J. Fish Biol. 50: 273-279.

Kentouri, M.; Divanach, P.; Geurden, I.; Anthourard, M. 1995. Evidence of adaptive behavior in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in relation to diet composition, in a self-feeding condition. Ichthyophysiol. Acta. 18: 125-143.

Landless, P.J. 1976. Demand-feeding behaviour of rainbow trout. Aquaculture. 7: 11-25.

Larson, E.T.; Winberg, S.; Mayer, I.; Lepage, O.; Summers, C.H.; Øverli, Ø. 2004. Social stress affects circulating melatonin levels in rainbow trout. Gen. Comp. Endocr. 136: 322-327.

Linner, J.; Brännäs, E. 1994. Behavioral response to commercial food of different sizes and self-initiated food size selection by Arctic charr. Trans. Am. Fish. Soc. 123: 416-422.

Madrid, J.A.; Boujard, T.; Sánchez-Vázquez, F.J. 2001. Feeding rhythms. En: D. Houlihan; M. Jobling; T. Boujard, eds. Food intake in fish. Oxford. Blackwell Science Ltd.: 189-215.

Noakes, D.L.G. Social behaviour in young charrs. 1980. En: E.K. Bacon, ed. Charrs: salmonid fishes of the genus *Salvelinus*. The Hague: Dr. W. Junk Publishers: 683-701.

O'Connor, K.I.; Metcalfe, N.B.; Taylor, A.C. 1999. Does darkening signal submission in territorial contests between juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*? Anim. Behav. 58: 1269-1276.

Randolph, K.N.; Clemens, H.P. 1976. Some factors influencing the feeding behaviour of channel catfish in culture ponds. Trans. Am. Fish. Soc. 105: 718-724.

Rozin, P.; Mayer, J. 1961. Regulation of food intake in the goldfish. Am. J. Physiol. 201: 968-974.

Rubio, V.C.; Sánchez-Vázquez, F.J.; Madrid, J.A. 2003. Macronutrient selection through postingestive signals in sea bass fed on gelatine capsules. Physiol. Behav. 78: 795-803.

Sakakura, Y.; Tsukamoto, K. 1998. Effects of density, starvation and size difference on aggressive behaviour in juvenile yellowtails (*Seriola quinqueradiata*). J. Appl. Ichthyol. 14: 9-13.

Sánchez-Vázquez, F. J.; Yamamoto, T.; Akiyama, T.; Madrid, J. A.; Tabata, M. 1998a. Selection of macronutrients by goldfish operating self-feeders. Physiol. Behav. 65: 211-218.

Sánchez-Vázquez, F. J.; Yamamoto, T.; Akiyama, T.; Madrid, J. A.; Tabata, M. 1999. Macronutrient self-selection through demand-feeders in rainbow trout. Physiol. Behav. 66: 45-51

Sloman, K.A.; Armstrong, J.D. 2002. Physiological effects of dominance hierarchies: laboratory artefacts or natural phenomena? J. Fish Biol. 61: 1-23.

Winberg, S.; Nilsson, G.E.; Spruijt, B.M.; Höglund, V. 1993. Spontaneous locomotor activity in Arctic charr measured by a computerized imaging technique: role of brain serotonergic activity. J. Exp. Biol. 179: 213-232.

4. RESPUESTA DE LA MELATONINA GASTROINTESTINAL Y PLASMÁTICA, CORTISOL EN PLASMA Y RITMOS DE ACTIVIDAD MOTORA DE LA LUBINA (*Dicentrarchus labrax*) A LA SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA CON TRIPTÓFANO Y MELATONINA

M. J. Herrero ¹, F. J. Martínez ¹, J. M. Míguez ² y J. A. Madrid ¹

¹ Universidad de Murcia. Departamento de Fisiología. Facultad de Biología. 30100 Murcia.

² Universidad de Vigo. Laboratorio de Fisiología Animal. Facultad de Biología. 36310 Vigo.

4.1. Resumen

La melatonina es una indolamina que podría resultar útil para la acuicultura, al presentar actividad antioxidante, antiestrés e inmunoestimulante, regulando además la maduración gonadal. En el presente trabajo se han examinado dos vías para incrementar los niveles de melatonina en plasma a través de la dieta: suplemento directo de melatonina (dieta ME) y suplemento del aminoácido triptófano, precursor de la melatonina (dieta TRP). Para ello, se suministró de forma regular una dieta comercial (dieta STD) a un grupo de lubinas durante 16 días. Posteriormente se llevó a cabo un muestreo en el que tomaron muestras de plasma, intestino y bilis en cuatro momentos diferentes: 120 minutos antes de la comida, y 15, 180 y 480 minutos después de la misma. Se determinó la actividad locomotora, así como las concentraciones de melatonina intestinal y biliar, y las de melatonina, serotonina y cortisol plasmáticos. Este mismo proceso se llevó a cabo tras alimentar a las lubinas con las dietas TRP y ME durante una semana. Nuestros resultados muestran que el suplemento dietético de melatonina, y no el de triptófano, aumenta los valores de melatonina en plasma, intestino y bilis. Por otro lado, la concentración de serotonina en sangre sí aumentó gracias al suplemento de triptófano, pero no con el de melatonina, confirmando la biodisponibilidad del triptófano para la síntesis de la serotonina. Los dos tratamientos resultaron ser igualmente efectivos a la hora de reducir los altos valores de cortisol observados con la dieta STD.

Palabras clave: melatonina, triptófano, cortisol, vesícula biliar, lubina.

4.2. Introducción

Además de su conocida capacidad para sincronizar el sistema circadiano, la melatonina es una indolamina antiestrés que funciona como antioxidante e inmunoestimulante, e interviene en la

regulación de la maduración gonadal (Macchi y Bruce, 2004). Estos efectos podrían ser útiles para los acuicultores, pues ofrecen la posibilidad de reducir el estrés asociado al cultivo, mejorar el sistema inmune de los peces (Esquifino *et al.*, 2004) y manipular el ritmo de maduración sexual (Porter *et al.*, 2000). En este estudio, hemos investigado si los suplementos dietéticos de melatonina constituyen una forma práctica de incrementar la melatonina en plasma en las lubinas. También se propone como alternativa los suplementos de triptófano (Lepage *et al.*, 2005a), puesto que el tratamiento con melatonina podría resultar excesivamente caro a largo plazo.

Se suele aceptar que la secreción pineal de melatonina constituye la fuente principal de melatonina en plasma. No obstante, la melatonina es sintetizada también en varios tejidos extrapineales; de entre ellos, cabría destacar el tracto gastrointestinal (GIT), donde también se concentra la melatonina segregada por la glándula pineal y se absorbe la administrada de forma exógena (Poeggeler *et al.*, 2005).

El aminoácido esencial triptófano es el único metabolito que puede ser transformado en serotonina (5-HT), que a su vez es precursora de la síntesis de la melatonina. La ruta metabólica a través de la cual se producen las mayores cantidades de melatonina es tras la N-acetilación de la serotonina por la enzima N-acetiltransferasa (arilalquilamina-N-acetiltransferasa: AA-NAT), y su posterior metilación mediante otra enzima: la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) (Sprenger *et al.*, 1999). Habitualmente, se ha considerado que el paso limitante para la formación de la melatonina viene dado por la N-acetilación de la melatonina, aunque existen estudios recientes que apuntan a que dicho papel limitante podría corresponder a la conversión del N-acetil-5-HT por la HIOMT (Hardeland *et al.*, 2006); como se ha puesto de manifiesto en investigaciones sobre los ojos de los anfibios y de algunos insectos (Hardeland y Poeggeler, 2003).

Parece ser que la AA-NAT en los peces, que de noche alcanza su actividad máxima, está controlada de forma directa por los genes del marcapasos circadiano (Hardeland *et al.*, 2006). En el caso de la trucha arcoiris, existen pruebas de que la melatonina puede regular su propia producción en la glándula pineal mediante un mecanismo de retroalimentación (Yáñez y Meissl, 1995). Sin embargo, la incubación *in vitro* de tejidos gastrointestinales en un medio con TRP (Lepage *et al.*, 2005a) vino a sugerir que la disponibilidad de triptófano actuaba como factor limitante para la síntesis de melatonina en el GIT. Así, la administración de TRP durante el día podría ser un método

efectivo para aumentar los niveles de melatonina, acelerando su síntesis en el tracto gastrointestinal y en la glándula pineal.

En estudios anteriores, se ha demostrado la existencia durante el día de elevadas concentraciones de melatonina en la bilis de los mamíferos, posiblemente para prevenir daños por oxidación y para actuar como mediador en la comunicación interorgánica entre el intestino y el hígado (Tan *et al.*, 1999; Messner *et al.*, 2001). La melatonina de la bilis puede contribuir al alto contenido de melatonina que se encuentra en el GIT; no obstante, hasta donde sabemos, en la actualidad no existe información disponible sobre el contenido de melatonina en la bilis de los peces.

El cortisol (COR) es el principal corticoesteroide en los peces y un clásico indicador plasmático de estrés (Roche y Bogé, 1996), liberado principalmente a través de la activación del eje HPI (hipotálamo-pituitaria-interrenal) (Wendelaar Bonga, 1997). Se ha sugerido que, en mamíferos, la melatonina contrarresta el incremento de glucocorticoides inducido por estrés, bien a través de sus efectos a nivel del hipotálamo (Xu *et al.*, 1995) o bien mediante una acción directa sobre las glándulas suprarrenales, inhibiendo su secreción (Rao *et al.*, 2001). Además, se ha comprobado en trucha arcoiris que la dieta de triptófano contrarresta el aumento de cortisol en plasma, inducido por el estrés (Lepage *et al.*, 2002).

Puesto que la lubina es una de las especies marinas con mayor difusión en la acuicultura europea, y su producción aumenta a gran velocidad, toda estrategia que mejore su cultivo podría tener un impacto económico enorme. En este contexto, el uso de la melatonina abre interesantes posibilidades, debido a sus efectos positivos sobre toda una serie de parámetros fisiológicos. Entre ellos, serían de especial utilidad los tratamientos para regular la respuesta ante el estrés, ya que la alta actividad interrenal que aparentemente se observa en las lubinas podría ser la causante de la gran sensibilidad de esta especie a los factores estresantes relacionados con la acuicultura (Rotllant *et al.*, 2003).

Hasta donde sabemos, por lo que a peces respecta, no existen estudios publicados acerca del efecto de suplementos dietéticos con TRP o ME sobre la dinámica temporal de las concentraciones plasmáticas de serotonina, melatonina y cortisol. El objetivo de este estudio es

explorar la posibilidad de utilizar suplementos en la dieta de TRP y ME como método efectivo para aumentar la melatonina, tanto gastrointestinal como plasmática; además de comprobar si con su utilización podría verse contrarrestado el estrés producido por las prácticas de cultivo.

4.3. Material y métodos

Animales e infraestructura

Los experimentos se realizaron en circuito abierto, a temperatura ambiente (de julio a septiembre), en el Centro de Recursos Marinos del IMIDA, en San Pedro del Pinatar. El tanque donde se alojaron los peces estaba colocado bajo techo, pero recibía luz natural indirecta, además de la luz proveniente de tubos fluorescentes conectados a un temporizador. La temperatura del agua y la intensidad lumínica fueron registradas en todo momento mediante unos sensores específicos, conectados a su vez a un *data logger* (LogIT Datameter 1000, Reino Unido). La temperatura media fue de 27,3°C, con un fotoperiodo aproximado de LD 13:11 (luces encendidas de 7:30 a 20:30). 150 lubinas (*Dicentrarchus labrax*), con un peso corporal medio de $82,5 \pm 2,6$ g (media \pm SEM), se ubicaron en un tanque rectangular de 3500 litros, equipado con un dispensador de alimento automático. Para registrar la actividad locomotora de los animales, se utilizó una fotocélula resistente al agua (Sunx CX-20, Japón), conectada a un *data logger* y sujeta a un lateral del tanque a 50 cm bajo la superficie del agua, justo en el área situada bajo el dispensador. A una hora determinada (13:30 h), el dispensador liberaba suficiente alimento para saciar a todos los animales. No se cuantificaron los gránulos sobrantes. El tanque se limpiaba tres veces a la semana, sin efecto aparente en los peces que anteriormente habían estado expuestos a esta operación durante meses.

Preparación de las dietas

Las dietas experimentales se regranularon para evitar diferencias de textura entre ellas: se pulverizó pienso comercial para lubinas (Skretting, L-2 Active 1P) y se mezcló con agua, luego se pasó todo por una picadora de carne industrial (Aichi, MP3000, Japón) hasta obtener fideos de 0,3 mm de diámetro que, finalmente, se secaron durante un día y se seccionaron en gránulos del mismo tamaño, aproximadamente. Esta dieta (dieta STD) contenía un 0,5% de triptófano (en seco). La

dieta con suplemento de triptófano (dieta TRP) fue enriquecida con 5 g de L-triptófano (Fluka, 93659, Japón) por cada kilo de alimento seco en polvo, lo que supone un contenido de triptófano dos veces superior al de la dieta STD. Para la dieta con suplemento de melatonina (dieta ME) se añadió 1 g de melatonina (Sigma, M-5250, EE.UU.) por cada kilo de alimento seco en polvo.

Procedimiento experimental

El experimento completo, sin incluir los análisis, duró unas 7 semanas, desde julio a septiembre, y se dividió en tres fases experimentales consecutivas, durante las cuales los animales recibieron una comida diaria a las 13:30 h:

- a) Fase I. Se alimentó a los peces con la dieta STD durante dos semanas y después, se tomaron muestras tal y como se explica en la sección “protocolo de muestreo de peces”. Los datos de esta dieta sirvieron de “valores control”.
- b) Fase II. Los peces recibieron la dieta STD durante una semana, a la que siguió otra semana con la dieta TRP (Lepage *et al.*, 2003). Tras este periodo, se tomaron muestras siguiendo el mismo protocolo de muestreo que se describe más adelante.
- c) Fase III. Durante dos semanas se suministró a los peces la dieta STD, para luego ofrecerles la dieta ME durante una semana. De nuevo, se tomaron muestras.

Protocolo de muestreo de los peces

Se recogieron muestras en cuatro momentos diferentes: 120 minutos antes de la hora de alimentación, y 15, 180 y 480 minutos después de la comida. En cada uno de estos puntos temporales se anestesió con fenoxietanol (0,03%) a veinte peces, diez para la obtención de plasma y diez para suero; y se les extrajo sangre de la vena caudal. Las muestras de plasma se dividieron en dos viales, uno destinado al análisis de melatonina y el otro al de cortisol. Asimismo, las muestras de suero se almacenaron de forma individual en un vial aparte, para el análisis de la serotonina. Seis peces fueron decapitados y diseccionados para extraerles el intestino y la vesícula biliar. Todas las muestras se conservaron a -80°C.

Análisis de melatonina, serotonina y cortisol

Para determinar la melatonina, se utilizó un RIA (radioinmunoensayo) comercial (IBL RE29301, Alemania) previamente validado (Vera *et al.*, 2005). El cortisol se determinó mediante un ensayo ELISA (enzimoinmunoensayo) específico para lubinas, desarrollado por Tintos *et al.* (2006). La serotonina en el suero sanguíneo se analizó mediante un kit comercial ELISA (IBL RE59121, Alemania). Los coeficientes de variación (CV) intraensayo e interensayo fueron de 3,2%-6,2% y 6,9%-14,9%, respectivamente. Para analizar la melatonina intestinal, se descongeló parcialmente un solo intestino, y se pesó y colocó en un tubo de cristal. Tras añadir 1 ml de tampón Tris-HCl por cada 500 mg de tejido intestinal, la mezcla fue sonicada y homogeneizada a 4°C con un homogenizador (polytron, kinematica, Suiza) trabajando siempre sobre el hielo. Los tubos se centrifugaron a 11.000 rpm durante 30 minutos a 7°C, y el sobrenadante resultante se guardó en alícuotas a -80°C. Las extracciones previas a la determinación de melatonina se realizaron utilizando columnas C18 (Waters, EEUU) con 1 ml de metanol. La fase orgánica fue recogida y evaporada bajo corriente de nitrógeno. Antes del ensayo, se resuspendieron las muestras con PBS y albúmina (pH=7,2). Para analizar la vesícula biliar, se siguió el mismo procedimiento, si bien se añadió HCl entre 20 y 40 veces su peso.

Análisis de datos

Los datos de intensidad lumínica, temperatura y actividad locomotora registrados en el *data logger* se obtuvieron mediante el *software* Logitlab y se transfirieron a la hoja de cálculo Excel (Microsoft). Para procesar los datos, y llevar a cabo las gráficas y los análisis estadísticos se utilizó el *software* de cronobiología (Temps, v.1, 179 por el Dr. Díez Noguera, Barcelona), Microsoft Excel y el programa de estadística SPSS. Los datos se muestran como medias \pm SEM. Una vez verificada la normalidad de las variables, la significación estadística se analizó mediante ANOVA simple y de doble vía (con el tiempo y la dieta como variables independientes), utilizando la prueba *post hoc* de Bonferroni para la comparación múltiple de medias. Se estimó como significativo un nivel de confianza del 95%. Siguiendo los criterios de Stephan (1997) para determinar la existencia de actividad anticipatoria al alimento (FAA), se fijó el mínimo en una actividad previa a la hora de la alimentación de 2,5 veces superior a la de referencia, sin inflexiones durante más de una hora. El nivel de actividad de referencia se obtuvo teniendo en cuenta la actividad media diaria.

