



UNIVERSIDAD DE MURCIA
Departamento de Fisiología
Unidad Docente de Fisiología Animal

**CARACTERIZACIÓN DEL POTENCIAL METABÓLICO Y REGULADOR DE LA
INGESTA DEL SARGO PICUDO (*Diplodus puntazzo*).**

Pedro Francisco Almaida Pagán

2008

La presente Tesis Doctoral ha sido concebida como compendio de las siguientes publicaciones:

1. 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 on gelatin capsules and challenged with protein dilution. *Physiol. Behav.* 88, 550—558.
2. Almaida-Pagán, P.F., Seco-Rovira, V., Hernández, M.D., Madrid, J.A., de Costa, J., Mendiola, P., In Press. Energy intake and macronutrient selection in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) challenged with fat dilution and fat deprivation using encapsulated diets. *Physiol. Behav.* doi:10.1016/j.physbeh.2007.10.006.
3. Almaida-Pagán, P.F., Hernández, M.D., García García, B., Madrid, J.A., de Costa, J., Mendiola, P., 2007. Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils on n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid desaturation and elongation in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) hepatocytes and enterocytes. *Aquaculture* 272, 589—598.
4. Almaida-Pagán, P.F., Hernández, M.D., Madrid, J.A., de Costa, J., Mendiola, P. Sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) ability for different oil sources discrimination using encapsulated complete diets. Enviado a *Physiol. Behav.*



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

VICERRECTORADO DE ESTUDIOS



D. PEDRO FRANCISCO ALMAIDA PAGÁN
C/ Joaquín Martínez Gómez, 52
30565 - Las Torres de Cotillas
MURCIA

Vista la solicitud presentada el día 9 de octubre de 2007 por D. Pedro Francisco Almaida Pagán, con DNI número 48416113, sobre autorización para presentación de tesis doctoral como compendio de publicaciones con carácter previo a la tramitación de la misma en la Universidad de Murcia, le comunico que la Comisión de General de Doctorado, vistos:

- El informe previo del Departamento de Fisiología, responsable de la autorización de la tesis doctoral en fase de elaboración, de esta Universidad, y
- El visto bueno de la Comisión de Grupo de Áreas de Ciencias de la Salud,

resolvió, en su sesión de 19 de octubre de 2007, **ACCEDER** a lo solicitado por el interesado pudiendo, por lo tanto, presentar su tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.

Lo que en cumplimiento del artículo 58 de la vigente Ley 30/1992, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común, de 26 de noviembre, se **notifica a** D. Pedro Francisco Almaida Pagán, significándole que contra esta resolución, que pone fin a la vía administrativa, se podrá interponer potestativamente ante el mismo órgano que la ha dictado, recurso de reposición, en el plazo de un mes a contar desde el día siguiente a su notificación, de acuerdo con lo dispuesto en el art. 116 de la citada Ley.

Si no hiciera uso del recurso de reposición podrá interponer recurso contencioso-administrativo, en el plazo de dos meses desde la notificación de este acuerdo, en la forma establecida en la Ley 29/1998, de 13 de julio, reguladora de dicha Jurisdicción.

Murcia, 19 de octubre de 2007
Vicerrectora de Estudios y
Presidenta de la Comisión General de Doctorado

Concepción Palacios Berna





D. Francisco Javier Salazar Aparicio, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Fisiología de la Universidad de Murcia

AUTORIZA:

Al Licenciado en Biología D. Pedro Francisco Almada Pagán a presentar la Tesis Doctoral titulada "**Caracterización del potencial metabólico y regulador de la ingesta del sargo picudo (*Diplodus puntazzo*)**" ante la Comisión de Doctorado como compendio de Publicaciones dado que cumple con todos los requisitos exigidos por la normativa vigente. Dicha Tesis ha sido realizada bajo la inmediata dirección y supervisión de Dña. Pilar Mendiola López y D. Jorge de Costa Ruiz.

Para que conste a los efectos oportunos, emitimos este informe en Murcia a 8 de Octubre de 2007.

Francisco Salazar



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DPTO. DE FISIOLÓGIA



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA
UNIDAD DOCENTE DE FISIOLÓGIA ANIMAL

Facultad de Biología

Pilar Mendiola López y Jorge de Costa Ruiz, Profesores Titulares del Departamento de Fisiología,
Unidad Docente de Fisiología Animal, de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia,

AUTORIZAN

Al Licenciado en Biología D. Pedro Francisco Almada Pagán a presentar la Tesis Doctoral titulada "**Caracterización del potencial metabólico y regulador de la ingesta del sargo picudo (*Diplodus puntazzo*)**" ante la Comisión de Doctorado como compendio de Publicaciones. Dicha Tesis ha sido realizada bajo nuestra dirección y reúne las condiciones legales precisas para optar al título de Doctor en Biología. La Tesis es un compendio de 3 artículos publicados en revistas internacionales de gran difusión en el mundo de la Fisiología y el Comportamiento Animal, incluidas en el JCR. Este formato permite plasmar con facilidad el recorrido realizado por el doctorando, y se ajusta al modelo de tesis presentadas actualmente dentro de nuestra área en el ámbito internacional.

Para que conste a los efectos oportunos, emitimos este informe en Murcia a ocho de Octubre de dos mil siete.





Este trabajo ha sido financiado gracias a fondos del CICYT concedidos al proyecto *AGL2004-08137-CO4-02/ACU*, bajo el título: "Regulación de la ingesta de alimento en peces. Papel del sistema circadiano" y del Ministerio de Educación y Ciencia (MEC) (beca AP2002-1368 concedida a P.F. Almáida-Pagán).