4.4. Resultados

Melatonina

El análisis de la melatonina en plasma de los peces sometidos a la dieta STD, reveló unos niveles diarios medios comprendidos entre $117,8 \pm 23,9$ y $235,2 \pm 31,9$ pg/ml (media \pm SEM), con tendencia a aumentar progresivamente tras la hora de la alimentación (Fig. 1A). El suplemento dietético de triptófano no modificó esta distribución temporal, pero los niveles medios de melatonina fueron considerablemente inferiores ($P < 0,001$). En los peces sometidos a dieta ME, se observó un fuerte aumento de la melatonina en plasma, aunque con una distribución temporal a lo largo de los puntos de muestreo muy diferente a los peces alimentados con las otras dietas, y una marcada caída de la melatonina en el último de los puntos de ensayo.

El análisis del tejido intestinal no reveló diferencias significativas en los niveles de melatonina intestinal en ninguna de las tres dietas para el primer punto de ensayo, es decir, 120 minutos antes de la comida (Fig. 1B). En los peces con dieta STD, la melatonina intestinal aumentó significativamente a los 180 minutos de la comida ($P = 0,032$); así ocurrió con los de la dieta TRP a los 180 minutos, y también a los 480. Más aún, el grupo TRP mostró, por lo general, unos niveles de melatonina algo superiores a los del grupo STD, si bien las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas. El suplemento dietético de melatonina incrementó enormemente las concentraciones de melatonina intestinal y plasmática, alcanzando un valor medio 15 veces superior al de la dieta STD.

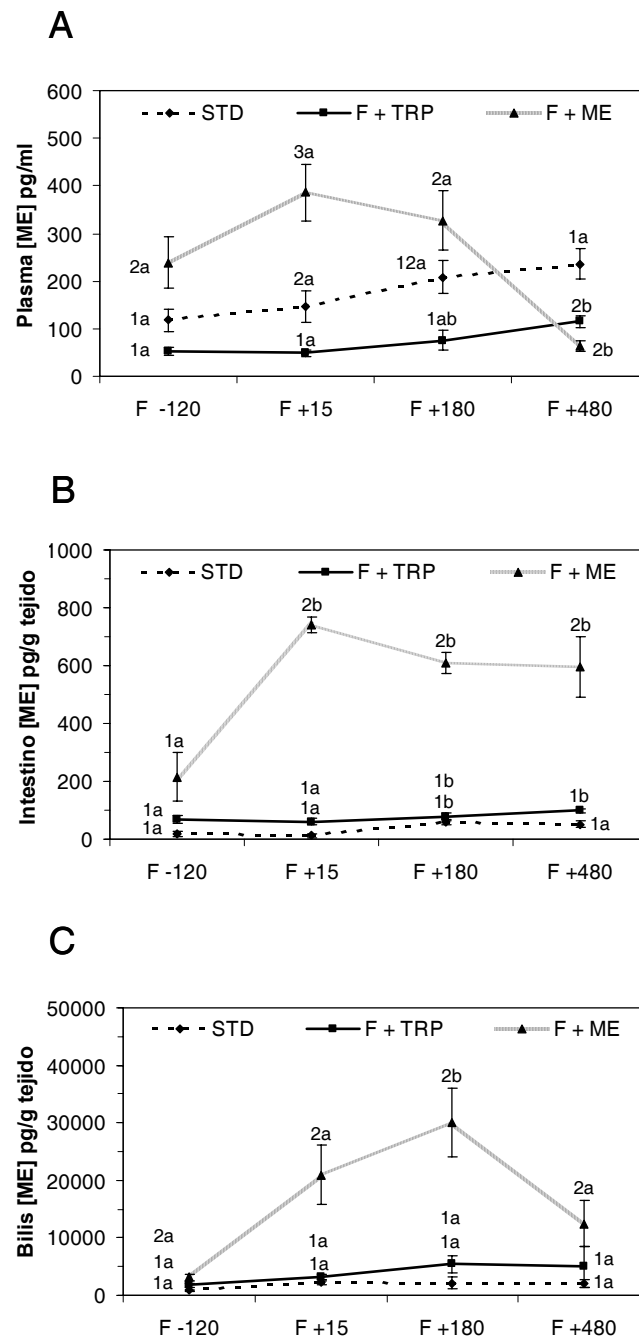


Fig. 1. Concentraciones de melatonina en plasma (A), intestino (B) y bilis (C) en lubinas alimentadas con dieta comercial (dieta STD), y tras una semana de suplemento dietético de triptófano (dieta TRP) o melatonina (dieta ME). Las dietas fueron enriquecidas, respectivamente, con 5 g de L-triptófano o 1 g de melatonina, por cada kilo de alimento seco en polvo. En abscisas se representan los momentos en que se realizaron los muestreos: 120 minutos antes de la comida, y 15, 180 y 480 minutos después de la misma. Los valores representan la media \pm SEM de 10 (A) o 6 peces (B, C). Los números sobre las barras del SEM indican las diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes momentos muestreados dentro de cada tratamiento ($p < 0,05$).

Por lo que respecta a la vesícula biliar, su peso medio total (músculo y contenido de bilis) fue mayor para las tres dietas en el primer punto de ensayo (77 ± 7 mg). Tras la comida, la vesícula se vaciaba y reducía su peso, alcanzando su valor medio mínimo 180 minutos después de la comida (41 ± 6 mg) ($P=0,02$). Luego, 480 minutos después de comer, comenzaba de nuevo a llenarse (48 ± 7 mg). Se encontraron elevadas concentraciones de melatonina en la bilis (Fig. 1C), con valores medios para la dieta STD comprendidos entre 803,3 y 2.287,0 pg/ml, sin apenas cambios significativos en respuesta al suplemento de TRP ($P>0,05$). Por otra parte, el suplemento de melatonina en la dieta produjo un enorme incremento de la concentración de melatonina en la bilis, alcanzando valores de hasta 30.000 pg/ml ($P<0,001$).

Serotonina

La media de la concentración de serotonina en plasma para la dieta STD fue de $15,0\pm 1,7$ ng/ml (media \pm SEM) (Fig. 2), mientras que este valor fue significativamente mayor en los peces que recibieron la dieta TRP ($P=0,001$). La dieta con melatonina, por otro lado, no tuvo efectos significativos sobre la concentración de serotonina en plasma ($P=1,000$). No se apreciaron diferencias importantes relacionadas con el tiempo transcurrido entre los puntos de ensayo ($P>0,05$).

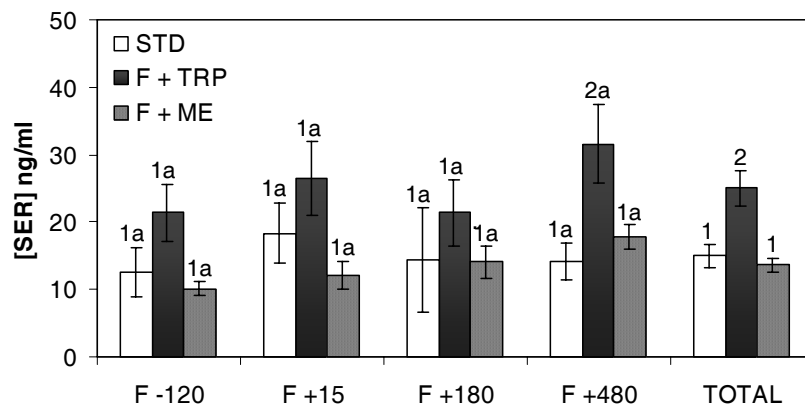


Fig. 2. Efecto del suplemento de triptófano o melatonina sobre la concentración de serotonina en plasma, determinados 120 minutos antes de la alimentación, y 15, 180 y 480 minutos después de la misma. Las barras en la parte sombreada de la parte derecha del gráfico indican la concentración media de serotonina para todos los puntos de muestreo de un tratamiento dado. Los resultados se muestran como medias \pm SEM. Los números sobre las barras del SEM indican las diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes momentos muestreados dentro de cada tratamiento ($p<0,05$).

Cortisol

En los peces con dieta STD, la concentración de cortisol fue aumentando progresivamente a lo largo de los puntos de ensayo, desde $158,3 \pm 31,7$ ng/ml unos 120 minutos antes de comer, hasta $446,4 \pm 58$ ng/ml a los 480 minutos de haber comido (Fig.3). Con la dieta TRP, no obstante, la concentración de cortisol se mantuvo baja en todo momento. Los peces sometidos a la dieta con suplemento de melatonina presentaron un patrón similar a los de la dieta TRP, con diferencias mínimas entre ambos tratamientos ($P=0,708$).

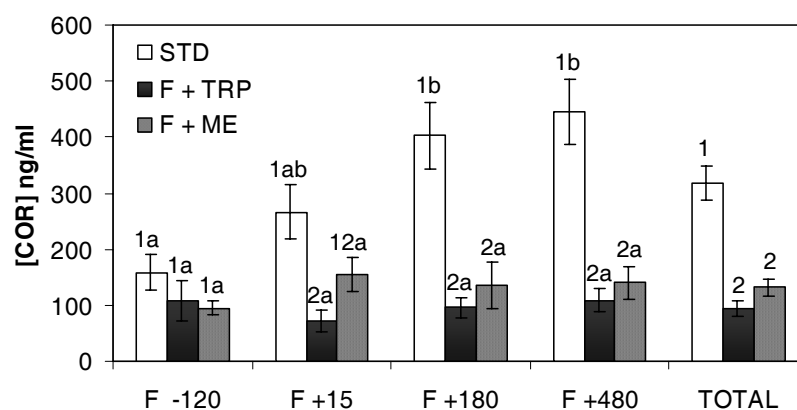


Fig. 3. Concentraciones de cortisol en plasma en diferentes momentos de muestreo, tras el suplemento dietético de triptófano o melatonina. Las barras en la parte sombreada de la parte derecha del gráfico indican la concentración media de cortisol para todos los puntos de muestreo de un tratamiento dado. Los resultados se muestran como medias \pm SEM. Los números sobre las barras del SEM indican las diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes momentos muestreados dentro de cada tratamiento ($p < 0,05$).

Actividad locomotora

La actividad locomotora del grupo de dieta STD, registrada por la fotocélula, alcanzó sus niveles máximos tanto al amanecer como al anochecer (Fig. 4A). La actividad cerca del alba (de 7:00 a 9:00 h) supuso el 27,9% de la actividad locomotora total, mientras que un 25% de dicha actividad se concentró en las horas cercanas al ocaso (de 19:00 a 23:00 h). La actividad fue diurna en su mayor parte, puesto que un 81,2% de ella se produjo entre las 7:30 a las 20:30 h.

Al complementar la dieta con TRP, se redujo el pico correspondiente al amanecer, mientras que el del ocaso desapareció prácticamente (Fig. 4B). Por otro lado, la actividad cercana a la hora de la alimentación se hizo más evidente. La actividad de la lubina continuó siendo principalmente diurna (74%) y se observó un aumento de la actividad 140 minutos antes de la hora de la alimentación. El suplemento de melatonina redujo en su conjunto la actividad locomotora global y provocó la aparición de una notable actividad anticipatoria a la hora de la alimentación (Fig. 4C). Esta actividad puede ser considerada una auténtica actividad anticipatoria al alimento (FAA), puesto que superó en más de 2,5 veces los niveles de referencia, comenzó 160 minutos antes de la hora de la alimentación y se prolongó hasta el momento de ésta. Cerca de un 90% de la actividad total se produjo durante el día, y un 71,2% de dicha actividad diurna correspondió a la actividad locomotora anticipatoria desde 160 minutos antes de la hora de la alimentación. No se pueden comparar los recuentos absolutos de actividad de los tres tratamientos de la Figura 4, puesto que variaron tanto los ajustes de la fotocélula como el número de peces dentro del tanque.

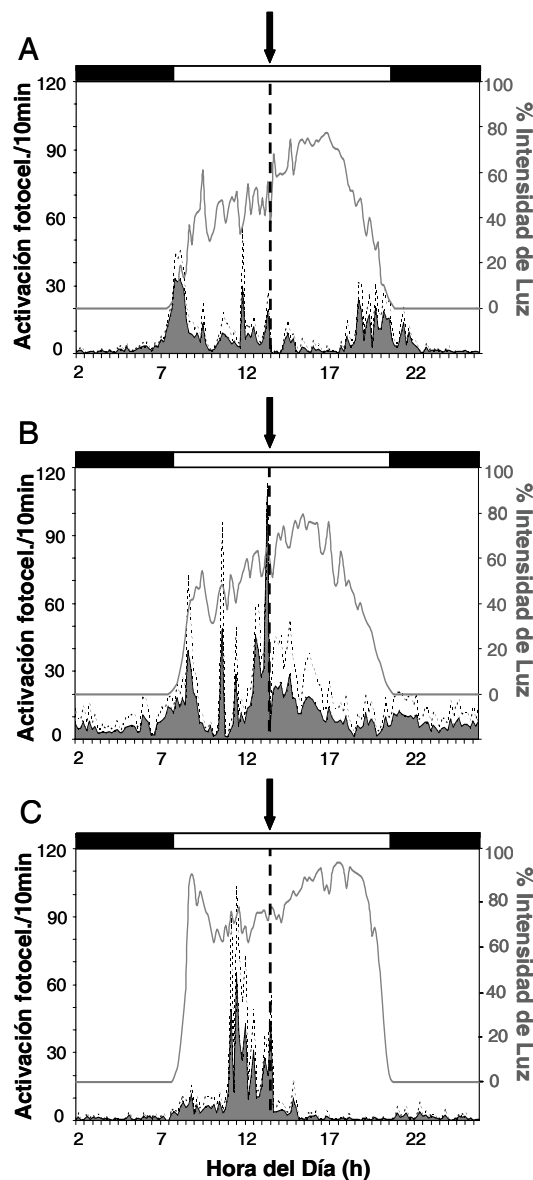


Fig. 4. Ondas medias de la actividad locomotora diaria de las tencas alimentadas con dieta STD (A), TRP (B) y ME (C). La hora de alimentación viene indicada por una línea de puntos y una flecha en la parte superior del gráfico. La barra negra situada sobre cada gráfico indica la duración de la escotofase, y el porcentaje de intensidad lumínica aparece en la gráfica en color gris. Los valores representan la media \pm SEM de 5 días.

4.5. Discusión

En este capítulo, se demuestra que el suplemento de triptófano en la dieta incrementa significativamente los niveles de serotonina en plasma de lubinas, pero no los de melatonina. Por otro lado, la suplementación de melatonina en la dieta produjo elevadas concentraciones de esta hormona en todos los tejidos y fluidos analizados (intestino, bilis y plasma). Hasta donde sabemos, la dinámica temporal de la administración oral de melatonina en peces no se había probado anteriormente, y estos resultados muestran que se trata de un método efectivo a la hora de incrementar sus concentraciones fisiológicas. Además, la ingesta diaria de esta hormona provocó una caída prolongada de la actividad locomotora, que sólo se recuperó 160 minutos antes de la hora de la alimentación. Tanto la dieta TRP como la dieta ME redujeron las concentraciones plasmáticas de cortisol.

En cerdos y otras especies, la ingesta de alimento eleva las concentraciones de melatonina en el tejido gastrointestinal y en el plasma (Bubenik, 2002). Sin embargo, los niveles de melatonina en lubinas se vieron muy poco afectados por la alimentación y, si bien mostraron una cierta tendencia a aumentar en intestino, bilis y plasma, las diferencias sólo fueron significativas para la dieta STD en el intestino, a las tres horas de haber comido.

Se ha publicado que la administración oral o enteral de triptófano en concentraciones que sobrepasan por mucho a las encontradas en la dieta normal, provocan un incremento de la concentración diurna de melatonina en plasma, incluso en ratas pinealectomizadas (Huether *et al.*, 1992). Se ha sugerido que en los mamíferos este aumento se debe en su mayoría a la síntesis de la melatonina gastrointestinal por parte de las células enterocromafines, y su consiguiente liberación en el plasma a través de la vena porta hepática (Huether *et al.*, 1992). En nuestro experimento, la dieta TRP, cuya concentración de triptófano doblaba a la de la dieta STD, aumentó los niveles de serotonina plasmática, poniendo de relieve la disponibilidad del triptófano para la ruta biosintética de

la serotonina y la melatonina. Sin embargo, a pesar de que el triptófano es el precursor de la serotonina y la melatonina, la dieta TRP sólo produjo un leve aumento de la melatonina en la bilis y en el tejido intestinal, y una reducción mínima y no significativa en el plasma sanguíneo. Las diferentes cantidades de triptófano utilizadas para la suplementación de la dieta con TRP, podrían ser la razón de la discrepancia entre nuestros resultados y los encontrados por Lepage *et al.* (2005a) o Huether *et al.* (1992); o bien, el hecho de que el triptófano no elevara la melatonina plasmática o la gastrointestinal, podría deberse a que sean las enzimas AA-NAT o HIOMT, en lugar de las concentraciones diurnas de triptófano, las que estén actuando como factores limitantes para la síntesis de la melatonina gastrointestinal. Ambas enzimas, y en particular la primera, presentan un bajo nivel de actividad diurna en la glándula pineal, para después aumentar mucho durante la noche (Iuvone *et al.*, 2005). Nuestros resultados apoyan esta hipótesis, puesto que muestran un incremento significativo de la serotonina plasmática, precursora de la melatonina, en lubinas alimentadas con la dieta TRP. Esteban *et al.* (2004) obtuvieron resultados similares tras administrar triptófano a ratas durante las horas diurnas; es más, la serotonina no aumentó tras la administración nocturna del triptófano, lo que estaría en consonancia con su papel de precursor nocturno de la melatonina.

El carácter lipofílico de la melatonina facilita una rápida difusión desde la dieta hasta la sangre: su concentración en intestino, plasma y bilis aumentó a los 15 minutos de ingerir la dieta ME. Este incremento es particularmente significativo en el tracto gastrointestinal, puesto que en intestino y bilis se alcanzan concentraciones 40 y 15 veces superiores a las de la dieta STD, respectivamente. Aun así, las concentraciones de melatonina en plasma tras la administración de dieta ME, se limitaron a doblar las de la dieta STD. Una posible explicación para un incremento tan bajo podría ser que la melatonina, tras ser absorbida al interior del tracto digestivo, viaje a través de la vena porta hepática hasta el hígado, donde un 92%-97% de toda la melatonina circulante se degradaría en cada paso por el hígado (Partridge y Mietus, 1980). Esta alta tasa catabólica del hígado explicaría también la corta vida media de la hormona en el plasma encontrada en trucha (30 minutos), tras la administración exógena de melatonina (Hernández-Rauda *et al.*, 2000). En el caso de humanos, las concentraciones de melatonina son mayores en el hígado que en la sangre (Messner *et al.*, 2001), y aún mayores en la bilis. De todos los tejidos y fluidos corporales estudiados hasta ahora, es en esta secreción donde se han encontrado las mayores concentraciones de melatonina (Tan *et al.*, 1999). En este estudio, hemos documentado por primera vez los valores de melatonina en la bilis de los peces, con valores comprendidos entre 803,3 y 2.287,0 pg/ml en lubinas alimentadas con la dieta STD, y detectando valores tan altos como 30.000 pg/ml tras

administrar la dieta ME. Aunque no se conoce la función concreta de estas concentraciones tan elevadas, Ekmekcioglu (2006) ha propuesto la existencia de una circulación enterohepática de melatonina (lumen intestinal, vena porta, hígado, bilis, lumen intestinal), cuyo resultado sería el de mantener un nivel protector de esta hormona en la mucosa gastrointestinal para hacer frente a la posible oxidación provocada por las secreciones digestivas.

Los peces criados en acuicultura están expuestos temporalmente a condiciones estresantes, debido a operaciones especiales de mantenimiento (por ejemplo, cambios de red, muestreos, etc.), lo que podría afectar negativamente a los animales y elevar sus tasas de enfermedad. El uso de medicamentos y anestésicos se ha considerado como una opción posible para reducir el estrés provocado en los peces por estas operaciones; pero el suplemento dietético con aminoácidos naturales u hormonas, menos proclives a provocar efectos secundarios, se presenta como una mejor opción. En nuestro estudio, en los peces alimentados con la dieta STD apareció un aumento progresivo de los niveles de cortisol en plasma, asociado probablemente al método de muestreo elegido. A pesar de que los niveles de cortisol en estos peces no actuaban como verdaderos controles, los tratamientos con ME o TRP demostraron ser efectivos para reducir el cortisol en plasma. Por tanto, proponemos los suplementos dietéticos con ME o TRP para reducir eficazmente el estrés de peces sometidos a prácticas que lo provocan. Estos resultados indican que tanto la dieta TRP como la ME reducen el cortisol plasmático bajo las condiciones estresantes del procedimiento de muestreo.

Se ha publicado que el suplemento dietético de triptófano reduce los niveles de cortisol en varias especies (Markus *et al.*, 2000a; Koopmans *et al.*, 2005), y este efecto puede venir dado por un elevado nivel de melatonina circulante (Lepage *et al.*, 2003). Sin embargo, en lubinas, la disminución de los niveles de cortisol provocada por el triptófano no parece estar mediada por la intervención de la melatonina, puesto que las concentraciones de melatonina no aumentaron al administrar triptófano. Por otro lado, el triptófano sí que elevó los niveles de serotonina en plasma, un neurotransmisor que parece ser beneficioso para hacer frente a situaciones de estrés (Markus *et al.*, 2000b). La actividad serotoninérgica podría actuar a cualquier nivel del eje HPI y se ha sugerido que lo hace a través de la activación del hipocampo (Øverli *et al.*, 2004), aunque sigue sin esclarecerse el papel biológico de la 5-HT en la secreción del cortisol. La melatonina de la dieta no tuvo efecto en la serotonina plasmática, como ocurrió con el triptófano, pero sí tuvo el mismo efecto inhibitor de los niveles de cortisol. Varios autores han demostrado que la melatonina actúa como

antagonista de los glucocorticoides en mamíferos (Konakchieva *et al.*, 1998; Hardeland *et al.*, 2006), a través de su acción directa sobre el hipotálamo (Xu *et al.*, 1995) o mediante un efecto directo sobre las glándulas suprarrenales que inhiben su secreción (Rao *et al.*, 2001). Es más, la melatonina induce en el pez cebra un patrón parecido al sueño (Zhdanova *et al.*, 2001). Existen algunas similitudes y diferencias cuando comparamos nuestros resultados con los encontrados en trucha arcoiris, en la que se observó que una dieta rica en triptófano provoca tanto una elevada actividad serotoninérgica cerebral, como unos niveles elevados de melatonina en plasma (Winberg *et al.*, 2001). No obstante, los efectos de una dieta con triptófano, tales como el aumento de la tolerancia al estrés y la reducción de las conductas agresivas, parecen venir dados por el sistema serotoninérgico cerebral, y no por un posible efecto de la melatonina (Lepage *et al.*, 2005b).

Los ritmos de actividad locomotora pueden sincronizarse por la luz, pero también por la hora de la alimentación (Madrid *et al.*, 2001). Nuestros datos, si bien deben ser tomados con precaución ya que sólo se registró la actividad locomotora de un tanque, muestran que las lubinas que recibieron la dieta STD exhibieron una actividad diurna en su mayor parte (aproximadamente un 81%). Estos datos concuerdan con los de Begout-Anras (1995), quien observó que la lubina es fundamentalmente diurna durante el verano. La administración del triptófano en la dieta provocó una menor amplitud del ritmo de actividad. Por otro lado, la ingesta de melatonina produjo una rápida reducción de la actividad locomotora que se prolongó hasta el alba, apareciendo una fuerte FAA 160 minutos antes de la hora de la alimentación. Estos resultados concuerdan con la conocida función sincronizadora de la melatonina y con su efecto inhibitor sobre la actividad locomotora de las especies diurnas (Murakami *et al.*, 2001).

En conclusión, nuestros resultados muestran que los suplementos dietéticos diurnos de melatonina, y no los de triptófano, aumentan de forma efectiva las concentraciones de melatonina en plasma. Sin embargo, ambas sustancias resultan ser igual de efectivas a la hora de reducir los altos niveles de cortisol observados en los peces alimentados con una dieta estándar. El suplemento dietético de triptófano o melatonina puede ser una herramienta útil en acuicultura para reducir el estrés producido en lubinas por las prácticas de cultivo.

4.6. Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por el CICYT (AGL2004-08137-CO4-02/ACU a J.A. Madrid) y una beca concedida a M.J. Herrero por la *Fundación Grupo Eroski*. Los autores están muy

agradecidos a Javier Sánchez Alarcón, Ana Beatriz Rodríguez y Carmen Barriga, de la Universidad de Extremadura; y a Adrián Tintos, de la Universidad de Vigo; por su amabilidad y apoyo técnico. Asimismo, los autores desean agradecer su inestimable ayuda al personal del Centro de Recursos Marinos del IMIDA (San Pedro del Pinatar). Mención especial merece J.L. Soengas, cuyos comentarios mejoraron el manuscrito. Los experimentos descritos cumplen con los *Principles of Animal Care* ('Principios de Protección de los Animales'; publicación n.º 86-23, revisión de 1985) del Instituto Nacional de Salud; así como con lo dispuesto en la legislación vigente en España (RD 1201/2005, de 10 de octubre) sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

4.7. Referencias bibliográficas

Begout Anras, M.L. 1995. Demand-feeding behaviour of sea bass kept in ponds: diel and seasonal patterns, and influences of environmental factors. *Aquacult. Int.* 3: 186-195.

Bubenik, G. A. 2002. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Digest. Dis. Sci.* 47: 2336–2348.

Ekmekcioglu, C. 2006. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomed. Pharmacother.* 60: 97-108.

Esquifino, A.I.; Pandi-Perumal, S.R.; Cardinali, D.P. 2004. Circadian organization of the immune response: A role for melatonin. *Clin. Immunol.* 4: 423-433.

Esteban, S.; Nicolaus, C.; Garmundi, A.; Rial, R.V.; Rodríguez, A.B.; Ortega, E.; Barriga Ibars, C. 2004. Effect of orally administered L-tryptophan on serotonin, melatonin, and the innate immune response in the rat. *Mol. Cell Biochem.* 267: 39-46.

Hardeland, R.; Poeggeler, B. 2003. Non vertebrate melatonin. *J. Pineal Res.* 34: 233-241.

Hardeland, R.; Pandi-Perumal, S.R.; Cardinali, D.P. 2006. Melatonin. *J. Biocel.* 38: 313-316.

Hernández-Rauda, R.; Miguez, J.M.; Ruibal, C.; Aldegunde, M. 2000. Effects of melatonin on dopamine metabolism in the hypothalamus and the pituitary of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Zool.* 287: 440-444.

Hueter, G.; Poeggeler, B.; Reimer, A; George, A. 1992. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: Evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci.* 51: 945-953.

Iuvone, P.M.; Tosini, G.; Pozdeyev, N.; Haque, R.; Klein, D.C.; Chaurasia, S.S. 2005. Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 24: 433-456.

Konakchieva, R.; Mitev, Y.; Almeida, O.; Patchev, V.K. 1998. Chronic melatonin treatment counteracts glucocorticoid-induced dysregulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in the rat. *Neuroendocrinology*. 67: 171-180.

Koopmans, S.J.; Ruis, M.; Dekker, R.; Diepen, H.; Korte, M.; Mroz, Z. 2005. Surplus dietary tryptophan reduces plasma cortisol and noradrenaline concentrations and enhances recovery after social stress in pigs. *Physiol. Behav.* 85: 469-478.

Lepage, O.; Tottmar, O.; Winberg, S. 2002. Elevated dietary intake of L-tryptophan counteracts the stress-induced elevation of plasma cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 205: 3679-3687.

Lepage, O.; Molina-Vilchez, I.; Pottinger, T.; Winberg, S. 2003. Time-course of the effect of dietary L-tryptophan on plasma cortisol levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 206: 3589-3599.

Lepage, O.; Larson, E.T.; Mayer, I.; Winberg, S. 2005a. Tryptophan affects both gastrointestinal melatonin production and interrenal activity in stressed and nonstressed rainbow trout. *J. Pineal Res.* 38: 264-271.

Lepage, O.; Larson, E.T.; Mayer, I.; Winberg, S. 2005b. Serotonin, but not melatonin, plays a role in shaping dominant-subordinate relationships and aggression in rainbow trout. *Horm. Behav.* 48: 233-242.

Macchi, M.M.; Bruce, J.N. 2004. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front. Neuroendocrin.* 25: 177-195.

Madrid, J.A.; Boujard, T.; Sánchez-Vázquez, F.J. 2001. Feeding rhythms. En: D. Houlihan; M. Jobling; T. Boujard, eds. *Food intake in fish*. Oxford. Blackwell Science Ltd.: 189-215.

Markus, C.R.; Olivier, B.; Pannhuysen, G.; Tuiten, A.; Van der Gugten, J.; Alles, M.S.; Tuiten, A.; Westenberg, G.M.; Fekkes, D.; Koppeschaar, H.; de Haan, E.H.F. 2000a. The bovine protein α -

lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentrations, and improves mood under stress. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 1536-1544.

Markus, C.R.; Pannhuysen, G.; Tuiten, A.; Koppeschaar, H. 2000b. Effects of food on cortisol and mood in vulnerable subjects under controllable and uncontrollable stress. *Physiol. Behav.* 70: 333-342.

Messner, M.; Huether, G.; Lorf, T.; Ramadori, G.; Schwörer, H. 2001. Presence of melatonin in the human hepatobiliary-gastrointestinal tract. *Life Sci.* 69: 543-551.

Murakami, N.; Kawano, T.; Nakahara, K.; Nasu, T.; Shiota, K. 2001. Effect of melatonin on circadian rhythm, locomotor activity and body temperature in the intact house sparrow, Japanese quail and owl. *Brain Res.* 889: 220-224.

Øverli, Ø.; Korzan, W.J.; Larson, E.T.; Winberg, S.; Lepage, O.; Pottinger, T.G.; Renner, K.J.; Summers, C.H. 2004. Behavioral and neuroendocrine correlates of displaced aggression in trout. *Horm. Behav.* 45: 324-329.

Partridge, W.M.; Mietus, L.J. 1980. Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 34: 1761-1763.

Poeggeler, B.; Cornélissen, G.; Huether, G.; Hardeland, R.; Józsa, R.; Zeman, M.; Stebelova, K.; Oláh, A.; Bubenik, G.; Pan, W.; Otsuka, K.; Schwartzkopff, O.; Bakken, E.E.; Halberg, F. 2005. Chronomics affirm extending scope of lead in phase of duodenal vs. pineal circadian melatonin rhythms. *Biomed. Pharmacother.* 59: 220-224.

Porter, M.; Randall, C.; Magwood, S.; Fütter, W.; Bromage, N. 2000. Photoperiod, melatonin and the control of maturation in farmed fish. *Comp. Biochem. Phys. A.* 126: 117.

Rao, N.V.A.; Raza, B.; Prasad, J.K.; Razi, S.S.; Gottardo, L.; Ahmad, M.F.; Nussdorfer, G.G. 2001. Melatonin decreases glucocorticoid blood concentration in the rat and palm squirrel, acting directly on the adrenal gland. *Biomed. Res.* 22: 115-117.

Roche, H.; Bogé, G. 1996. Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. *Mar Environ. Res.* 41: 27-43.

Rotllant, J.; Ruane, N.M.; Caballero, M.J.; Montero, D.; Tort, L. 2003. Response to confinement in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) is characterised by an increased biosynthetic capacity of interrenal tissue with no effect on ACTH sensitivity. *Comp. Biochem. Phys. A.* 136: 613-620.

Sprenger, J.; Hardeland, R.; Fuhrberg, B.; Han, S-Z. 1999. Melatonin and other 5-methoxylated indoles in yeast: Presence in high concentrations and dependence on tryptophan availability. *Cytologia.* 64: 209-213.

Stephan, F.K. 1997. Calories affect zeitgeber properties of the feeding entrained circadian oscillator. *Physiol. Behav.* 62: 995-1002.

Tan, D.; Manchester, L.C.; Reiter, R.J.; Qi, W.; Hanes, M.A.; Farley, N.J. 1999. High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life Sci.* 665: 2523-2529.

Tintos, A.; Míguez, J.M.; Mancera, J.M.; Soengas, J.L. 2006. Development of a microtitre plate indirect ELISA for measuring cortisol in teleosts, and evaluation of stress responses in rainbow trout and gilthead sea bream. *J. Fish Biol.* 68: 251-263.

Vera, L.M.; López-Olmeda, J.F.; Bayarri, M.J.; Madrid, J.A.; Sánchez-Vázquez, F.J. 2005. Influence of light intensity on plasma melatonin and locomotor activity rhythms in tench. *Chronobiol. Int.* 22: 67-78.

Wendelaar Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77: 591-625.

Winberg, S.; Øverli, Ø.; Lepage, O. 2001. Suppression of aggression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary L-tryptophan. *J. Exp. Biol.* 204: 3867-3876.

Xu, D.; Li, J.C.; Ma, K.C.; Wang, M. 1995. Effects of melatonin on hypothalamic gamma-aminobutyric acid, aspartic acid, glutamic acid, beta-endorphin and serotonin levels in mice. *Biol. Signals.* 4: 225-231.

Yáñez, J.; Meissl, H. 1995. Secretion of methoxyindoles from trout pineal organs *in vitro*: indication for a paracrine melatonin feedback. *Neurochm. Int.* 27: 195-200.

Zhdanova, I.V.; Wang, S.Y.; Leclair, O.U.; Danilova, N.P. 2001. Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish. *Brain Res.* 903: 263-268.



IV. DISCUSIÓN GENERAL

IV. DISCUSIÓN GENERAL

En el presente estudio se investigaron los ritmos biológicos de peces teleósteos y la influencia de factores bióticos y abióticos en su sincronización. Se analizaron los ritmos de actividad locomotora y alimentaria, así como el carácter endógeno y/o exógeno de los mismos, y la influencia de los sincronizadores: luz y alimento (abiótico y biótico, respectivamente), utilizando como modelo la tenca. A su vez, se profundizó en la relación existente entre la estructura jerárquica de los grupos de peces y los ritmos de actividad, además de la selección de macronutrientes. Para ello, se estudiaron los ritmos de demanda voluntaria de alimento y la autoselección dietaria de individuos de trucha alpina, mantenidos en grupo y marcados individualmente mediante *PIT tag*. Asimismo, se analizó la influencia de los niveles endógenos de melatonina, modificados mediante la administración de melatonina exógena y de su aminoácido precursor (triptófano) en la dieta, sobre la concentración de cortisol y el ritmo de actividad locomotora en la lubina.

Los resultados obtenidos mostraron que la tenca es una especie de comportamiento estrictamente nocturno, cuyos ritmos de actividad están dirigidos de forma endógena por un marcapasos circadiano. Sin embargo, la influencia del marcapasos circadiano fue débil, ya que los ritmos de curso libre no aparecieron en todos los individuos, y hubo cierta inestabilidad en sus valores entre individuos. Además, se observó que la luz puede ejercer un importante efecto de enmascaramiento, bloqueando la expresión del ritmo biológico. Así, la duración de la fase de oscuridad determinó de forma directa la duración de la actividad locomotora en tencas, y su comportamiento nocturno se mantuvo incluso cuando la intensidad de luz de la fotofase era muy tenue (0,3 lux). Las tencas también conservaron su comportamiento locomotor nocturno incluso cuando el alimento estaba sólo disponible durante la fase de luz. En este caso eran capaces de alimentarse durante la fotofase, manteniendo similares tasas de crecimiento a la de las tencas alimentadas durante la fase de oscuridad, al menos durante el periodo de estudio. Sin embargo, el grupo de peces alimentado durante la escotofase, al contrario que el alimentado durante la fase de luz, mostró actividad anticipatoria al alimento. Se observó que en condiciones de oscuridad constante, las tencas sincronizaban su actividad al alimento suministrado de forma regular (pudiendo desarrollar también actividad anticipatoria), y algunas entraron en curso libre cuando dejó de suministrarse el alimento.