Agradecimientos

Aunque exista una carrera diseñada para obtener un título, y mucha gente siga los mismos pasos y, al final, pueda denominarse de la misma forma lo que han hecho en el tiempo empleado, sin duda cada persona recorre un camino propio y, no sólo son diferentes los resultados obtenidos en el plano profesional, sino también en el personal que, en definitiva, es el que importa y con el que uno se queda cuando cierra un capítulo y se acerca la hora de abrir uno nuevo.

En este momento en que me encuentro, cerrando el trabajo realizado en los últimos años, encaramado en lo alto del camino que he venido recorriendo para llegar a presentar esta Tesis Doctoral, y, antes de decidirme a seguir andando por una nueva senda dentro de mi proyecto de vida, es momento de devolver, en estas líneas, parte de todo lo que he recibido, de agradecer los momentos que realmente han definido mi camino hacia ese título de Doctor que puede parecer siempre el mismo, pero que para cada uno presenta connotaciones muy distintas, pues se compone de muchos momentos vividos, con muchas personas distintas, que serán las que, en definitiva, lean estas palabras y se vean reflejadas como parte de este proyecto que culmina.

Siguiendo un orden cronológico, quiero agradecer en primer lugar a mis compañeras de carrera, Masé, Toñi, Mar, Mariade y Sonia por haberme aportado parte de esa serenidad con que afrontaban las clases, las prácticas, las interminables jornadas en la Facultad. Sin ellas, sin ese ambiente disciplinado, habría sido para mí muy difícil llegar siquiera a finalizar la carrera. Fueron sin duda el contrapeso a mis inquietudes más irreverentes y mi rebeldía autodestructiva. Sabéis que cada cierto tiempo me lo planteaba todo y sí, al final tuve que reconocer que el problema no estaba tanto en cambiar lo que estaba haciendo sino el cómo lo estaba llevando a cabo, sosegarme para no perder la perspectiva y, con ella, la paciencia. Por todo ello, gracias.

En segundo lugar, quiero referirme a dos personas cuyo brillo me ha mantenido dentro de este Departamento, cuya presencia en mi vida ha marcado un antes y un después. Ellos me han permitido canalizar todo lo que llevaba dentro y poder creer que podía trabajar en esto de la ciencia a pesar de mis altibajos. Me refiero a Pilar Mendiola y Jorge de Costa, mi hogar en la Facultad de Biología, el espacio donde puedo sentarme, charlar y pedir consejo. Creo que no hay nada mejor que sentir ese lugar del que uno forma parte y al que puede recurrir cuando las cosas se tuercen. Mi agradecimiento hacia vosotros es enorme, espero que con estas palabras podáis entender el orgullo que siento de defender nuestro trabajo, siendo vosotros dos los directores de este proyecto que termina y sigue a la vez, pues espero continuar formando parte de este equipo increíble que hemos creado. Gracias.

Al resto de profesores del Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Biología, quiero darles las gracias por haberme arropado y enseñado tantas cosas, especialmente a Francisco Javier Martínez, José Ángel López, Juan Antonio Madrid y Marian Rol, todos ellos bajo la dirección de Salvador Zamora, quien ha hecho posible este equipo. Espero haber dejado, durante este tiempo, algo bueno en vosotros y que me tengáis por compañero y amigo.

También, tengo mucho que agradecer a todos mis compañeros de Departamento. Creo que, juntos, hemos conformado un ambiente genial donde aunar trabajo y amistad, un ambiente que uno echa de menos cuando pasa tiempo alejado y al que vuelve feliz por formar parte de él. Desde que me incorporé al Departamento he tenido unos compañeros geniales, empezando por Diego y Luisa, con los que me batí con todos los problemas posibles durante la experimentación y establecí una conexión especial. También ha estado Vicente Seco, que poco a poco se ha ido convirtiendo en mi compañero de fatigas con los sargos. Gracias por haber estado ahí todo este tiempo. Igualmente, quiero dar las gracias a los, por entonces, “casi doctores”, que respondían a las preguntas que iban surgiendo en los comienzos, a Vera, mi maestra en el mundo de las cápsulas; a Manolo y Pepa, y a todos los que han ido sucediéndose después, manteniendo ese espíritu maravilloso: Ronald, Hamilton, Pablo, Víctor,

Fátima, María Jesús, Laura, José Fernando, Catarina, José Antonio, Bea, Tere, Juan Antonio, Alejandro... Muchas gracias a todos, os llevaré siempre conmigo.

Quiero hacerles llegar mi cariño a la gente del Departamento de Biología Animal de la Facultad de Biología de la Universidad de la Laguna, Tenerife, por haberme recibido tan bien durante los dos meses de estancia que permanecí con ellos y, en los que me sentí parte de ese grupo humano increíble. Gracias Cova, Pepa, Mercedes, Noe, Lupe, Virginia, Ana Bolaños, Marga, Melo... Sois luz.

También quiero agradecer al IMIDA de San Pedro del Pinatar por haberse mostrado siempre tan receptivos con nosotros y habernos permitido usar sus instalaciones. Gracias Lola.

Una parte esencial de lo que soy la conforman mi familia y mis amigos, con los que comparto mi vida y con los que siempre puedo tomar una cerveza y echar unas risas, apartar las penas y dar paso a la alegría, disfrutando de las cosas cotidianas. Gracias mamá y papá, hermanos. Gracias Domingo y Javi, siempre seréis mis amigos, gracias Keko, Franber, David, Martín, Julio, y todos los que me habéis demostrado que merece la pena seguir luchando, que estamos en ello y que aún nos queda mucho por hacer.

Por último, quiero dar las gracias a mi preciosa compañera, mi Otra Parte, la luz que encontré ya iniciado en este proyecto y que me está enseñando a afrontar la vida con una calma y una paz nuevas. Desde que te conocí guardo esa ágata conmigo y por muy lejos que esté, frente al mar o mirando las estrellas, sonreiré con el corazón contento pues, dos caminos que anduvieron tan distantes el uno del otro, al fin convergieron y, en medio del universo, he podido encontrarte. Mila, gracias por existir.