Por lo general, los peces necesitan muy pocos ciclos de transición para resincronizarse con un nuevo ciclo LD. En roedores se ha comprobado que tras 6h de adelanto o retraso del ciclo luz-oscuridad, los animales tardan 3-4 días hasta que se sincronizan de nuevo. En la mayoría de los peces estudiados, esto ocurre en tan solo 1 día, sugiriendo que su reloj interno es fácilmente sincronizable y/o fácilmente enmascarable por la luz, lo que caracteriza la plasticidad de los ritmos biológicos en peces teleósteos (Reebs, 2002). De hecho, las características de la luz a la que los individuos están expuestos influyen en el marcapasos circadiano, como por ejemplo la duración del fotoperiodo. El espectro lumínico también afecta a la organización circadiana de los organismos (Pohl, 1999; Ziv *et al.*, 2007), teniendo determinadas longitudes de onda menor efecto en la supresión de síntesis de melatonina que otras, en función de los pigmentos retinales del individuo y de la hora de administración del pulso de luz (Brainard *et al.*, 1984; Honma *et al.*, 1992). Asimismo, los cambios en la intensidad lumínica pueden inducir inversiones (Eriksson, 1978).

Los ritmos natatorios y de alimentación no están necesariamente en fase en todas las especies de peces (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1996), (Vera *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha observado que otros ciprínidos de ritmos locomotores más flexibles, como el carpín dorado, concentran sus ritmos de actividad cerca de la hora de alimentación (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1997). En este sentido, es frecuente que los patrones diarios sean el resultado de que se concentre la actividad vital en el momento en que existe un balance adecuado entre una mayor disponibilidad de alimento y un menor riesgo de predación (Helfman, 1993). Del mismo modo, diversos procesos biológicos se activan anticipando horarios de alimentación periódicos, no sólo en cuanto a respuestas conductuales, como pueda ser el acercamiento hacia el área de comida (Brännäs, 1998), sino también en cuanto a funciones gastrointestinales y metabólicas (Vera *et al.*, 2007), y muchos de estos ritmos persisten durante varios ciclos si se interrumpe la alimentación (Boulos y Terman, 1980; Vera *et al.*, 2007). Este hecho favorece un mejor aprovechamiento de la comida disponible (Sánchez-Vázquez y Madrid, 2001), si bien no pudo demostrarse en el caso de las tencas alimentadas durante la fase de luz. La falta de actividad anticipatoria en los peces alimentados durante la fotofase se puede atribuir al efecto enmascarante de la luz que, a pesar de que inhibía su actividad locomotora durante el día, no impidió que pudieran alimentarse de forma eficiente. Estos resultados sugieren que, aunque las tencas se ajustan a un nicho ecológico estrictamente nocturno, la plasticidad en los ritmos les permite aumentar sus posibilidades de supervivencia en entornos variables y adaptarse a los cambios que se produzcan en factores ambientales determinantes, como la disponibilidad de alimento. Por otro lado, el hecho de que tras eliminar los estímulos lumínicos y suministrar alimento a un horario regular, la tenca sincronizara su actividad locomotora al alimento

(mostrando en algunos casos actividad anticipatoria), indican que el horario regular de alimentación actúa como un verdadero *zeitgeber* en esta especie. Estos resultados están de acuerdo con la teoría multioscilaria, en la que al menos dos marcapasos diferentes: uno sincronizado por la luz (LEP, "Light entrainable pacemaker") y otro por el alimento (FEP "Feeding entrainable pacemaker") organizan el sistema circadiano (Aschoff y Weber, 1976; Mistlberger, 1994). Además, otros factores, bióticos y abióticos (distintos de la luz y el alimento), pueden también sincronizar los ritmos de actividad en peces (Zhdanova y Reebbs, 2006).

La flexibilidad en los ritmos de actividad propia de los peces es más evidente en las otras dos especies estudiadas: trucha alpina y lubina. De hecho, son especies de comportamiento dual, en las que algunos individuos presentan ritmos de actividad nocturnos y otros, diurnos y, a su vez, el mismo individuo puede mostrar inversiones de fase (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1995b; Alanära y Brännäs, 1997). El dualismo puede ser secuencial (e.g. cambios estacionales) o concurrente (en un mismo momento, hay individuos diurnos y nocturnos) (Alanära y Brännäs, 1997) y ambos tipos de dualismo parecen darse tanto en lubina como en Arctic charr. En el caso de la lubina, las inversiones parecen estar relacionadas con factores como las estaciones del año o la disponibilidad de alimento (Bengout Anras, 1995; Sánchez-Vázquez *et al.*, 1998b). No obstante, ya que en lubina no se han empleado técnicas para diferenciar el comportamiento de cada individuo dentro del grupo, no ha podido demostrarse lo que en otras especies de peces (incluida la trucha alpina), donde algunos estudios indican que, además de aquellos factores, el dualismo concurrente entre individuos de un grupo puede aparecer como consecuencia de las relaciones sociales que se crean con la finalidad de evitar competencia intraespecífica (Randolph y Clemens, 1976; Kadri *et al.*, 1997; Alanära y Brännäs, 1997; Alanära *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002).

En el experimento llevado a cabo con 20 individuos de trucha alpina por tanque, se observó que los comederos a demanda eran activados 24 horas al día. Pero en los estudios que se realizan con grupos de peces, es interesante saber si un determinado comportamiento es propio del grupo o solamente de un pez individual. Para conocer qué peces estaban activando los dispensadores y cuándo lo hacían, se utilizó el marcaje individual mediante *PIT tag* (Brännäs y Alanära, 1993), con el fin de determinar la relación existente entre la estructura social del grupo de peces y la activación de los diferentes comederos. Mediante esta técnica, se observó que muy pocos peces en cada tanque (1-4 individuos) realizaban la mayoría de las activaciones de los dispensadores y que además, éstos se distribuían espacial y temporalmente los tres comederos que se habían ubicado en cada uno de los tanques de experimentación. De esta manera, algunos individuos eran diurnos, mientras que

otros eran nocturnos, y algunos podían incluso activar determinados comederos durante la fotofase y otros comederos diferentes durante la escotofase, contribuyendo en su totalidad a un registro continuado de demandas a lo largo de todo el ciclo diario. Estos resultados coinciden con los encontrados por Alanärä *et al.* (1997) y apoyan la teoría de que la competencia intraespecífica puede determinar los ritmos de actividad de los individuos mantenidos en grupo, al menos en algunas especies de peces como la trucha alpina. Por el contrario, en tenca esto no ocurrió y sus ritmos de actividad estrictamente nocturnos, se mantuvieron incluso en grupos muy numerosos.

Tras una fase en la que los tres comederos ubicados por tanque dispensaban dieta estándar, se procedió a rellenar cada uno de los reservorios con una dieta diferente de macronutrientes, para verificar si la metodología empleada nos permitía además estudiar cómo afectaba el comportamiento social en la autoselección dietaria. Efectivamente, la identificación de cada uno de los individuos permitió comprobar que las contribuciones individuales de selección de macronutrientes, servían para obtener un patrón global de selección bastante balanceado, si bien existieron diferencias entre tanques y fundamentalmente entre los individuos de los diferentes tanques (debidas principalmente a la territorialidad). Por este motivo, la autoselección dietaria en la trucha alpina no parece ser una herramienta muy fiable para diseñar dietas específicas en base a las preferencias de los peces, al contrario que en otras especies de peces como en lubina (Rubio *et al.*, 2003). No obstante, el empleo del marcaje individual combinado con el uso de dispensadores conteniendo dietas de macronutrientes, supuso una metodología de gran utilidad para profundizar no sólo en los ritmos de actividad, sino también en el comportamiento alimentario de los individuos de trucha alpina dentro del grupo. Sus posibilidades en este sentido son numerosas: diferencias en la selección dietaria entre el día y la noche, demanda de macronutrientes de los individuos más activos del tanque, etc.

En otros experimentos ya se había observado que los individuos más activos o líderes de grupo, activaban los comederos no sólo para alimentarse a sí mismos, sino también para alimentar al resto de los individuos del tanque (Alanärä y Brännäs, 1996). Generalmente, se ha asumido que los peces más activos son los peces dominantes (Bailey *et al.*, 2000), debido a que los niveles elevados de cortisol y serotonina cerebral en los individuos subordinados puede generar una inhibición de la actividad (Winberg y Nilsson, 1993a; 1993b) y una menor tasa de crecimiento en varias especies, incluida la trucha alpina (Alanärä *et al.*, 1998), aunque esto último no ocurría en lubina (Covès *et al.*, 2006). Determinados estudios han demostrado que la serotonina cerebral aumentaba en peces sometidos a condiciones de estrés (Winberg y Nilson, 1993) y que el

incremento de serotonina disminuía la ingesta (Rubio *et al.*, 2006). Al parecer, en peces subordinados la serotonina cerebral aumenta y se prolonga este aumento durante 20 días, mientras que en dominantes, tras un encuentro agresivo, vuelve a niveles basales tras 2 horas. Esto mismo ocurría con el cortisol (Gilmour *et al.*, 2005).

Aunque se desconoce cuál es el vínculo fisiológico entre la ruta del cortisol y la de la serotonina-melatonina, varias evidencias sugieren que puede existir un control de la secreción de cortisol por la monoamina serotonina. De hecho, Höglund *et al.* (2001) observaron una correlación entre la serotonina y la ACTH, y por consiguiente el cortisol, en donde la elevación de dopamina, especialmente en individuos dominantes, favorecía que elevados valores de cortisol volvieran a niveles basales y contrarrestaba el incremento de actividad serotoninérgica cerebral inducido por el estrés. Otras evidencias del vínculo comentado, incluyen la correlación entre la actividad serotoninérgica y el cortisol plasmático (Winberg y Lepage, 1998; Øverli *et al.*, 1999a; 1999b), los cambios dosis-dependientes en el cortisol circulante provocados por la administración de un agonista del receptor de serotonina (Winberg *et al.*, 1997; Höglund *et al.*, 2002) y la modulación de cortisol bajo condiciones de estrés tras suministrar triptófano (Lepage *et al.*, 2002; 2003). El cortisol mantiene la homeostasis en condiciones de estrés, movilizandando energía (libera glucosa) y favoreciendo que el organismo pueda satisfacer su mayor demanda metabólica (Mommensen *et al.*, 1999). En principio, niveles elevados de cortisol pueden disminuir la ingesta (Gregory y Word, 1999). Pero si el estrés es crónico, el cortisol puede estimular la ingesta, si bien no se produce crecimiento (Bernier *et al.*, 2004) debido a que aumenta la tasa metabólica (Barton e Iwama, 1991).

En trucha alpina, Alanärä *et al.* (1998) encontraron que los individuos que llevaban a cabo un gran número de demandas en los comederos, mostraban elevadas tasas de crecimiento y baja actividad serotoninérgica, mientras que aquellos con bajo o nulo número de demandas, tenían bajas tasas de crecimiento y elevados niveles de serotonina. De esta manera, la serotonina podría utilizarse como marcador neuroquímico de estrés y de rango social en salmónidos (Wiberg y Nilsson, 1993a).

En salmones los individuos dominantes mostraban un patrón de actividad diurno, mientras que los individuos menos competitivos evitaban confrontaciones, restringiendo su actividad a horas de oscuridad. Esto era debido a que durante la noche se producía una reducción de la agresividad en los salmones, permitiendo la cercanía de coespecíficos de menor rango social (Fraser *et al.*, 1993). Los niveles de melatonina permanecen altos durante la noche y bajos durante la fase de luz.

Los efectos hipnóticos de la melatonina provocan un descenso de la actividad locomotora y un estado de somnolencia en el pez cebra, una especie diurna (Zhdanova *et al.*, 2001). Este efecto está mediado vía receptores específicos de la melatonina, ya que los antagonistas de los receptores de melatonina atenúan o bloquean este efecto (si bien no se conoce la localización de la estructura responsable) (Zhdanova *et al.*, 2001). Además, durante la noche, cuando los niveles de melatonina aumentan, los de cortisol suelen ser bajos, como ocurre en lubina (García-Allegue *et al.*, 2001 y Cerdá-Reverter *et al.*, 1998). En el caso de los salmones, la disminución de agresividad observada durante la noche, podría suponerse mediada por la melatonina, si bien sería necesario realizar experimentos en este sentido, para clarificar esta cuestión.

En cualquier caso, nuestros resultados obtenidos en lubina estarían de acuerdo con esta teoría, ya que tras la administración oral de melatonina o de su aminoácido precursor (triptófano), los niveles de cortisol se mantuvieron estables en los distintos puntos de muestreo, al contrario que en lubinas alimentadas con dieta estándar sin suplementar, en las que se observó un aumento progresivo de los niveles de cortisol. Nuestros resultados sugieren un papel antiestrés del triptófano y de la melatonina exógenos en lubina.

Además se demostró la asimilación del triptófano y de la melatonina suplementadas en la dieta, al comprobar que el suplemento dietético de melatonina aumentó los niveles de melatonina en plasma, intestino y bilis. Aunque el suplemento de triptófano no provocó incrementos en los niveles de melatonina, sí aumentaron los niveles de serotonina en sangre, confirmando la biodisponibilidad del triptófano para la síntesis de la serotonina.

El suplemento de triptófano en la dieta es eficaz para contrarrestar los niveles de cortisol cuando se suministra durante una semana (Lepage *et al.*, 2003). Su utilización puede resultar de interés para minimizar los efectos del estrés a los que los peces de cultivo se ven sometidos durante operaciones especiales de mantenimiento (transporte, cambio de redes, etc.). Al tratarse de un aminoácido esencial, el tratamiento no produciría los efectos secundarios negativos que pueden conllevar otros tratamientos con antibióticos u otras sustancias de síntesis química.

La melatonina desarrolla un importante papel en la organización circadiana de las especies, pero además presenta propiedades antioxidantes, inmunoestimulantes y antiestrés, e interviene en la regulación de la maduración gonadal. Por todo ello, demostrar su asimilación tras ser administrada en la dieta y su efecto de contrarrestar los niveles de cortisol, es de aplicación en el

cultivo de especies de acuicultura. Este estudio es de especial relevancia en la lubina, cuya sensibilidad a los agentes estresantes parece ser superior a las de otras especies de peces (Rotllant *et al.*, 2003). El efecto del mantenimiento de los niveles de cortisol, puede asociarse a elevados niveles de triptófano, serotonina o melatonina. En el caso del suplemento de triptófano, este efecto parece estar mediado por la serotonina, puesto que no provocó un aumento de la melatonina. Sin embargo, el efecto antiestrés observado tras administrar melatonina parece, sin embargo, estar mediado directamente por efecto de la misma. En mamíferos, se ha sugerido que la melatonina contrarresta el incremento de glucocorticoides inducido por estrés, a través de sus efectos a nivel del hipotálamo (Xu *et al.*, 1995) o bien mediante una acción directa sobre las glándulas adrenales, inhibiendo su secreción (Rao *et al.*, 2001).

El tratamiento con melatonina sincronizó la actividad locomotora de la lubina, aunque estos resultados deben ser considerados con cautela, ya que fueron obtenidos a partir del registro de un solo tanque. Tras administrar melatonina en la dieta, esta especie dual concentró sus ritmos de actividad en la hora de la alimentación. La ingesta de alimento parece estimular la producción de melatonina en el digestivo (Lepage *et al.*, 2005a; Vera *et al.*, 2007), y el aumento en la concentración de melatonina en respuesta al alimento puede encarrilar la secuencia de los procesos digestivos esenciales para el mejor aprovechamiento de la alimentación (Bubenik *et al.*, 1996). En diversos animales se ha observado el papel sincronizador de la melatonina exógena (Redman *et al.*, 1983; Agez *et al.*, 2007). Esta sincronización puede verse afectada por diversos factores, como la vía de administración, la dosis suministrada, la duración de la infusión de melatonina, las características iniciales del comportamiento del animal (Pitrosky *et al.*, 1999; Pertsov, 2006) y el momento de la administración, que puede afectar a la densidad o afinidad de los receptores (Iigo *et al.*, 2003; Agez *et al.*, 2007). En ratas, otro de los factores que afectó fue la duración de la infusión de melatonina, observándose una mejor sincronización en infusiones de 1 u 8 horas de duración, que en aquellas de 18 horas, sin que la pinealectomía modificase estos resultados (Pitrosky *et al.*, 1999). Además, se ha comprobado que los genes reloj en ratas no están directamente involucrados en la resincronización tras la administración de melatonina, si bien los receptores nucleares huérfanos (NORs) sí parecen estarlo, pudiendo influenciar el marcapasos del SCN a través de la expresión de *Bmal1* (Agez *et al.*, 2007).

En peces, la melatonina se ha suministrado inyectada o bien en implantes, sin que hasta la realización de nuestro trabajo se hubiese probado su asimilación en plasma y tejidos, tras la administración oral con la dieta. Esta última vía de administración facilita su utilización para futuras

investigaciones, así como en instalaciones de acuicultura. En resumen, profundizar en los aspectos endocrinológicos de los ritmos biológicos y sus efectos sobre los ritmos de actividad y los mecanismos circadianos en peces teleósteos, aporta información interesante en cuanto a la actividad y comportamiento de los individuos estudiados y su conducta en grupo. Además, puede ser clave para comprender el patrón de actividad dual en determinadas especies de peces, como en lubina y trucha alpina, debido a las alteraciones fisiológicas y conductuales que se generan por la administración de melatonina exógena, la competencia intraespecífica y/u otros sincronizadores.

Con los estudios planteados en esta Tesis doctoral, se ha conseguido una información útil para diseñar estrategias adecuadas en el cultivo de las especies *Tinca tinca*, *Salvelinus alpinus* y *Dicentrarchus labrax*, que introducirá mejoras en las etapas de producción, incrementando el bienestar animal y reduciendo los costes de producción.



V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

1. La tenca presenta un ritmo diario de actividad estrictamente nocturno, que se sincroniza paulatinamente en algunos individuos tras invertir el ciclo LD y persiste bajo condiciones de curso libre, revelando su naturaleza circadiana y la existencia de un marcapasos encarrilado por la luz.
2. La fase activa de la tenca está controlada directamente por la duración del fotoperiodo y su conducta estrictamente nocturna persiste aun bajo condiciones de luz muy tenue (0,3 lux). Estos resultados muestran que la luz ejerce un importante efecto de enmascaramiento en los ritmos de actividad de la tenca, bloqueando a menudo la expresión de un débil marcapasos circadiano característico de peces. El patrón nocturno de actividad locomotora no se vio modificado por la densidad de animales, ni por el suministro diurno de alimento, por lo que además de actuar como factor enmascarante, la luz aparece como el *zeitgeber* estudiado de mayor relevancia en la sincronización de los ritmos diarios de actividad en tenca.
3. Los ritmos de alimentación a demanda en la tenca son también nocturnos, y en condiciones de oscuridad constante sincroniza su actividad motora a la alimentación regular (mostrando actividad anticipatoria), lo que indica la existencia de un marcapasos encarrilado por el alimento. Nuestros resultados apoyan la teoría multioscilaria, en la que al menos dos marcapasos endógenos que se sincronizan con factores ambientales (luz y alimento), conducen los ritmos biológicos. Además, la tenca tiene capacidad para alimentarse durante el día de forma efectiva; esta flexibilidad le permite un mayor acceso al alimento y por tanto, mayores posibilidades de supervivencia en entornos variables.
4. La nueva metodología presentada, combinando el uso de *PIT tags* con varios comederos autodemanda que contienen dietas incompletas de macronutrientes, permitió un seguimiento de la actividad alimentaria en individuos de trucha alpina mantenidos en grupo. Los individuos de trucha alpina presentan una fuerte competencia intraespecífica que causa la preferencia por uno o varios comederos en un horario concreto. Este efecto provoca actividad dual concurrente en los ritmos de demanda de alimento, y una cierta dispersión en los patrones de selección de macronutrientes entre individuos. La metodología ensayada es de utilidad para realizar estudios

de comportamiento alimentario, puede emplearse en otras especies de peces y presenta posibilidades de incorporar mejoras adicionales.

5. El suplemento dietético de triptófano aumenta los niveles de serotonina en sangre, confirmando la biodisponibilidad del triptófano para la síntesis de la serotonina. Sin embargo, no aumenta los niveles de melatonina en plasma, intestino o bilis.
6. El suplemento dietético de melatonina, al contrario que el de triptófano, aumenta las concentraciones de melatonina en plasma, intestino y bilis muy significativamente.
7. Tanto el suplemento dietario de triptófano como el de melatonina tras 7 días de administración, contrarrestan los altos niveles de cortisol plasmático observados en lubina sometida a la manipulación que exige el muestreo de los animales. Además, la actividad locomotora en lubina puede ser sincronizada por la administración regular de la dieta suplementada con melatonina.



VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbot, J.C.; Dill, L.M. 1989. The relative growth of dominant and subordinate juvenile steelhead trout (*Salmo gairdneri*) fed equal rations. Behaviour. 108: 104-113.

Adron, J.W.; Grant, P.T.; Cowey, C.B. 1973. A system for the quantitative study of the learning capacity of rainbow trout and its application to the study of food preferences and behavior. J. Fish Biol. 5: 625-636.

Agez, L.; Laurent, V.; Pévet, P.; Masson-Pévet, M.; Gauer, F. 2007. Melatonin affects nuclear orphan receptors mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. Neurosci . 19: 522-530.

Alanära, A.; Brännäs, E. 1993. A test of the individual feeding activity and food size preference in rainbow trout using demand feeders. Aquacult. Int. 1: 47-54.

Alanära, A.; Brännäs, E. 1996 Dominance in demand-feeding behavior in Arctic charr and rainbow trout: the effect of stocking density. J. Fish Biol. 48: 242-254.

Alanära, A.; Brännäs, E. 1997. Diurnal and nocturnal feeding activity in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Can J. Fish Aquat. Sci. 54: 2894-2900.

Alanära, A.; Winberg, S.; Brännäs, E.; Kiessling, A.; Höglund, E.; Elofsson, U. 1998. Feeding behaviour, brain serotonergic activity, and energy reserves of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) within a dominance hierarchy. Can. J. Zool. 76: 212-220.

Alanära, A.; Burns, M.D.; Metcalfe, N.B. 2001. Intraspecific resource partitioning in brown trout: the temporal distribution of foraging is determined by social rank. J. Anim. Ecol. 70: 980-986.

Aldegunde, M. 1998. El sistema serotoninérgico cerebral en vertebrados e invertebrados. Rev. R. Acad. Galega Cienc. 17: 121-172.

Ali, M.A. Rhythms in Fishes. 1992. En M.A. Ali, ed. New York. Plenum Press.

Allison, L. 1951. Delays of spawning of Eastern brook trout by means of artificially prolonged light intervals. *Prog. Fish-Cult.* 13: 111-116.

Almaida-Pagán, P.F.; Rubio, V.C.; Mendiola, P.; De Costa, J.; Madrid, J.A. 2006. Macronutrient selection through post-ingestive signals in sharpsnout seabream fed gelatina capsules and challenged with protein dilution. *Physiol. Behav.* 88: 550-558.

Appelbaum, L.; Vallone, D.; Anzulovich, A.; Ziv, L.; Tom, M.; Foulkes, N. S.; Gothilf, Y. 2006. Zebrafish arylalkylamine-*N*-acetyltransferase genes – targets for regulation of the circadian clock. *J. Mol. Endocrinol.* 36: 337-347.

Aranda, A.; Madrid, J.A.; Zamora, S.; Sánchez-Vázquez, F.J. 1999. Synchronizing effect of photoperiod on the dual phasing of demand-feeding rhythms in sea bass. *Biol. Rhythm Res.* 30: 392-406.

Aranda, A.; Sánchez-Vázquez, F.J.; Madrid, J.A. 1999a. Influence of water temperature on demand-feeding rhythms in sea bass. *J. Fish Biol.* 55: 1029-1039.

Aranda, A. ; Sánchez-Vázquez, F.J. ; Zamora, S. ; Madrid, J.A. 2000. Self-design of fish diets by means of self-feeders: validation of procedures. *J. Physiol. Biochem.*, 56: 155-166.

Aranda, A.; Madrid, J.A.; Sánchez-Vázquez, F.J. 2001a. Influence of light on feeding anticipatory activity in goldfish. *J. Biol. Rhythms.* 16: 56-65.

Aranda, A.; Sánchez-Vázquez, F.J.; Madrid, J.A. 2001b. Effect of short-term fasting on macronutrient self-selection in sea bass. *Physiol. Behav.* 73: 105-109.

Aschoff, J.; Weber, R. 1976. Human circadian rhythms: a multioscillatory system. *Federation Proceedings.* 35: 2326-2332.

Aschoff, J. 1981. Biological rhythms. En: J. Aschoff, ed. *Handbook of behavioral neurobiology*, Vol 4. New York. Plenum Press.

- Aschoff, J.; Daan, S.; Honma, K.I. *Zeitgebers*, entrainment and masking: some unsettled questions. 1982. En: J. Aschoff; S. Daan; G.A. Gross, eds. *Vertebrate Circadian Systems*. New Cork. Springer-Verlag: 13-24.
- Aschoff, J. 1989. Masking of circadian activity rhythms in canaries by light and dark. *J. Biol. Rhythms*. 4: 29-38.
- Bailey, J.; Alanära, A.; Brännäs, E. 2000. Methods for assessing social status in Arctic charr. *J. Fish Biol.* 57: 258-261.
- Barajas-López, C.; Peres, A.L.; Espinosa-Luna, R.; Reyes-Vázquez, C.; Prieto-Gómez, B. 1996. Melatonin modulates cholinergic transmission by blocking nicotinic channels in the guinea-pig submucosus plexus. *Eur. J. Pharmacol.* 312: 319-325.
- Baras, E. 2000. Day-night alternation prevails over food availability in synchronising the activity of *Piaractus brachypomus* (Characiadae). *Aquat. Living Resour.* 13: 115-120.
- Barton, B.A.; Iwama G.K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis.* 1: 3-26.
- Bayarri, M.J.; Rol de Lama, M.A.; Madrid, J.A., Sánchez-Vázquez, F.J. 2003. Both pineal and lateral eyes are needed to sustain daily circulating melatonin rhythms in sea bass. *Brain Res.* 69: 175-182.
- Beentjes, M.P.; William, B.G. 1986. Endogenous circatidal rhythmicity in the New Zealand cockle *Chitone stuchburyi* (Bivalvia, Veneridae). *Mar. Behav. Physiol.* 12: 171-180.
- Begout Anras, M.L. 1995. Demand-feeding behaviour of sea bass kept in ponds: diel and seasonal patterns, and influences of environmental factors. *Aquacult. Int.* 3: 186-195.
- Benyassi, A.; Schwartz, C.; Ducouret, B.; Falcon, J. 2001. Glucocorticoid receptors and serotonin N-acetyltransferase activity in the fish pineal organ. *Neuroreport.* 12: 889-892.

- Bernier, N.J.; Bedard, N.; Peter, R.E. 2004. Effects of cortisol on food intake, growth, and forebrain neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor gene expression in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135: 230-240.
- Bolliet, V.; Bégay, V.; Ravault, J-P.; Ali, M.A.; Collin, J-P.; Falcón, J. 1994. Multiple circadian oscillators in the photosensitive pike pineal gland: A study using organ and cell culture. *J. Pineal Res.* 16: 77-84.
- Bolliet, V.; Azzaydi, M.; Boujard, T. 2001a. Effects of feeding time on feed intake and growth. En: D. Houlihan; M. Jobling; T. Boujard, eds. *Food intake in fish*. Oxford. Blackwell Science Ltd.: 233-249.
- Bolliet, V.; Aranda, A.; Boujard, T. 2001b. Demand-feeding rhythms in rainbow trout and European catfish. Synchronisation by photoperiod and food availability. *Physiol. Behav.* 73: 625-633.
- Borjigin, J.; Li, X.; Snyder, S.H. 1999. The pineal gland and melatonin: molecular and pharmacologic regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 53-68.
- Boujard, T.; Leatherland, J.F. 1992. Circadian rhythms and feeding time in fish. *Environ. Biol. Fish.* 35: 109-131.
- Boujard, T.; Leatherland, J.F. 1992a. Demand-feeding behaviour and diel pattern of feeding activity in *Oncorhynchus mykiss* held under different photoperiod regimes. *J. Fish Biol.* 40: 535-544.
- Boujard, T. 1995. Diel rhythms of feeding activity in the European catfish, *Silurus glanis*. *Physiol. Behav.* 58: 641-645.
- Boulos, Z.; Terman, M. 1980. Food availability and daily biological rhythms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 4: 119-131.
- Brainard, G.C.; Richardson, B.A.; King, T.S.; Reiter, R.J. 1984. The influence of different light spectra on the suppression of pineal melatonin content in the Syrian hamster. *Brain Res.* 294: 333-339.

Brännäs, E.; Alanärä, A. 1993. Monitoring the feeding activity of individual fish with a demand feeding system. *J. Fish Biol.* 42: 209-215.

Brännäs, E.; Lundkvist, H.; Prentice, E.; Schmitz, M.; Brännäs, K.; Wiklund, B.S. 1994. Use of the passive integrated transponder (PIT) in a fish identification and monitoring system for fish behavioural studies. *Trans. Am. Fish. Soc.* 123: 395-401.

Brännäs, E.; Alanärä, A. 1997. Is diel dualism in feeding activity influenced by competition between individuals? *Can. J. Zool.* 75: 661-669.

Brännäs, E. 1998. Individual variation in distribution, activity and growth rate of Arctic charr kept in a three-tank system. *J. Fish Biol.* 53: 795-807.

Brännäs, E.; Berglund, U.; Eriksson, L.O. 2005. Time learning and anticipatory activity in groups of Arctic charr. *Ethology*, 111: 681-692.

Bromage, N.; Porter, M.; Randall, C. 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture*. 197: 63-98.

Brooks, D.S.; Cassone, V.M. 1992. Daily and circadian regulation of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding in the chick brain. *Endocrinology*. 131: 1297-1304.

Bubenik, G.A.; Pang, S.F.; Hacker, R.R.; Smith, P.S. 1996. Melatonin concentrations in serum and tissues of porcine gastrointestinal tract and their relationship to the intake and passage of food. *J. Pineal Res.* 21: 251-256.

Bubenik, G.A.; Pang, S.F. 1997. Melatonin levels in the gastrointestinal tissues of fish, amphibians, and a reptile. *Gen. Comp. Endocr.* 106: 415-419.

Bubenik, G.A. 2002. Gastrointestinal Melatonin: Localization, function, and clinical relevance. *Digest. Dis. Sci.* 47: 2336-2348.

Cerdá-Reverter, J.M.; Zanuy, S.; Carrillo, M.; Madrid, J.A. 1998. Time-course studies on plasma glucose, insulin and cortisol in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) held under different photoperiodic regimes. *Physiol. Behav.* 64: 245-250.

Chen, W.M.; Tabata, M. 2002. Individual rainbow trout can learn and anticipate multiple daily feeding times. *J.Fish Biol.* 61: 1410–1422.

Chen, W.; Naruse, M.; Tabata, M. 2002. The effect of social interactions on circadian self-feeding rhythms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *Physiol. Behav.* 76: 281-287.

Cheng, M.Y.; Bullock, C.M.; Li, C.; Lee, A.G.; Bermak, J.C.; Belluzi, J.; Weaver, D.R.; Leslie, F.M.; Zhou, Q. 2002. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature.* 417: 405-410.

Coon, S.L.; Bégay, V.; Falcón, F.; Kelin, D.C. 1998. Expresión o melatonin síntesis genes is controlled by a circadian clock in the pike pineal organ but not in the trout. *Biol. Cell.* 90: 399-405.

Covès, D.; Beauchaud, M.; Attia, J.; Dutto, G.; Bouchut, C.; Bégout, M.L. 2006. Long-term monitoring of individual fish triggering activity on a self-feeding system: An example using European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 253: 385–392.

da Silva, J.G.; Oliva-Teles, A. 1998. Apparent digestibility coefficients of feedstuffs in seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquat. Living Resour.* 11: 187-191.

Damiola, F.; Le Minh, N.; Preitner, N.; Kornmann, B.; Fleury-Olela, F.; Schibler, U. 2000. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14: 2950-2961.

de la Iglesia, H. Relojes moleculares. 2006. En: J.A. Madrid; M.A. Rol de Lama, eds. *Cronobiología básica y clínica*. Madrid. Editec Red: 860 pp.

Edmons, S.C.; Adler, N.T. 1977. Food and light as entrainers of circadian running activity in the rat. *Physiol. Behav.* 18: 915-919.

Ejike, C.; Schreck, C.B. 1980. Stress and social hierarchy rank in coho salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 109: 423-426.

Ekmekcioglu, C. 2006. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomed. Pharmacother.* 60: 97-108.

Ekström, P.; Meissl, H. 1997. The pineal organ of teleost fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 7: 199-284.

Emery, A.R. 1973. Preliminary comparisons of day and night habits of freshwater fish in Ontario lakes. *J. Fish. Res. Board Can.* 30: 761-774.

Eriksson, L.O. Nocturnalism versus diurnalism, dualism within fish individuals. 1978. En J.E. Thorpe, ed. *Rhythmic activity of fishes*. London. Academia Press: 69-90.

Eriksson, L.O.; Van Veen, T. 1980. Circadian rhythms in the brown bullhead, *Ictalurus nebulosus* (Teleostei). Evidence for an endogenous rhythm in feeding, locomotor, and reaction time behaviour. *Can. J. Zool.* 58: 1899-2097.

Escudero-Garcia, J.C.; Garcia-Ceballos, E.; Martin-Gallardo, J.; Perez-Regadera, J.J. 1997. Model for the study of the selection of environmental parameters in freshwater fish. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 44: 359-375.

Esquifino, A.I.; Pandi-Perumal, S.R.; Cardinali, D.P. 2004. Circadian organization of the immune response: A role for melatonin. *Clin. Immunol.* 4: 423-433.

Esteban, S.; Nicolaus, C.; Garmundi, A.; Rial, R.V.; Rodríguez, A.B.; Ortega, E.; Barriga Ibars, C. 2004. Effect of orally administered L-tryptophan on serotonin, melatonin, and the innate immune response in the rat. *Mol. Cell Biochem.* 267: 39-46.

Esteban, M.A.; Cuesta, A.; Rodríguez, A.; Meseguer, J. 2006. Effect of photoperiod on the fish innate immune system: a link between fish pineal gland and the immune system. *J. Pineal Res.* 41: 261-266.

Falcón, J.; Barraud, S.; Thibault, C., Bégay, V. 1998. Inhibitors of messenger RNA and protein synthesis affect differently serotonin arylalkylamine N-acetyltransferase activity in clock-controlled and non clock-controlled fish pineal. *Brain Res.* 797: 109-117.