Nombres comunes y científicos de las especies citadas

Nombre común	Nombre científico	Nombre inglés
Anguila europea	<i>Anguilla anguilla</i> , Linnaeus 1758	European eel
Bacalao de Murray	<i>Maccullochella peelli peeli</i> , Mitchell 1838	murray cod
Barbo	<i>Ictalurus punctatus</i> , Rafinesque 1820	catfish
Barbo africano	<i>Clarias gariepinus</i> , Burchell 1822	African catfish
Besugo	<i>Pagellus bogaraveo</i> , Brünnich 1768	blackspot seabream
Carpa común	<i>Cyprinus carpio</i> , Linnaeus 1758	common carp
Carpín dorado	<i>Carassius auratus</i> , Linnaeus 1758	goldfish
Dentón	<i>Dentex dentex</i> , Linnaeus 1758	dentex
Dorada	<i>Sparus aurata</i> , Linnaeus 1758	gilthead seabream
Hurta	<i>Pagrus auriga</i> , Valenciennes 1843	redbanded seabream
Lubina	<i>Dicentrarchus labrax</i> , Linnaeus 1758	European sea bass
Lucio	<i>Esox lucius</i> , Linnaeus 1758	pike
Pargo	<i>Pagrus pagrus</i> , Linnaeus 1758	red porgy
Pez depredador, rape	<i>Lophius piscatorius</i> , Linnaeus 1758	white anglerfish
	<i>Lophius budegassa</i> , Spinola, 1807	black anglerfish
Rodaballo	<i>Scophthalmus maximus</i> , Rafinesque 1810	Turbot
	<i>Psetta maxima</i> , Linnaeus 1758	
Rodaballo de cola amarilla, limanda	<i>Limanda ferruginea</i> , Storer 1858	yellowtail flounder
Salmón del atlántico	<i>Salmo salar</i> , Linnaeus 1758	Atlantic salmon
Salmón plateado	<i>Oncorhynchus kisutch</i> , Walbaum 1792	coho salmon
Sargo blanco	<i>Diplodus sargas</i> , Linnaeus 1758	white seabream
Sargo picudo	<i>Diplodus puntazzo</i> , Cetti 1777	sharpnout seabream
	<i>Puntazzo puntazzo</i> , Gmelin 1789	
Tilapia	<i>Oreochromis mossambicus</i> , Peters 1852	tilapia
Trucha arco iris	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , Walbaum 1792	rainbow trout
	<i>Salmo gairdneri</i> , Richardson 1836	
Trucha marina	<i>Salmo trutta</i> , Linnaeus 1758	brown trout

Abreviaturas

Δ-9, Δ-6 y Δ-5:	Delta-9, delta-6 y delta-5 desaturasas.
+C2:	elongasa.
5-HT:	serotonina.
AA:	ácido araquidónico, 20:4n-6.
AG:	ácidos grasos.
ApoAIV:	apolipoproteína A-IV.
CCK:	colecistoquinina.
CD:	dieta completa.
CH:	carbohidratos.
DA:	dopamina.
DHA:	ácido docosahexaenoico, 22:6n-3.
EFA:	ácidos grasos esenciales.
EPA:	ácido eicosapentaenoico, 20:5n-3.
F:	grasa.
FAME:	metil-ésteres de ácidos grasos.
FFA:	ácidos grasos libres.
FO:	aceite de pescado.
GABA:	ácido gammaaminobutírico.
GAL:	galanina.
GH:	hormona del crecimiento.
GLP-1:	péptido tipo glucagón-1.
GLUT1/GLUT3:	transportadores de glucosa 1 y 3.
GRP:	polipéptido liberador de gastrina (bombesina).
GRPR:	receptor del péptido librador de gastrina (GRP).
HUFA:	ácidos grasos altamente insaturados.
IGFs:	factores de crecimiento tipo insulina.
IGF-1:	factor de crecimiento tipo insulina tipo 1.

LA:	ácido linoleico, 18:2n-6.
LNA:	ácido α -linolénico, 18:3n-3.
LO:	aceite de linaza.
MUFA:	ácidos grasos monoinsaturados.
n-3:	ácidos grasos n-3 (ω -3).
n-6:	ácidos grasos n-6 (ω -6).
NE:	noradrenalina.
NFE:	extracto libre de nitrógeno.
NMRBR:	receptor de la neuromedina-B.
NPY:	neuropéptido-Y.
P:	proteína.
PUFA:	ácidos grasos poliinsaturados.
SAFA:	ácidos grasos saturados.
SNC:	sistema nervioso central.
SO:	aceite de soja.
SSs:	somatostatinas.
T₃:	triiodotironina.
T₄:	tiroxina.
TG:	triglicéridos.
TGI:	tracto gastrointestinal.
TH:	hormonas tiroideas.
TSH:	hormona estimulante del tiroides.

Índice

1. INTRODUCCIÓN.
 - 1.1. Comportamiento alimentario.
 - 1.2. Búsqueda de alternativas a las fuentes de pescado.
 - 1.3. El sargo picudo: una nueva especie para la acuicultura mediterránea.
2. OBJETIVOS.
3. MATERIAL Y MÉTODOS.
 - 3.1. Diseño experimental general.
 - 3.2. Instalaciones.
4. TRABAJO EXPERIMENTAL.
 - 4.1. Macronutrient selection through post-ingestive signals in sharpsnout seabream fed gelatina capsules and challenged with protein dilution.
 - 4.2. Energy intake and macronutrient selection in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) challenged with fat dilution and fat deprivation using encapsulated diets.
 - 4.3. Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils on n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid desaturation and elongation in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) hepatocytes and enterocytes.
 - 4.4. Sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) ability for different oil sources discrimination using encapsulated complete diets.
5. DISCUSIÓN GENERAL.
6. CONCLUSIONES.
7. RESUMEN GENERAL.
8. REFERENCIAS.
9. ANEXO.