Falcón, J. 1999. Cellular circadian clocks in the pineal. *Prog. Neurobiol.* 58: 121-162.

Fraser, N.H.C.; Metcalfe, N.B.; Thorpe, J.E. 1993. Temperature-dependent switch between diurnal and nocturnal foraging in salmon. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 252: 135-139.

Fraser, N.H.C.; Heggenes, J.; Metcalfe, N.B.; Thorpe, J.E. 1995. Low summer temperatures cause juvenile Atlantic salmon to become nocturnal. *Can. J. Zool.* 73: 446-451.

García-Allegue, R.; Madrid, J.A.; Sánchez-Vázquez, F.J. 2001. Melatonin rhythms in European sea bass plasma and eye: influence of seasonal photoperiod and water temperature. *J. Pineal Res.* 31: 68-75.

Gerkema, M.P.; Videler, J.J.; de Wiljes, J.; van Laveren, H.; Gerritsen, H.; Karel, M. 2000. Photic entrainment of circadian activity patterns in the tropical labrid fish *Halichoeres chrysus*. *Chronobiol. Int.* 17: 613-622.

Gern, W.A.; Ralph, C.L. 1979. Melatonin synthesis by the retina. *Science.* 204: 183-184.

Gern, W.A.; Greenhouse, S.S. 1988. Examination of *in vitro* melatonin secretion from superfused trout (*Salmo gairdneri*) pineal organs maintained under diel illumination or continuous darkness. *Gen. Comp. Endocr.* 71: 163-174.

Gilmour, K.M.; DiBattista, J.D.; Thomas, J.B. 2005. Physiological causes and consequences of social status in salmonid fish. *Integr. Comp. Biol.* 45: 263-273.

Godin, J.G.J. 1981. Circadian rhythm of swimming activity in juvenile pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Mar. Biol.* 64: 341-349.

- Gregory, T.R.; Wood, C.M. 1999. The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming performance of juvenile rainbow trout. *Physiol. Biochem. Zool.* 72: 286–295.
- Hardeland, R.; Poeggeler, B. 2003. Non vertebrate melatonin. *J. Pineal Res.* 34: 233-241.
- Hardeland, R.; Pandi-Perumal, S.R.; Cardinali, D.P. 2006. Melatonin. *J. Biocel.* 38: 313-316.
- Harwood, A.J.; Griffiths, S.W.; Metcalfe, N.B.; Armstrong, J.D. 2003. The relative influence of prior residency and dominance on the early feeding behavior of juvenile Atlantic salmon. *Anim. Behav.* 65: 1141-1149.
- Heasman, M.S.; Black, K.D. 1998. The potential of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), for mariculture. *Aquac. Res.* 29: 67-76.
- Helfman, G.S. 1986. Diel distribution and activity of American eels (*Aquilla rostrata*) in a cave-spring. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* 43: 1595-1605.
- Helfman, G. Fish behaviour by day, night and twilight. 1993. En: *The behaviour of teleost fishes*. T.J. Pitcher, ed. London. Croom-Helm: 366-387.
- Hernández-Rauda, R.; Miguez, J.M.; Ruibal, C.; Aldegunde, M. 2000. Effects of melatonin on dopamine metabolism in the hypothalamus and the pituitary of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Zool.* 287: 440-444.
- Höglund, E.; Balm, P.H.M.; Winberg, S. 2000. Skin darkening, a potential social signal in subordinate Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): The regulatory role of brain monoamines and pro-opiomelanocortin-derived peptides. *J. Exp. Biol.* 203: 1711-1721.
- Höglund, E.; Kolm, N.; Winberg, S. 2001. Stress-induced changes in brain serotonergic activity, plasma cortisol and aggressive behaviour in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) is counteracted by L-DOPA. *Physiol. Behav.* 74: 381-389.

Höglund, E.; Balm, P.H.M.; Winberg, S. 2002. Stimulatory and inhibitor effects of 5-HT_{1A} receptors on adrenocorticotrophic hormone and cortisol secretion in a teleost fish, the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Neurosci. Lett.* 324: 193-196.

Honma, S.; Kanematsu, N.; Katsuno, Y.; Honma, K. 1992. Light suppression of nocturnal and plasma melatonin in rats depends on wavelength and time of day. *Neurosci. Lett.* 147: 201-204.

Hseu, J. R.; Lu, F. I.; Su, H. M.; Wang, L. S.; Tsai, C. L.; Hwang, P. P. 2003. Effect of exogenous tryptophan on cannibalism, survival and growth in juvenile grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture.* 218: 251-263.

Hueter, G.; Poeggeler, B.; Reimer, A; George, A. 1992. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: Evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci.* 51: 945-953.

Hyde, L. L.; Underwood, H. 2000. Effects of melatonin administration on the circadian activity rhythm of the lizard *Anolis carolinensis*. *Physiol. Behav.* 71: 183-192.

Iigo, M.; Kezuka, H.; Aida, K.; Hanyu, I. 1991. Circadian rhythms of melatonin secretion from superfused goldfish (*Carassius auratus*) pineal glands *in vitro*. *Gen. Comp. Endocr.* 8: 152-158.

Iigo, M.; Tabata, M. 1996. Circadian rhythms of locomotor activity in the goldfish *Carassius auratus*. *Physiol. Behav.* 60: 775-781.

Iigo, M.; Furukawa, K.; Tabata, M.; Aida, K. 2003. Circadian variations of melatonin binding sites in the goldfish brain. *Neurosci. Lett.* 347: 49-52.

Iuvone, P.M.; Tosini, G.; Pozdeyev, N.; Haque, R.; Klein, D.C.; Chaurasia, S.S. 2005. Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 24: 433-456.

Jilge, B.; Stähle, H. 1993. Restricted food access and light-dark: Impact of conflicting zeitgebers on circadian rhythms of the rabbit. *Am. J. Physiol.* 264: 708-715.

Johnson, L.; Burns, B.L. En: L. Johnson, B.L. Burns, eds. 1984. Biology of the Arctic Charr. Winnipeg. University of Manitoba Press: 447–461.

Johnston, G. 2002. En: Arctic charr aquaculture. Oxford. Blackwell publishing: 272 pp.

Johnston, P.; Bergeron, N.E.; Dodson, J.J. 2004. Diel activity patterns of juvenile Atlantic salmon in rivers with summer temperatures near the temperature-dependent suppression of diurnal activity. J. Fish Biol. 65: 1305- 1318.

Jørgensen; E.H.; Jobling, M. 1989. Patterns of food intake in Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, monitored by radiography. Aquaculture. 81: 155-160.

Jørgensen, E.H.; Jobling, M. 1990. Feeding modes in Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, L.: The importance of bottom feeding for the maintenance of growth. Aquaculture. 86: 379-386.

Jørgensen, E.H.; Jobling, M. 1992. Feeding behaviour and effect of feeding regime on growth of Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquaculture. 101: 135-146.

Juell, J.E.; Ferno, A.; Furevik, D.M.; Huse, I. 1994. Influence of hunger level and food availability on the spatial distribution of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in sea cages. Aquacult. Fish Manage. 25: 439-451.

Kadri, S.; Metcalfe, N.; Huntingford, A. Thorpe, J.E. 1991. Daily feeding rhythms in Atlantic salmon in sea cages. Aquaculture. 92: 219-224.

Kadri, S.; Metcalfe, N.B.; Huntingford, F.A.; Thorpe, J. E. 1997. Daily feeding rhythms in Atlantic salmon. II: size-related variation in feeding patterns of post-smolts under constant environmental conditions. J. Fish Biol. 50: 273-279.

Kavaliers, M. 1979. Pineal involvement in the control of circadian period of the lake chub, *Couesius plumbeus*. J. Exp. Zool. 209: 33-40.

Kavaliers, M. 1980a. Circadian activity of the white sucker, *Catostomus comersoni*: comparison of individuals and shoaling fish. Can. J. Zool. 58: 1399-1403.

Kavaliers, M. 1980b. Social groupings and circadian activity of the killifish, *Fundulus heteroclitus*. Biol. Bull. 158: 69-76.

Kentouri, M.; Divanach, P.; Geurden, I.; Anthourard, M. 1995. Evidence of adaptative behavior in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in relation to diet composition, in a self-feeding condition. Ichthyophysiol. Acta. 18: 125-143.

Kezuka, H.; Aida, K.; Hanyu, I. 1989. Melatonin secretion from goldfish pineal gland in organ culture. Gen. Comp. Endocr. 75: 217-221.

Klein, D.C.; Moore, R.Y. 1979. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. Brain Res. 174: 245-262.

Klein, D.C.; Sugden, D.; Weller, J.L. 1983. Postsynaptic α -adrenergic receptors potentiate the β -adrenergic stimulation of serotonin N-acetyltransferase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80, 599-603.

Konakchieva, R.; Mitev, Y.; Almeida, O.; Patchev, V.K. 1998. Chronic melatonin treatment counteracts glucocorticoid-induced dysregulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in the rat. Neuroendocrinology. 67: 171-180.

Koopmans, S.J.; Ruis, M.; Dekker, R.; Diepen, H.; Korte, M.; Mroz, Z. 2005. Surplus dietary tryptophan reduces plasma cortisol and noradrenaline concentrations and enhances recovery after social stress in pigs. Physiol. Behav. 85: 469-478.

Korf, H.W. Evolution of melatonin-producing pinealocytes. 2000. En: J. Olcese, ed. Melatonin after four decades. New York. Kluwer Academic /Plenum Publishers.

Kramer, A.; Yang, F.C.; Snodgrass, P.; Li, X.; Scammell, T.E.; Davis, F.C.; Weitz, C.J. 2001. Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signalling. Science, 294: 2511-2515.

Kriegsfeld, L.J.; Silver, R. 2006. The regulation of neuroendocrine function: Timing is everything. Horm. Behav. 49: 557-574.

- Kvetnoy, I.M. 1999. Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. *Histochem. J.* 31: 1-12.
- Laguë, M.; Reeb, S.G. 2000. Phase-shifting the light-dark cycle influences food-anticipatory activity in golden shiners. *Physiol. Behav.* 70: 55-59.
- Landless, P.J. 1976. Demand-feeding behaviour of rainbow trout. *Aquaculture.* 7: 11-25.
- Larsen, P.J.; Enquist, L.W.; Card, J.P. 1998. Characterization of the multisynaptic neuronal control of the rat pineal gland using viral transneuronal tracting. *Eur. J. Neurosci.* 10: 128-145.
- Larson, E.T.; Winberg, S.; Mayer, I.; Lepage, O.; Summers, C.H.; Øverli, Ø. 2004. Social stress affects circulating melatonin levels in rainbow trout. *Gen. Comp. Endocr.* 136: 322-327.
- Lepage, O.; Tottmar, O.; Winberg, S. 2002. Elevated dietary intake of L-tryptophan counteracts the stress-induced elevation of plasma cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 205: 3679-3687.
- Lepage, O.; Molina-Vilchez, I.; Pottinger, T.; Winberg, S. 2003. Time-course of the effect of dietary L-tryptophan on plasma cortisol levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 206: 3589-3599.
- Lepage, O.; Larson, E.T.; Mayer, I.; Winberg, S. 2005a. Tryptophan affects both gastrointestinal melatonin production and interrenal activity in stressed and nonstressed rainbow trout. *J. Pineal Res.* 38: 264-271.
- Lepage, O.; Larson, E.T.; Mayer, I.; Winberg, S. 2005b. Serotonin, but not melatonin, plays a role in shaping dominant-subordinate relationships and aggression in rainbow trout. *Horm. Behav.* 48: 233-242.
- LeSauter, J.; Silver, R. 1998. Output signals of the SCN. *Chronobiol. Int.* 15: 535-550.

Lincoln, G.; Messenger, S.; Andersson, H.; Hazlerigg, D. 2002. Temporal expression of seven clock genes in the suprachiasmatic nucleus and the pars tuberalis of the sheep: Evidence for an internal coincidence timer. *Neurosci.* 99: 13890-13895.

Linner, J.; Brännäs, E. 1994. Behavioral response to commercial food of different sizes and self-initiated food size selection by Arctic charr. *Trans. Am. Fish. Soc.* 123: 416-422.

Lynch, H.J.; Deng, M.H. 1986. Pineal responses to stress. *J. Neural Transm. Suppl.* 21: 461-473.

Macchi, M.M.; Bruce, J.N. 2004. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrin.* 25: 177-195.

Madrid, J.A.; Boujard, T.; Sánchez-Vázquez, F.J. 2001. Feeding rhythms. En: D. Houlihan; M. Jobling; T. Boujard, eds. *Food intake in fish.* Oxford. Blackwell Science Ltd.: 189-215.

Madrid, J.A.; Barriga, C.; Rodríguez, A.B.; Rial, R.V. 2007. The epiphysial complex, melatonin and the time-keeping system in non-mammalian vertebrates. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* En prensa.

Markus, C.R.; Olivier, B.; Pannhuysen, G.; Tuiten, A.; Van der Gugten, J.; Alles, M.S.; Tuiten, A.; Westenberg, G.M.; Fekkes, D.; Koppeschaar, H.; de Haan, E.H.F. 2000a. The bovine protein α -lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentrations, and improves mood under stress. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 1536-1544.

Markus, C.R.; Pannhuysen, G.; Tuiten, A.; Koppeschaar, H. 2000b. Effects of food on cortisol and mood in vulnerable subjects under controllable and uncontrollable stress. *Physiol. Behav.* 70: 333-342.

Max, M.; Menaker, M. 1992. Regulation of melatonin production by light, darkness, and temperature in the trout pineal. *J.Comp. Physiol. A* 170: 479-489.

Meissl, H.; Dodt, E. 1981. Comparative physiology of pineal photoreceptor organs. *Develop. Endocr.* 14: 61-80.

- Meissl H.; Nakamura, T.; Thiele, G. 1986. Neural response mechanisms in the photoreceptive pineal organ of goldfish. *Comp. Biochem. Physiol. A* 84: 467-473.
- Messner, M.; Huether, G.; Lorf, T.; Ramadori, G.; Schwörer, H. 2001. Presence of melatonin in the human hepatobiliary-gastrointestinal tract. *Life Sci.* 69: 543-551.
- Metcalfe, N.B.; Fraser, N.H.C.; Burns, M.D. 1998. State-dependent shifts between nocturnal and diurnal activity in salmon. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265: 1503-1507.
- Mistlberger, R. E. 1994. Circadian food-anticipatory activity: Formal models and physiological mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18: 171-195.
- Mistlberger, R.E.; Antle, M.C. 2006. The enigma of behavioural inputs to the circadian clock: A test of function using restraint. *Physiol. Behav.* 87: 948-954.
- Molina-García, A.; Claver-Farias, I.; García-Martínez, I. Situación actual de la acuicultura en España. 1999. En: Libro blanco de la Acuicultura en España. Madrid. Centro de Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación: 39-70.
- Mommsen, T.P.; Vijayan, M.M.; Moon T.W. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 9: 211-268.
- Moore, R.Y.; Lenn, N.J. 1972. A retinohypothalamic projection in the rat. *J. Comp. Neurol.* 146: 1-14.
- Moore-Ede, M.C.; Sulzman, F.M.; Fuller, C.A. 1982. *The clocks that time us.* Cambridge. Harvard University Press: 464 pp.
- Motilva, V.; Cabeza, J.; La Lastra, C. 2001. New issues about melatonin and its effects on the digestive system. *Curr. Pharm. Design.* 7: 909-931.
- Müller, K. 1967. Schreiber. Eine Methode zur Messung der lokomotorischen Aktivität von Süßwasserfischen. *Oikos.* 18: 135-136.

Murakami, N.; Kawano, T.; Nakahara, K.; Nasu, T.; Shiota, K. 2001. Effect of melatonin on circadian rhythm, locomotor activity and body temperature in the intact house sparrow, Japanese quail and owl. *Brain Res.* 889: 220-224.

Naruse, M.; Oishi, T. 1994. Effects of light and food as zeitgebers on locomotor activity rhythms in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Zool. Sci.* 11: 113-119.

Noakes, D.L.G.; Leatherland, J.F. 1977. Social dominance and interrenal activity in rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Pisces, Salmonidae). *Environ. Biol. Fish.* 2: 131-136.

Noakes, D.L.G. Social behaviour in young charrs. 1980. En: E.K. Bacon, ed. *Charrs: salmonid fishes of the genus Salvelinus*. The Hague: Dr. W. Junk Publishers: 683-701

O'Connor, K.I.; Metcalfe, N.B.; Taylor, A.C. 1999. Does darkening signal submission in territorial contests between juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*? *Anim. Behav.* 58: 1269-1276.

Oishi, T. Fishes. 1991. En Y. Chiba; K. Takahashi, eds. *Handbook of Chronobiology*. Tokyo. Asakura Shoten: 69-78.

Okimoto, D.K.; Stetson, M.H. 1999. Presence of an intrapineal circadian oscillator in the teleostean family Poeciliidae. *Gen. Comp. Endocr.* 114: 304-312.

Ooka-Souda, S.; Kabasawa, H.; Kinoshita, S. 1985. Circadian rhythms in locomotor activity in the hagfish, *Eptatretus burgeri*, and the effect of reversal of light-dark cycle. *Zool. Sci.* 2: 749-754.

Oster, H.; Damerow, S.; Kiessling, S.; Jakubcaková, V.; Abraham, D.; Tian, J.; Hoffmann, M.W.; Eichele, G. 2006. The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. *Cell Metab.* 4: 163-173.

Øverli, Ø.; Harris, C.A.; Winberg, S. 1999a. Short-term effects of fights for social dominance and the establishment of dominant-subordinate relationships on brain monoamines and cortisol in rainbow trout. *Brain Behav. Evolut.* 54: 263-275.

- Øverli, Ø.; Olsen, R. E.; Løvik, F.; Ringø, E. 1999b. Dominance hierarchies in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L.: differential cortisol profiles of dominant and subordinate individuals after handling stress. *Aquac. Res.* 30: 259–264.
- Øverli, Ø.; Korzan, W.J.; Larson, E.T.; Winberg, S.; Lepage, O.; Pottinger, T.G.; Renner, K.J.; Summers, C.H. 2004. Behavioral and neuroendocrine correlates of displaced aggression in trout. *Horm. Behav.* 45: 324-329.
- Palmer, J.D. 1995. The biological rhythms and clocks of intertidal animals. New York. Oxford University Press: 217 pp.
- Partridge, W.M.; Mietus, L.J. 1980. Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 34: 1761-1763.
- Perrow, M.R.; Jowitt, A.J.D.; Johnson, S.R. 1996. Factors affecting the habitat selection of tench in a shallow eutrophic lake. *J. Fish Biol.* 48: 859-870.
- Pertsov, S. S. 2006. The behavior of rats in response to changes in the light regime and administration of melatonin. *Neurosci. Behav. Physiol.* 36: 767-772.
- Pinillos, M.L.; De Pedro, N.; Alonso-Gómez, A.L.; Alonso-Bedate, M.; Delgado, M.J. 2001. Food intake inhibition by melatonin in goldfish (*Carassius auratus*). *Physiol. Behav.* 72: 629-634.
- Pitrosky, B.; Kirsch, R.; Malan, A.; Mocaer, E.; Pevet, P. 1999. Organization of rat circadian rhythms during daily infusion of melatonin or S20098, a melatonin agonist. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 227: 812-828.
- Poeggeler, B.; Cornélissen, G.; Huether, G.; Hardeland, R.; Józsa, R.; Zeman, M.; Stebelova, K.; Oláh, A.; Bubenik, G.; Pan, W.; Otsuka, K.; Schwartzkopff, O.; Bakken, E.E.; Halberg, F. 2005. Chronomics affirm extending scope of lead in phase of duodenal vs. pineal circadian melatonin rhythms. *Biomed. Pharmacother.* 59: 220-224.
- Pohl, H. 1999. Spectral composition of light as a *zeitgeber* for birds living in the high Arctic summer. *Physiol. Behav.* 67: 327-337.

Porter, M.; Randall, C.; Magwood, S.; Futter, W.; Bromage, N. 2000. Photoperiod, melatonin and the control of maturation in farmed fish. *Comp. Biochem. Phys. A.* 126: 117.

Raikhlin, N.T.; Kvetnoy, I.M.; Tolkachev, V.N. 1975. Melatonin may be synthesized in enterochromaffin cells. *Nature.* 255. 344.

Raikhlin, N.T.; Kvetnoy, I.M. 1976. Melatonin and enterochromaffin cells. *Acta histochem.* 55: 19.

Randolph, K.N.; Clemens, H.P. 1976. Some factors influencing the feeding behaviour of channel catfish in culture ponds. *Trans. Am. Fish. Soc.* 105: 718-724.

Rao, N.V.A.; Raza, B.; Prasad, J.K.; Razi, S.S.; Gottardo, L.; Ahmad, M.F.; Nussdorfer, G.G. 2001. Melatonin decreases glucocorticoid blood concentration in the rat and palm squirrel, acting directly on the adrenal gland. *Biomed. Res.* 22: 115-117.

Redman, J.; Armstrong, S.; Ng, K.T. 1983. Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science.* 219: 1089-1091.

Reebs, S.G.; Mrosovsky, N. 1989. Effects of induced wheel running on the circadian activity rhythms of Syrian hamsters: entrainment and phase response curve. *J. Biol. Rhythms.* 4: 39-38.

Reebs, S.G.; Laguë, M. 2000. Daily food-anticipatory activity in golden shiners: a test of endogenous timing mechanisms. *Physiol. Behav.* 70: 35-43.

Reebs, S.G. 2002. Plasticity of diel and circadian rhythms in fishes. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 12: 349-371.

Reiter, R.J. 1993. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia.* 49: 654-664.

Reiter, R.J.; Tan, D.X.; Qi, W.; Manchester, L.C.; Karbownik, M.; Calvo, J.R. 2000. Pharmacology and Physiology of Melatonin in the Reduction of Oxidative Stress in vivo. *Biol. Signal. Recept.* 9: 160-171.

- Rensing, L.; Ruof, P. 2002. Temperature effect on entrainment, phase shifting, and amplitude of circadian clocks and its molecular bases. *Chronobiol. Int.* 19: 807-864.
- Richter, C.P. 1967. Sleep and activity: their relation to the 24 hour clock. En: S.S. Kety; E.V. Evarts; H.L. Williams, eds. *Sleep and Altered States of Consciousness*. Baltimore. Williams and Wilkins: 8-29.
- Rietveld, W.J. 1992. The circadian network are feedback loops to the circadian oscillator of any functional importance to its control function. *J. Interd. Cycle Res.* 23: 140-142.
- Roche, H.; Bogé, G. 1996. Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. *Mar Environ. Res.* 41: 27-43.
- Rotllant, J.; Ruane, N.M.; Caballero, M.J.; Montero, D.; Tort, L. 2003. Response to confinement in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) is characterised by an increased biosynthetic capacity of interrenal tissue with no effect on ACTH sensitivity. *Comp. Biochem. Phys. A.* 136: 613-620.
- Rozin, P.; Mayer, J. 1961. Regulation of food intake in the goldfish. *Am. J. Physiol.* 201: 968-974.
- Rubio, V. C.; Sánchez-Vázquez, F. J.; Madrid, J. A. 2003. Macronutrient selection through postingestive signals in sea bass fed on gelatine capsules. *Physiol. Behav.* 78: 795-803.
- Rubio, V.C.; Vivas, M.; Sánchez-Mut, A.; Sánchez-Vázquez, F.J.; Covès, D.; Dutto, G.; Madrid, J.A. 2004. Self-feeding on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) under laboratory and farming conditions using a string sensor. *Aquaculture.* 233: 393-403.
- Rubio, V. C.; Sánchez-Vázquez, F. J.; Madrid, J. A. 2004a. Oral administration of melatonin reduces food intake and modifies macronutrient selection in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *J. Pineal Res.* 37: 42-47.
- Rubio, V.C.; Sánchez-Vázquez F.J.; Madrid J.A. 2005. Fish macronutrient selection through post-ingestive signals: effect of selective macronutrient deprivation. *Physiol. Behav.* 84: 651-657.

Rubio, V.C.; Sánchez-Vázquez F.J.; Madrid J.A. 2006. Oral serotonin administration affects the quantity and the quality of macronutrients selection in European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Physiol. Behav.* 87: 7-15.

Sakakura, Y.; Tsukamoto, K.1998. Effects of density, starvation and size difference on aggressive behaviour in juvenile yellowtails (*Seriola quinqueradiata*). *J. Appl. Ichthyol.* 14: 9-13.

Sánchez-Vázquez, F.J.; Zamora, S.; Madrid, J.A. 1995a. Light-dark and food restriction cycles in sea bass: effect of conflicting *zeitgebers* on demand-feeding rhythms. *Physiol. Behav.* 58: 705-714.

Sánchez-Vázquez, F.J.; Madrid, J.A.; Zamora, S. 1995b. Circadian rhythms of feeding activity in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: dual phasing capacity of diel demand-feeding pattern. *J. Biol. Rhythms.* 10: 256-266.

Sánchez-Vázquez, F.J.; Madrid, J.A.; Zamora, S.; Iigo, M.; Tabata, M. 1996. Demand feeding and locomotor circadian rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*: Dual and independent phasing. *Physiol. Behav.* 60: 665–674.

Sánchez-Vázquez, F.J.; Madrid, J.A.; Zamora, S.; Tabata, M. 1997. Feeding entrainment of locomotor activity rhythms in the goldfish is mediated by a feeding-entrainable circadian oscillator. *J. Comp. Physiol. A.* 181: 121-132.

Sánchez-Vázquez, F. J.; Tabata, M. 1998. Circadian rhythms of demand-feeding and locomotor activity in rainbow trout. *J. Fish Biol.* 52: 255–267.

Sánchez-Vázquez, F.J.; Yamamoto, T.; Akiyama, T.; Madrid, J.A.; Tabata, M. 1998a. Selection of macronutrients by goldfish operating self-feeders. *Physiol. Behav.* 65: 211-218.

Sánchez-Vázquez, F.J.; Azzaydi, M.; Martínez, F.J.; Zamora, S.; Madrid, J.A. 1998b. Annual rhythms of demand-feeding activity in sea bass: Evidence of a seasonal phase inversion of the diel feeding pattern. *Chronobiol. Int.* 15: 607–622.

Sánchez-Vázquez, F.J.; Yamamoto, T.; Akiyama, T.; Madrid, J.A.; Tabata, M. 1999. Macronutrient self-selection through demand-feeders in rainbow trout. *Physiol. Behav.* 66: 45-51.

- Sánchez-Vázquez, F.J.; Iigo, M.; Madrid, J.A.; Zamora, S., Tabata, M. 2000. Pinealectomy does not affect the entrainment to light nor the generation of the circadian demand-feeding rhythms of rainbow trout, *Physiol. Behav.* 69: 455-461.
- Sánchez-Vázquez, F.J.; Aranda, A.; Madrid, J.A. 2001. Differential effects of meal size and food energy density on feeding entrainment in goldfish. *J. Biol. Rhythms.* 16: 58-65.
- Sánchez-Vázquez, F.J.; Madrid, J.A. 2001. Feeding Anticipatory Activity. En: D. Houlihan; M. Jobling; T. Boujard, eds. *Food intake in fish.* Oxford. Blackwell Science Ltd.: 216-232.
- Saunders, R.L.; Specker, J.L.; Komourdjan, M.P. 1989. Effects of photoperiod on growth and smelting in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture.* 82: 103-117.
- Schibler, U.; Sassone-Corsi, P. 2002. A web of circadian pacemakers. *Cell.* 111: 919-922.
- Schibler, U.; Brown, S.A. 2005. Enlightening the adrenal gland. *Cell Metabolism.* 2:278-281.
- Siegmund, R. 1969. Lokomotorische Aktivität und Ruheverhalten bei einheimischen Süßwasserfischen (*Pisces, Percidae, Cyprinidae*). *Biol. Zbl.* 88: 295-312.
- Siegmund, R.; Wolff, D. L. 1973. Laboruntersuchungen und Freiwasserbeobachtungen zur Schwimmaktivität einheimischer Süßwasserfische. *Fischerei Forsch.* 11: 107-116.
- Sloman, K.A.; Armstrong, J.D. 2002. Physiological effects of dominance hierarchies: laboratory artefacts or natural phenomena? *J. Fish Biol.* 61: 1-23.
- Spieler, R.E.; Noeske, T.A. 1984. Effects of photoperiod and feeding schedule on diel variations of locomotor activity, cortisol, and thyroxine in goldfish. *Transactions of the American Fisheries Society.* 113: 528-539.
- Spieler, R.E. Feeding-entrained circadian rhythms in fishes. 1992. En M.A. Ali, ed. *Rhythms in Fishes.* New York. Plenum: 137-147.

Sprenger, J.; Hardeland, R.; Fuhrberg, B.; Han, S-Z. 1999. Melatonin and other 5-methoxylated indoles in yeast: Presence in high concentrations and dependence on tryptophan availability. *Cytologia*. 64: 209-213.

Stefanson, S.O.; Nortvedt, R.; Hansen, T.J.; Taranger, G.L. 1990. First-feeding of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., under different photoperiods and light intensities. *Aquaculture and Fisheries Management*. 21: 435-441.

Steffens, W. 1995. The tench, a neglected pond fish species. *Pol. Arch. Hidrobiol.* 42: 161-180.

Stephan, F.K.; Swann, J.M.; Sisk, C.L. 1979a. Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic nucleus lesions. *Behav. Neural. Biol.* 25: 545-554.

Stephan, F.K.; Swann, J.M.; Sisk, C.L. 1979b. Anticipation of 24h feeding schedules in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Behav. Neurol. Biol.* 25: 346-363.

Stephan, F.K. 1984. Phase shifts of circadian rhythms of activity entrained to food access. *Physiol. Behav.* 32: 663-671.

Stephan, F.K. 1986. Interaction between light- and feeding-entrainable circadian rhythms in the rat. *Physiol. Behav.* 38: 127-133.

Stephan, F.K. 1997. Calories affect zeitgeber properties of the feeding entrained circadian oscillator. *Physiol. Behav.* 62: 995-1002.

Stephan, F. K.; Davidson, A. J. 1998. Glucose, but not fat, phase shifts the feeding-entrained circadian clock . *Physiol. Behav.* 65: 277-288.

Sumpter, J.P. 1997. The endocrinology of stress. En G.K. Iwama; A.D. Pickering; J.P. Sumpter; C.B. Schreck, eds. *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge. Cambridge University Press: 95-118.

Sundararaj, B.; Vasal, S. 1976. Photoperiod and temperature control in the regulation and reproduction in the female catfish *Heteropneustes fossilis*. *J. Fish. Res. Board. Can.* 33: 959-973.

- Tabata, M. Minh-Nyo, M. Niwa, H. and Oguri, M. 1989. Circadian rhythm of locomotor activity in a teleost, *Silurus asotus*. *Zool. Sci.* 6: 367–375.
- Tabata, M.; Minh-Nyo, M.; Oguri, M. 1991. The role of the eyes and the pineal organ in the circadian rhythmicity in the catfish, *Silurus asotus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 57: 607-612.
- Tan, D.; Manchester, L.C.; Reiter, R.J.; Qi, W.; Hanes, M.A.; Farley, N.J. 1999. High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life Sci.* 665: 2523-2529.
- Taylor, M.H. 1984. Lunar Synchronization of Fish Reproduction. *Transactions of the American Fisheries Society*. 113: 484–493.
- Thorpe, J.E. 1978. *Rhythmic Activity of Fishes*. J.E. Thorpe, ed. London. Academic Press.
- Tintos, A.; Míguez, J.M.; Mancera, J.M.; Soengas, J.L. 2006. Development of a microtitre plate indirect ELISA for measuring cortisol in teleosts, and evaluation of stress responses in rainbow trout and gilthead sea bream. *J. Fish Biol.* 68: 251-263.
- Torrejón Atienza, M.; Chatzifotis, S.; Divanach, P. 2004. Macronutrient selection by sharp snout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Aquaculture*. 232: 481-491.
- Trajano, E.; Menna-Barreto, L. 1995. Locomotor activity pattern of Brazilian cave catfishes under constant darkness (Siluriformes, Pimelodidae). *Biol. Rhythm Res.* 26: 341-353.
- Usui, S.; Takahashi, Y.; Honda, Y.; Ebihara, S. 1989. Circadian behavioural rhythms during various light-intensity cycles in rats. *Physiol. Behav.* 46: 521-528.
- Vera, L.M.; López-Olmeda, J.F.; Bayarri, M.J.; Madrid, J.A.; Sánchez-Vázquez, F.J. 2005. Influence of light intensity on plasma melatonin and locomotor activity rhythms in tench. *Chronobiol. Int.* 22: 67-78.
- Vera, L.M.; Madrid, J.A.; Sánchez-Vázquez, F.J. 2006. Locomotor, feeding and melatonin daily rhythms in sharp snout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Physiol. Behav.* 88:167-72.

Vera, L.M.; De Pedro, N.; Gómez-Milán, E.; Delgado, M.J.; Sánchez-Muros, M.J.; Madrid, J.A.; Sánchez-Vázquez, F.J. 2007. Feeding entrainment of locomotor activity rhythms, digestive enzymes and neuroendocrine factors in goldfish. *Physiol Behav.* 90: 518-524.

Vivas, M.; Rubio, V. C.; Sánchez-Vázquez, F. J.; Mena, C.; García-García, B.; Madrid, J. A. 2006. Dietary self-selection in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) fed paired macronutrient feeds and challenged with protein dilution. *Aquaculture.* 251: 430-437.

Weitzmann, E.D. Fukushima, D.K.; Nogeire, C.; Roffwarg, H.; Gallagher, T.; Hellman, L. 1971. Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects. *J. Clin. Endocr. Metab.* 33: 14-22.

Wendelaar Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77: 591-625.

Whitmore, D.; Foulkes, N.S.; Strähle, U.; Sassone-Corsi, P. 1998. Zebrafish clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. *Nat. Neurosci.* 1: 701-707.

Winberg, S.; Nilsson, G.E.; Spruijt, B.M.; Höglund, V. 1993. Spontaneous locomotor activity in Arctic charr measured by a computerized imaging technique: role of brain serotonergic activity. *J. Exp. Biol.* 179: 213-232.

Winberg, S.; Nilsson, G.E. 1993a. Time course of changes in brain serotonergic activity and brain tryptophan levels in dominant and subordinate juvenile Arctic charr. *J. Exp. Biol.* 179: 181-195.

Winberg, S.; Nilsson, G.E. 1993b. Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behaviour and stress reactions, with particular reference to fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 106: 597-614.

Winberg, S.; Lepage, O. 1998. Elevation of brain 5-HT activity, POMC expression, and plasma cortisol in socially subordinate rainbow trout. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 274: 645-654.

Winberg, S.; Nilsson, A.; Hylland, P.; Soderstrom, V.; Nilsson, G.E. 1997. Serotonin as a regulator of hypothalamic-pituitary-interrenal activity in teleost fish. *Neurosci. Lett.* 230: 113-116.

Winberg, S.; Øverli, Ø.; Lepage, O. 2001. Suppression of aggression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary L-tryptophan. *J. Exp. Biol.* 204: 3867-3876.