Introducción

Hasta hace muy poco, la gran mayoría de los trabajos que componían la bibliografía acerca de los mecanismos implicados en la regulación de la ingesta de alimento por parte de los peces, estaban exclusivamente enfocados al contenido energético de la misma. Sin embargo, la creciente aportación científica en este campo durante los últimos años, está ampliando enormemente la visión de este sistema de regulación. Los nuevos estudios realizados muestran que la regulación de la ingesta involucra una compleja red de mecanismos interaccionando entre sí, que determinan, no sólo el establecimiento de una ingesta constante de energía por parte del animal, sino también un patrón estable de selección de macronutrientes, que defiende en diferentes condiciones experimentales. Por lo tanto, la regulación de la ingesta por parte del animal, no sólo incluiría el componente energético de la misma, sino también el aporte de nutrientes específicos que supone para el organismo (Thibault y Booth, 1999).

Las necesidades nutricionales de una especie, así como las capacidades metabólicas en las que estas subyacen, son parte de un proceso de adaptación del animal al hábitat que ocupa. De este modo, es de esperar que aquellos animales que viven en un hábitat caracterizado por la presencia de una fuente de alimento con una composición determinada, también se hayan adaptado a lo largo de las generaciones y hayan evolucionado hacia un óptimo aprovechamiento del alimento del que disponen y que, a la hora de trabajar en la elaboración de dietas artificiales con diferente composición para estos animales, nos encontremos con unas barreras constitutivas que vendrán dadas por el acervo metabólico y regulador de la especie. De este modo, si se tiene en cuenta que los peces marinos presentan, en su mayoría, una dieta rica en proteínas y lípidos de alta calidad, fáciles de utilizar por su organismo, parece lógico pensar que la maquinaria enzimática encargada de la transformación de estos nutrientes se muestre menos funcional que la de aquellos peces que presentan dietas más deficitarias en proteínas y lípidos de alta calidad y que, por lo tanto, deben ser compensadas por el metabolismo del animal.

1.1. Comportamiento alimentario.

Para estudiar en profundidad estas capacidades, se han diseñado diferentes **metodologías de auto-alimentación** basadas, en unos casos, en la utilización de dietas granuladas en comederos auto-demanda y, en otros, en el empaquetado de las dietas en el interior de cápsulas de gelatina (Aranda *et al.*, 2000, 2001; Rubio *et al.*, 2003, 2004, 2005, 2006; Sánchez-Vázquez *et al.*, 1998, 1999; Torrejón Atienza *et al.*, 2004; Vivas *et al.*, 2006). En todas ellas, se trata de poner a disposición de los peces un sistema de alimentación “a la carta”, en el que éstos pueden seleccionar entre distintas dietas e ingerir la cantidad de alimento que deseen. De este modo, se puede caracterizar muy bien el comportamiento alimentario de los animales, obteniendo información acerca de qué, y cuánto comen y, en el caso de los comederos a demanda, de cuándo prefieren hacerlo. A partir de estos estudios se ha demostrado que los peces, no sólo son capaces de seleccionar entre distintas fuentes de alimento para alcanzar un patrón de selección de macronutrientes, sino que ese patrón constituye una dieta completa equilibrada que se adapta perfectamente a las necesidades fisiológicas de la especie, así como a sus hábitos alimentarios (carnívoros u omnívoros). Esa dieta constituye, pues, una “diana” para los peces, la cual defienden aunque varíen las condiciones experimentales.

El proceso de auto-selección implica la conexión del comportamiento alimentario del animal con los mecanismos fisiológicos que subyacen a la captura y utilización del alimento. Para poder comprender los mecanismos implicados en tal regulación, es necesario estudiar todos los pasos existentes desde que una posible fuente de alimento es detectada como tal por el animal hasta que éste toma la decisión de ingerirla o rechazarla. El comportamiento alimentario es, pues, el resultado de la integración de la información que alcanza el sistema nervioso central (SNC) del animal, por un lado, desde los receptores sensoriales rostrales y orofaríngeos, mecanorreceptores y quimiorreceptores de la mucosa intestinal, así como desde redes neuroendocrinas que implican numerosos órganos y, por otro, de la información acerca del estatus energético del animal (señales de adiposidad) e incluso de pautas no aprendidas,

inherentes a la especie, hacia ciertas sustancias presentes en las posibles fuentes de alimento (Kasumyan, 1997; Lamb, 2001) (Figura 1).

La captura e ingesta de un alimento genera, por tanto, una ingente cantidad de estímulos que serán integrados por el SNC y que, en caso de no existir preferencias innatas de la especie, determinarán el establecimiento de un aprendizaje asociativo por parte del animal, que le permitirá ir ajustando en todo momento la ingesta con las necesidades nutricionales y energéticas (Rubio *et al.*, 2003) (Figura 2).

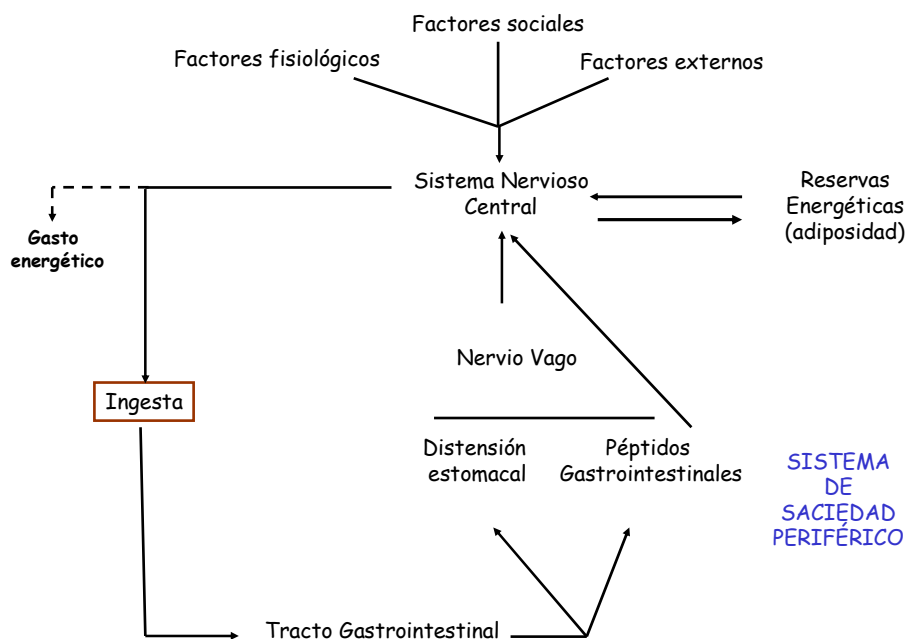


Figura 1. Esquema simplificado del sistema de regulación periférica de la ingesta en peces, donde intervienen el intestino y los órganos asociados. La presencia de quimio y mecanorreceptores así como de toda una variedad de células endocrinas, determinan una compleja red de señalización que producirá efectos a nivel local, gastrointestinal y sobre otros órganos, sobre todo el cerebro, donde llegan señales vía aferencias vagales o mediante vías endocrinas sensibles a la distensión gástrica y al contenido intestinal de nutrientes (Figura modificada de Cerdá-Reverter *et al.*, 2006).

Las técnicas de auto-selección basadas en la utilización de comederos a demanda para el estudio de la regulación de la ingesta, plantean una duda fundamental consistente en la importancia relativa que la información orosensorial del alimento (sabor, olor, textura) puede tener en dicha selección. Mediante esta metodología no se puede saber hasta qué punto la selección de los peces responde a sus requerimientos nutricionales y no a preferencias alimentarias (Rubio *et al.*, 2003). Para acercarse al máximo ambos conceptos, se dio un nuevo paso en las técnicas de alimentación a demanda en peces, empleando una metodología basada en el empaquetado del alimento en cápsulas de gelatina, con el objetivo fundamental de eliminar la información orosensorial de la dieta. Los animales deben tragar las cápsulas para poder acceder al alimento y la selección sólo es posible basándose en diferencias de color entre las cápsulas como única señal externa. Las cápsulas atraviesan el tracto digestivo hasta llegar al estómago, donde la pared de gelatina se deshace liberando su contenido. Por tanto, los mecanismos de regulación observados mediante esta técnica se iniciarían a nivel post-ingestivo y/o post-absortivo, sin la mediación de factores tales como el sabor, el olor o la textura (Rubio *et al.*, 2003, 2004, 2005, 2006).

Tras la comprobación de que una especie puede ser utilizada como modelo de estudio usando esta técnica, es posible desarrollar diseños experimentales de menor a mayor complejidad, en los que se puede ir profundizando en el conocimiento de la capacidad del animal para defender una dieta, comparando con los resultados obtenidos con dietas granuladas.

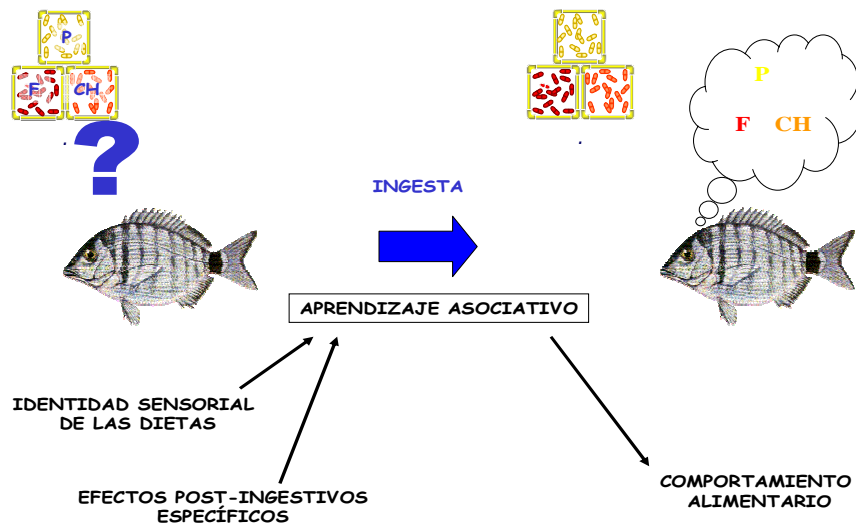


Figura 2. Premisas que se han de cumplir para que tenga lugar la selección específica de dietas con distinto contenido en macronutrientes. La existencia de una característica sensorial distintiva por parte de la dieta y la existencia de efectos post-ingestivos específicos permitirá el establecimiento de una ingesta selectiva mediante la modificación del comportamiento alimentario. Si un animal sin experiencia previa decide ingerir el alimento, la nueva experiencia influirá en la próxima ocasión mediante la asociación de esos efectos post-ingestivos con las características sensoriales que permitan distinguir la composición del alimento.