Xu, D.; Li, J.C.; Ma, K.C.; Wang, M. 1995. Effects of melatonin on hypothalamic gamma-aminobutyric acid, aspartic acid, glutamic acid, beta-endorphin and serotonin levels in mice. *Biol. Signals.* 4: 225-231.

Yáñez, J.; Meissl, H. 1995. Secretion of methoxyindoles from trout pineal organs *in vitro*: indication for a paracrine melatonin feedback. *Neurochm. Int.* 27: 195-200.

Zhdanova, I.V.; Wang, S.Y.; Leclair, O.U.; Danilova, N.P. 2001. Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish. *Brain Res.* 903: 263-268.

Zhdanova, I.V.; Reeb, S.G. 2006. Circadian rhythms in fish. En: K.A. Sloman; R.W. Wilson; S. Balshine, eds. *Fish Physiology, Vol. 24: Behaviour and Physiology of Fishes*. New York. Elsevier: 197-238.

Ziv, L.; Tovin, A.; Strasser, D. Gothilf, Y. 2007. Spectral sensitivity of melatonin suppression in the zebrafish pineal gland. *Exp. Eye Res.* 84: 92-99.



VII. GLOSARIO

VII. GLOSARIO

AA-NAT.- enzima arilalkilamina N-acetiltransferasa (AA-NAT). Convierte la serotonina en N-acetilserotonina y está comúnmente aceptada como la hormona limitante de la síntesis de melatonina.

Acrofase.- (del gr. *ἄκρος* , en lo más alto + *φάσις* , manifestación), punto de máximo valor en la amplitud de una onda media, opuesto a la batifase o punto de mínimo valor.

Actograma.- representación gráfica que muestra la expresión de una variable a lo largo de 24 horas, durante varios días.

Alfa (α)- Fase de actividad de un individuo. Se opone a la fase *rho* o de reposo.

Amplitud.- es la diferencia entre los valores máximo y mínimo de la onda media.

ANOVA.- análisis de la varianza.

Batifase.- (del gr. *βαθύς*, profundo + *φάσις*, manifestación), punto de mínimo valor en la amplitud de una onda media, opuesto a la acrofase o punto de máximo valor.

°C.- grados centígrados.

C.- abreviatura utilizada para los carbohidratos.

Ciclo.- (del gr. *κύκλος*, círculo), es la menor distancia a partir de la cual una onda periódica se repite.

Circadiano.- (del lat. *circa*, alrededor de, cerca + *dies*, día), alrededor de un día. Cuando se refiere al ritmo, implica el control endógeno de una periodicidad aproximada de 24 horas.

COR.- cortisol, hormona esteroide conocida como la “hormona del estrés”, debido a que las condiciones de estrés incrementan sus concentraciones plasmáticas para movilizar energía (ya que libera glucosa), y favorecer que el organismo pueda satisfacer su mayor demanda metabólica.

Cronobiología.- (del gr. *χρόνος*, tiempo + *βίος*, vida + *λογία*, ciencia), ciencia que estudia los ritmos biológicos.

Curso libre o free-running.- condiciones en las que, en ausencia de sincronizadores externos, el marcapasos circadiano oscila con periodo endógeno o *tau* próximo a 24h, haciendo que el animal muestre unos ritmos de actividad de duración igual al periodo endógeno.

DD.- (del ingl. Dark/Dark) condiciones de oscuridad constante.

Día subjetivo.- fase del ritmo endógeno en la que el organismo, cuando se encuentra en curso libre o condiciones ambientales constantes, se comporta como si fuese de día.

Diurno.- dícese del individuo o especie que es activo durante la fase de luz del fotoperiodo.

Dual.- individuo o especie genéticamente habilitado para desarrollar su actividad diaria indistintamente durante la fase de oscuridad, o bien, de luz del fotoperiodo, y puede llevar a cabo inversiones de fase a lo largo de su ciclo de vida, de nocturno a diurno y viceversa.

ELISA.- enzima inmunoensayo. Técnica utilizada para cuantificar la concentración de una sustancia en un medio. Se basa en la unión de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida, con su anticuerpo. La reacción genera, directa o indirectamente, un producto que puede ser medido espectrofotométricamente.

Encarrilamiento.- acoplamiento del ritmo endógeno a un ritmo ambiental.

Endógeno.- (del gr. ἔνδον, dentro + γεννάν, generar, producir), intrínseco al organismo, que se origina por causas internas. Cuando se habla de ritmo endógeno, se refiere al ritmo que desarrolla un sujeto en ausencia de información ambiental externa, debido a mecanismos internos.

Enmascaramiento.- modificación de la expresión del ritmo de un organismo, debido a un factor ambiental que no actúa sobre el marcapasos circadiano.

Escotofase.- (del gr. σκότος, tiniebla + φάσις, manifestación), noche o fase de oscuridad del fotoperiodo.

Exógeno.- (del gr. ἔξω, dentro + γεννάν, generar, producir), que se debe a causas externas.

F.- (del ingl. fat) abreviatura utilizada para los lípidos o la grasa.

FAA.- (del ingl. feeding + anticipatory + activity), se refiere a la actividad anticipatoria previa al horario regular de alimentación, que un animal desarrolla debido a mecanismos endógenos.

Factor enmascarante.- estímulo rítmico ambiental que influye directamente sobre la expresión del ritmo circadiano del organismo, pero sin actuar sobre su marcapasos circadiano.

Facte.- estado diferente de otro, por el que se pasa para el desarrollo o consecución de un ciclo.

FEP.- (del ingl. feeding + entrainable + pacemaker), se refiere al oscilador que es encarrilado por el alimento.

Fotofase.- (del gr. φως, luz + φάσις, manifestación), fase de luz del fotoperiodo, contraria a la escotofase.

Free-running.- (del ing.). Véase curso libre.

GIT.- (del ingl. gastrointestinal tract), tracto gastrointestinal.

HIOMT.- enzima hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT). Convierte la N-acetilserotonina en melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina).

HPI.- eje hipotálamo-pituitaria-interrenal. Es equivalente al eje HPA (hipotálamo-pituitaria-adrenal) de mamíferos. Se activa bajo condiciones de estrés, conduciendo a la producción y liberación del cortisol por las células interrenales.

LD.- (del ingl. Light/Dark), se refiere a las fases del fotoperiodo, de luz y oscuridad. Generalmente va seguido de la duración de cada uno de los ciclos separados por dos puntos, esto es, LD 14:10, que significaría que las 24 h del día quedan divididas en 14 horas de luz y 10 de oscuridad.

LEP.- (del ingl. light + entrainable + pacemaker), se refiere al oscilador que es encarrilado por la luz.

LL.- (del ingl. Light/Light), condiciones de luz constante.

Marcapasos circadiano.- estructura endógena generadora de ritmos diarios.

ME diet.- abreviatura utilizada para dieta comercial regranulada y suplementada con melatonina

Multioscilariorio.- hace referencia al sistema circadiano compuesto por varios osciladores o relojes circadianos, relacionados entre sí para dar lugar a la expresión del ritmo.

Noche subjetiva.- fase del ritmo endógeno en el cual, un animal que se encuentra en curso libre, se comporta como si fuese de noche.

Nocturno.- dicese del individuo o especie que es activo durante la fase de oscuridad del fotoperiodo.

Onda media.- análisis del ritmo de la fase de actividad y reposo media de todos los animales estudiados.

Oscilador circadiano.- estructura interna del organismo capaz de generar ritmos.

P.- abreviatura utilizada para la proteína.

Periodo.- el intervalo de tiempo necesario para completar un ciclo repetitivo.

Periodo endógeno.- también llamado *tau*, se representa por la letra griega τ e indica la duración del ciclo del marcapasos circadiano de un individuo o especie, se manifiesta cuando no está sujeto a sincronizadores externos.

Periodograma.- representación gráfica de los posibles periodos de un ritmo explicados por el porcentaje de variación entre sus datos, de la que se obtiene el periodo endógeno de un sujeto.

PIT tag.- (del ingl. passive + integrated + transponder), son las marcas electrónicas internas o marcas PIT, que consisten en un transmisor pasivo integrado que se inyecta en un sujeto y se detecta por una antena, con el fin de identificar y diferenciar a cada individuo de los demás.

RIA.- radioinmunoensayo. Técnica empleada para cuantificar la concentración de una sustancia en un medio. Para ello, se une un isótopo radiactivo al anticuerpo, siendo posible la cuantificación del complejo antígeno-anticuerpo a través de la radiactividad emitida.

Ritmo circadiano.- ritmo endógeno automantenido de aproximadamente 24h.

Ritmo diario.- patrón cíclico que tiene una periodicidad de 24h.

NSQ.- núcleo supraquiasmático (también SCN, en inglés), estructura localizada en el hipotálamo de mamíferos, en la que se localiza el marcapasos central. En peces, no se ha demostrado la existencia del NSQ.

S.E.M.- error estándar de la media.

Sincronización.- acoplamiento del ritmo del animal con un estímulo rítmico ambiental. Al contrario que el encarrilamiento, no implica la intervención del componente endógeno. Esto es, la sincronización también se puede producir por factores enmascarantes.

Sincronizador.- también llamado *zeitgeber*, factor ambiental capaz de actuar sobre el marcapasos circadiano de un organismo, encarrilando su ritmo biológico.

STD diet.- abreviatura utilizada para dieta estándar, indica que se trata de la dieta comercial, regranulada sin suplementar.

Tau (τ)- véase periodo endógeno.

Transductor.- parte del organismo que transforma los estímulos ambientales en una señal capaz de ser captada como información por el cerebro, como la retina que transforma el estímulo visual y transmite la información (en este ejemplo, la lumínica) hasta el reloj endógeno.

TRP diet.- abreviatura utilizada para dieta comercial regranulada y suplementada con triptófano.

Triptófano.- aminoácido esencial precursor de la serotonina y de la melatonina.

Zeitgeber.- término que proviene del alemán y significa “dador de tiempo”. Véase sincronizador.



VIII. ASPECTOS ÉTICOS Y GENERALES

VIII. ASPECTOS ÉTICOS Y GENERALES

Los únicos animales que han sido utilizados para los experimentos de esta tesis son tencas, truchas árticas y lubinas, cuidadas bajo condiciones normales de mantenimiento. No se han utilizado animales transgénicos ni se han aplicado modificaciones genéticas. Los experimentos han seguido en todo momento la legislación vigente para la protección de animales de experimentación.

Esta tesis se vincula al área de conocimiento de Fisiología Animal, y más específicamente se encuadra en el tema de acuicultura, nutrición y cronobiología.



IX. ANEXOS

IX. ANEXOS: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA Y OTROS

ANEXO I: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Durante la elaboración de la presente Tesis Doctoral se ha obtenido la siguiente producción científica:

Publicaciones (original papers)

Herrero, M.J.; Madrid, J.A.; Sánchez-Vázquez, F.J. 2003. Entrainment to light of circadian activity rhythms in tench (*Tinca tinca*). *Chronobiol. Int.* 20: 1001-1017.

Herrero, M.J.; Pascual, M.; Madrid, J.A.; Sánchez-Vázquez, F.J. 2005. Demand-feeding rhythms and feeding-entrainment of locomotor activity in tench (*Tinca tinca*). *Physiol. Behav.* 84: 595-605.

Herrero, M.J.; Míguez, J.M.; Martínez, F.J.; Madrid, J.A. 2007. Response to dietary tryptophan and melatonin supplementation on plasma and gastrointestinal melatonin, cortisol and activity rhythms of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Comp. Physiol. B.* 177: 319–326.

Herrero, M.J.; Brännäs, E.; Madrid, J.A.; Sánchez-Vázquez, F.J. Daily rhythms of dietary selection in individual fish within a group, using *PIT tag* and multiple self-feeders with incomplete macronutrient diets in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). En preparación.

Congresos

Herrero, M.J.; Madrid, J.A.; Sánchez-Vázquez, F.J. Ritmo de actividad locomotora y alimentaria en tenca. IX Congreso Nacional de Acuicultura. Ponencia oral. Cádiz, 2003.

Herrero, M.J.; Fallola, C.; Pascual, M.; Madrid, J.A.; Sánchez-Vázquez, F.J. Demand-feeding rhythms and feeding entrainment of locomotor activity rhythms in tench. I Congreso Mundial de Cronobiología. Póster. Sapporo (Japón), 2003.

Vera, L.M.; Herrero, M.J.; Madrid, J.A.; Sánchez-Vázquez, F.J. Daily plasma and ocular melatonin rhythms in Tench. (*Tinca tinca*) exposed to low light intensities. I Congreso Mundial de Cronobiología. Póster. Sapporo (Japón), 2003.

Herrero, M.J.; García-Vizcaíno, E.M.; Madrid, J.A.; Sánchez-Vázquez, F.J. Influence of lunar cycles on locomotor activity rhythms in tench exposed to natural moonlight. VI Congreso Internacional sobre Biología de Peces. Póster. Manaus (Brasil), 2004.

Herrero, M.J.; Madrid, J.A.; Sánchez-Vázquez, F.J. Influence of the lunar phase on the locomotor activity and feeding in tench. IV Jornada Internacional Sobre Tenca. Wierzba (Polonia), 2004.

Herrero, M.J.; Brännäs, E.; Madrid, J.A.; Sánchez-Vázquez, F.J. Dietary selection in individual Arctic charr using multiple self-feeders with incomplete macronutrient diet. Congreso Europeo de Acuicultura. Ponencia oral. Barcelona, 2004.

Herrero, M.J.; Míguez, J.M.; Martínez, F.J.; Madrid, J.A. Response to dietary tryptophan and melatonin supplementation on plasma and gastrointestinal melatonin, cortisol and activity rhythms of European sea bass. XXIII Congreso de Endocrinólogos Europeos. Ponencia oral. Manchester (Reino Unido), 2006.

ANEXO II: PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN Y BECAS

La presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo asociada de los siguientes proyectos de investigación:

1. Dietary self-selection in fish: a geometrical approach for optimising aquaculture production. Comisión Europea, Concerted Action (QLRT-2000-00989). 2001-2004. FJSV.
2. Ritmos de alimentación en peces: mecanismos centrales de regulación y sincronización ambiental. MCYT. 2002-2004. FJSV.
3. Aplicación de la autoselección de macronutrientes mediante comederos a demanda para el diseño de dietas de dos nuevas especies: sargo picudo (*Diplodus puntazzo*) y lenguado (*Solea senegalensis*). MCYT. 2002-2004. JAMP.
4. "REGULACIÓN NEUROENDOCRINA Y AMBIENTAL DE LA ALIMENTACIÓN EN LOS PECES" Subproyecto vinculado a la Universidad de Murcia "Regulación de la ingesta de alimento en peces. Papel del sistema circadiano". MCYT. 2005-2006. JAMP.

Durante este periodo, la doctoranda ha disfrutado de los siguientes contratos/becas:

1. Contrato de Titulado Superior en Proyectos de Investigación, asociado a la Acción Concertada Dietary self-selection in fish: a geometrical approach for optimising aquaculture production. (QLRT-2000-00989). 2001-2004. FJSV.
Entidad concesora: Universidad de Murcia (con cargo a proyecto de la Comisión Europea).
Duración: 3 años.
2. Beca de Investigación. 2005-2006.
Entidad concesora: Fundación Grupo Eroski.
Duración: 1 año.

ANEXO III: ASISTENCIA A REUNIONES Y ESTANCIAS REALIZADAS

Asistencia a Jornadas y Reuniones Científicas

- I Reunión Proyecto Europeo (Acción Concertada) "Dietary Self-Selection in Fish". Murcia, 19-20 de enero 2002.
- I Reunión Proyecto "Ritmos en Peces". Madrid, 22 de mayo 2002.
- II Reunión Proyecto Europeo "Dietary Self-Selection in Fish". Bergen (Noruega), 18 de junio 2002.
- "European Research 2002" Conference. Bruselas (Bélgica), 11-13 noviembre del 2002.
- III Reunión Proyecto Europeo (Acción Concertada) "Dietary Self-Selection in Fish". Tervo (Finlandia), 13-15 de noviembre 2002.
- IV Reunión Proyecto Europeo (Acción Concertada) "Dietary Self-Selection in Fish". Umeå (Suecia), 28 de abril 2003.
- I Jornadas Científico-Técnicas Andalucía-Marruecos. "Diversificación de Especies Marinas en Acuicultura". Cádiz, marzo 2004.
- "Acuicultura I: Biología Marina, Reproducción y Desarrollo" y "Acuicultura II: Cultivo y alimentación de peces". Universidad del Mar. Cartagena (Murcia), septiembre 2004.
- VI Reunión Proyecto Europeo (Acción Concertada) "Dietary Self-Selection in Fish". Mallorca, 29-30 de septiembre 2004.
- Jornadas "Acuicultura en Mar Abierto". DAP. Cádiz, 13-14 de junio 2006.
- Jornadas Técnicas de Acuicultura "Acui 2006". Villagarcía de Arousa (Pontevedra), 5-7 septiembre 2006.
- "Congreso Virtual de Acuicultura CIVA 2006".
- "Foro Jacumar sobre viveros marinos". Madrid, 28 de marzo 2007.
- "I Jornadas del OESA de Acuicultura". Pazo Mariñán (La Coruña), 27-28 de abril 2007.

Estancias en otros centros:

Centro: Dpto. de Acuicultura. Swedish University of Agricultural Sciences.

Localidad: Umeå

País: Suecia

Fecha: 2003

Duración: 2 semanas

Centro: Centro de Acuicultura "Las Vegas del Guadiana"

Localidad: Villafranco del Guadiana (Badajoz)

País: España

Fecha: 2003

Duración: 2 semanas

Centro: Facultad de Ciencias del Mar. Universidad de Vigo.

Localidad: Vigo

País: España

Fecha: 2005

Duración: 1 semana