La selección de macronutrientes resulta ser un factor de gran importancia para los animales, apuntando hacia la existencia de **mecanismos de selección nutriente-específicos** basados en la detección de las características propias de los macronutrientes, señales que serían integradas dentro de la actividad neural del animal. En peces, con la excepción del carpín dorado, especie omnívora, la proteína es el macronutriente seleccionado en mayor cantidad, tanto en experimentos con dietas granuladas (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1999; Aranda *et al.*, 2000, 2001; Yamamoto *et al.*, 2001; Torrejón Atienza *et al.*, 2004) como encapsuladas (Rubio *et al.*, 2003, 2004, 2005, 2006). Estos resultados sugieren la existencia de una regulación flexible, que no tiene por qué ser de igual relevancia para los tres macronutrientes y que estaría actuando a cuatro posibles niveles, según propusieron Seeley y Berthoud (2000) (Tabla 3) (Figura 3):

1. Señales sensoriales cefálicas (visión, olfacción, gustación, mecanorrecepción).
2. Señales generadas durante la digestión y/o absorción (señales gastrointestinales, hepáticas y pancreáticas).
3. Transducción neural. Generación de señales nerviosas que informan de la disponibilidad de los diferentes macronutrientes en los tejidos (liberación de neurotransmisores y péptidos capaces de actuar en diferentes regiones cerebrales).
4. Integración nerviosa que como resultado final, produce la activación de efectores (sistemas motor, autonómico, endocrino y comportamental) que en última instancia serán los responsables de la selección dietaria.

1.1.1. Señales sensoriales cefálicas

Un requisito fundamental para que se establezca una regulación nutriente-específica es que los diferentes macronutrientes posean propiedades distintivas que permitan al animal establecer esa diferenciación a través de sus órganos sensoriales (visión, olfacción, gustación, mecanorrecepción) (Thibault y Booth, 1999). En mamíferos, las señales ópticas procesadas por el córtex visual podrían confluir en la amígdala, o en el hipotálamo lateral, con señales de receptores gustativos (procesadas por el núcleo del tracto solitario) y con señales olfativas procedentes del bulbo olfatorio. Estas señales sensoriales, podrían verse integradas con otras señales de origen post-ingestivo y, en conjunto, permitirían la elaboración de un comportamiento alimentario tendente a controlar la ingesta de macronutrientes (Rolls, 2000; Rubio, 2004).

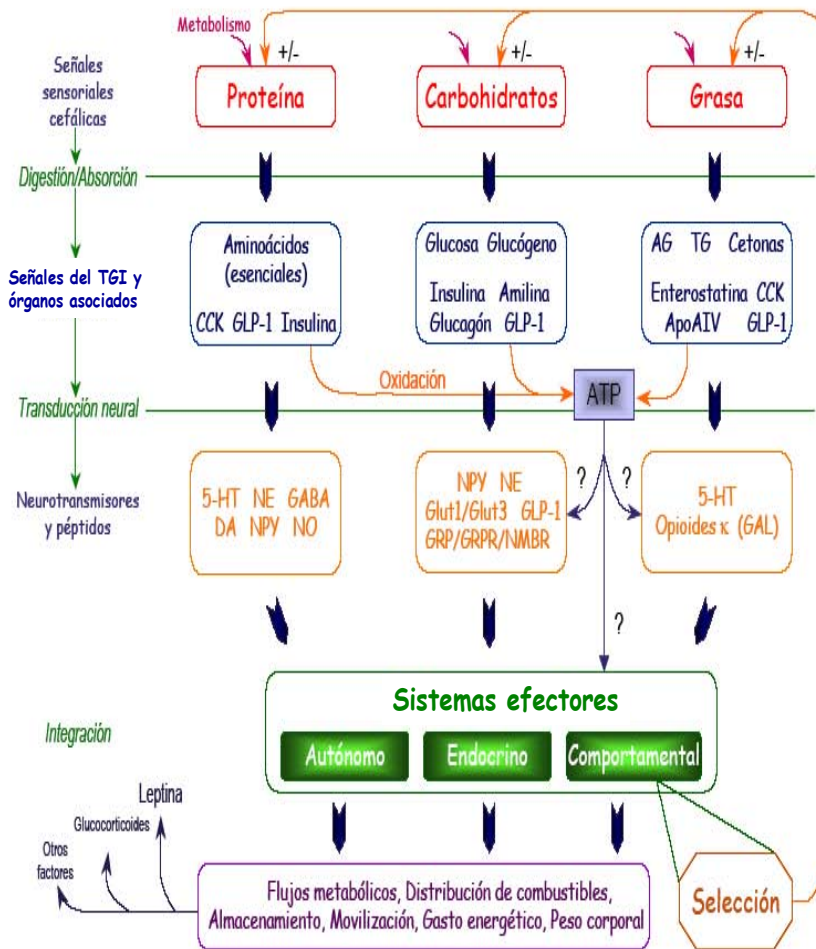


Figura 3. Diagrama esquemático mostrando el flujo de información y los mensajeros potencialmente implicados en el sistema regulador macronutriente-específico de la ingesta de alimento. Las señales portadoras de la información específica de los macronutrientes son generadas por las fases cefálicas y gastrointestinal/vísceras asociadas durante la ingestión, y por los procesos metabólicos. Estas señales son transducidas e integradas dentro del sistema nervioso, el cual determina la selección presente y futura, así como las actividades nerviosa autónoma (SNA) y endocrina. También aparece indicada la posibilidad de una información no específica de los macronutrientes, en el control de la ingesta de alimento, procedente de la producción energética del hígado. Abreviaturas: CCK, colecistoquinina; GLP-1, péptido similar al glucagón tipo 1; AG, ácidos grasos libres; TG, triglicéridos; ApoAIV, Apolipoproteína A-IV; 5-HT, serotonina; NE, noradrenalina; GABA, ácido gammaaminobutírico; DA, dopamina; NPY, neuropéptido Y; NO, óxido nítrico; Glut1/Glut3, transportadores de glucosa 1 y 3; GRP, polipéptido liberador de gastrina (bombesina); GRPR, receptor del GRP; NMBR, receptor de la neuromedina-B; GAL, galanina (Seeley y Berthoud, 2000; Redibujado de Rubio, 2004).

1.1.2. Señales gastrointestinales y hepáticas.

1.1.2.1. Mecanorreceptores del tracto gastrointestinal (TGI).

Cuando el alimento llega al estómago puede estimular terminaciones mecanosensitivas vagales que informan a los centros reguladores de la ingesta del grado de distensión de la pared estomacal. Esta señal mecanorreceptiva, rápida, puede servir como un primer nivel de regulación del volumen de alimento ingerido. Sin embargo, aunque esta regulación esté presente en peces, estos vertebrados parecen regular más la energía que el volumen, como lo prueban los experimentos de dilución de dietas con celulosa (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1998; Vivas *et al.*, 2006) y la aparente pérdida de la regulación de volumen en especies como la trucha, en la cual la ingesta de cápsulas llegó a alcanzar niveles incluso superiores a un 8% de su peso corporal en una sola comida (Rubio, 2004).

1.1.2.2. Quimiorreceptores del TGI.

Pruebas electrofisiológicas y comportamentales sugieren que el estómago y el intestino son capaces de suministrar información sobre la composición en macronutrientes de una comida. La pared del estómago e intestino está tapizada de quimiorreceptores sensibles a determinados componentes de la dieta (Höfer *et al.*, 1996; Covasa y Ritter, 2000). En mamíferos, los registros electrofisiológicos de fibras nerviosas que inervan el intestino, han mostrado sensibilidad a la presencia de aminoácidos, glucosa y ácidos grasos (Mei, 1978; Jeanningros, 1982; Melone, 1986). Estas señales convergen con señales gástricas mecanorreceptivas e información exteroceptiva en el metencéfalo-mielencéfalo, suministrando una vía mediante la cual las señales viscerales pueden influir sobre las señales orosensoriales en la selección de macronutrientes (Covasa y Ritter, 2000).

Tabla 3. Hormonas y otras sustancias activas estudiadas en peces por estar relacionadas con efectos nutriente-específicos.

	Especies	Efectos observados	Referencias
Colecistoquinina (CCK)	Mamíferos..... Lubina.....	Influencia sobre la ingesta selectiva de macronutrientes. Variabilidad de efectos observados. Reducción de la ingesta.	Croos-Mellor <i>et al.</i> , 1999; Peyon <i>et al.</i> , 1999; Rubio, 2004.
Hormonas pancreáticas	Trucha marina alimentada..... Trucha marina en ayunas..... Trucha arco iris..... Peces alimentados.....	Inyecciones de glucosa aumentan la insulina circulante. Aumento de la concentración plasmática de insulina, así como de su unión a hígado. Inyecciones de arginina aumentan insulina circulante y potencian su unión a hígado. Disminuye la extracción por parte del hígado de glucagón e insulina. Inyección de arginina produce hipoglucemia. Más activa estimulando la producción de insulina. Complementos de arginina en la dieta aumentan la insulina y reducen el apetito.	Ablett <i>et al.</i> , 1983; Carneiro <i>et al.</i> , 1993; Gutiérrez y Plisetskaya, 1991; Ince, 1980; Machado <i>et al.</i> , 1988; MacKenzie <i>et al.</i> , 1998; Plisetskaya <i>et al.</i> , 1991.
Hormonas Tiroideas	Trucha arco iris alimentada..... Salmónidos..... Trucha arco iris en ayunas.....	Dieta con baja proteína produce bajas concentraciones plasmáticas de T ₄ , una conversión reducida de T ₄ a T ₃ y reducidas tasas de crecimiento. Dietas con alta proteína producen altas tasas de conversión de T ₄ a T ₃ . Dietas ricas en CH no aumentan ni las concentraciones de T ₃ en plasma ni el crecimiento. Sí aumenta la T ₄ plasmática. La proteína activa la producción de T ₃ . Una sola dieta rica en CH o una inyección de glucosa producen rápidas elevaciones de T ₄ plasmática.	Eales <i>et al.</i> , 1990, 1992, 1993; Higgs y Eales, 1979; Higgs <i>et al.</i> , 1992; Himick y Eales, 1990; Himick <i>et al.</i> , 1991; Leatherland <i>et al.</i> , 1984; Riley <i>et al.</i> , 1993.
Hormona del crecimiento (GH)	Dorada..... Tilapia.....	Dietas con bajo contenido en proteína provocan concentraciones más altas de GH en plasma pero menos de GH unida a hígado, así como de IGF-1. Mismo efecto del bajo contenido en proteína que el ayuno. En pituitarias incubadas <i>in vitro</i> , la cantidad de GH es inversamente proporcional a la concentración de glucosa o de aminoácidos del medio.	Pérez-Sánchez <i>et al.</i> , 1995; Rodges <i>et al.</i> , 1992; Thissen <i>et al.</i> , 1994.
Serotonina (5-HT)	Mamíferos..... Lubina.....	Administración central de 5-HT produce una reducción dosis-dependiente de la ingesta de CH. Amplia variedad de efectos sobre P y F. Posible sistema de retroalimentación negativa entre la ingesta de GH y los niveles de 5-HT. Administración oral de serotonina induce descenso en la ingesta de F y un leve	Burton-Freeman <i>et al.</i> , 1999; Rubio, 2004; Rubio <i>et al.</i> , 2006.

	Especies	Efectos observados	Referencias
		<p>incremento en la de P, sin efectos significativos sobre la de CH. Aparente dependencia de las preferencias previas del animal por P y F (baja capacidad de usar los CH por parte de la lubina).</p> <p>Administración de 5-HT oral aumenta 5-HT cerebral. Efectos promovidos por mecanismos periféricos y centrales. Interacción con CCK, Insulina y melatonina.</p>	
Melatonina	<p>Mamíferos y peces.....</p> <p>Carpín.....</p> <p>Lubina.....</p>	<p>La síntesis de melatonina por células enterocromafines del TGI es importante y parece depender de la presencia de factores nutricionales y del comportamiento alimentario más que del fotoperiodo.</p> <p>Pinealectomía no causa alteración de la cantidad y distribución de la melatonina del TGI y plasma durante el día.</p> <p>La pinealectomía acompañada de enucleación bilateral no disminuye la concentración plasmática de melatonina durante el periodo de iluminación.</p> <p>Administración oral de melatonina induce aumento en la proporción de grasa ingerida. Posible relación con cambios estacionales del ciclo biológico y con la necesidad de ingerir nutrientes ricos en energía en periodos de baja temperatura (fotoperiodos cortos).</p>	<p>Bubenik <i>et al.</i>, 1996; Huether, 1994; Kezuka <i>et al.</i>, 1992; Martin <i>et al.</i>, 1998; Pickett y Pawson, 1994; Rubio, 2004.</p>
Cortisol	<p>Trucha.....</p>	<p>Actuación muy dependiente de las concentraciones plasmáticas así como del estatus fisiológico previo del animal.</p> <p>Altísima variabilidad entre individuos.</p>	<p>Rubio, 2004.</p>
Neuropéptido Y (NPY)	<p>Carpín.....</p>	<p>Peces alimentados con dietas ricas en F exhiben cambios en la expresión del NPY cerebral.</p> <p>Dietas con diferentes concentraciones de proteína no muestran ningún efecto.</p>	<p>Narnaware y Peter, 2001.</p>
Somatostatinas (SSs)	<p>Trucha arco iris.....</p> <p>Trucha arco iris, salmón, barbo, salmón coho, anguila europea, pez depredador.....</p> <p>Trucha.....</p>	<p>En ayuno provoca hiperglucemia.</p> <p>Inyecciones de glucosa inducen aumento de la concentración plasmática de SS.</p> <p>La glucosa eleva la SS tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i>, influyendo en la síntesis y la secreción.</p> <p>Los aminoácidos y la grasa también afectan a la secreción de SS</p> <p>Altas concentraciones de SS en plasma están asociados con elevados niveles de ácidos grasos.</p>	<p>Eilertson y Sheridan, 1995; Harmon <i>et al.</i>, 1991; Ince y So, 1984; Melroe <i>et al.</i>, 2000; Nelson y Sheridan, 2005; Ronner y Scarpa, 1987; Sheridan y Kittilson, 2004.</p>

1.1.2.3. Señales endocrinas nutriente-específicas del TGI.

Mediante la utilización de diferentes protocolos, se ha encontrado que la colecistoquinina (CCK), el péptido similar a glucagón de tipo 1 (GLP-1), la enterostatina, la insulina y la amilina, entre otras hormonas, son liberadas diferencialmente en respuesta a los distintos macronutrientes (Seeley y Berthoud, 2000). No obstante, este tipo de estudios plantea una gran dificultad a la hora de interpretar los resultados ya que, alteraciones de un componente de la dieta, tales como el contenido de proteína o la fuente de lípidos, frecuentemente motivan cambios incontrolados en otras propiedades de la dieta (MacKenzie *et al.*, 1998). Los efectos endocrinos observados pueden ser también respuestas secundarias de acciones de la dieta sobre el metabolismo o el crecimiento. Pero, a pesar de los inconvenientes, estos trabajos en mamíferos están dando lugar a un nuevo campo de estudio, incorporando otro punto de partida para futuras investigaciones acerca de los efectos de nutrientes específicos e identificando la importancia de determinados componentes de la dieta tales como la proteína o la energía total, sobre la expresión de genes específicos en sistemas neuroendocrinos (Beck *et al.*, 1994; White *et al.*, 1994; Wester *et al.*, 1995).

1.1.2.4. Señales post-absortivas.

Un último nivel de detección de los nutrientes tiene lugar una vez han sido absorbidos. Diferentes tejidos, entre los que destaca el hígado, poseen sensores que monitorizan continuamente las concentraciones disponibles de nutrientes. Los nutrientes percibidos por la boca y el estómago no restauran las reservas nutricionales del cuerpo hasta que los nutrientes no alcanzan el hígado, que es el primer órgano en detectar la presencia de nutrientes absorbidos por el intestino, induciendo saciedad (Carlson, 1998).

1.1.3. Transducción neural e Integración nerviosa.

Determinados neurotransmisores y hormonas, una vez liberados en respuesta a señales procedentes del TGI o metabólicas, pueden actuar sobre áreas cerebrales específicas modificando las preferencias selectivas por macronutrientes. De este modo, podríamos establecer un esquema de regulación nutriente-específico sobre el esquema general, tal y como se muestra en la Figura 3. Como ejemplo de esta transducción nerviosa nutriente-específica, tenemos las evidencias aportadas recientemente en peces por Rubio *et al.* (2004, 2006), quienes estudiaron los efectos de la hormona melatonina y de un neurotransmisor precursor de la síntesis de melatonina, como es la serotonina, sobre la selección de macronutrientes.

Como ya se ha señalado, la adaptación a un estilo de vida determinado, caracterizado por la presencia de unas fuentes nutricionales concretas, puede marcar las características metabólicas del animal, que evolucionarían hacia la utilización óptima de los ingredientes que componen su dieta habitual. Este hecho se verá reflejado en las actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo de los diferentes macronutrientes y definirá una barrera constitutiva de la especie. De este modo, se podrían establecer los patrones de alimentación propios de los principales hábitats acuáticos, esto es, el medio dulceacuícola y el medio marino. Los peces que se desenvuelven en ambientes de agua dulce suelen presentar dietas más variadas en las que están presentes algas, insectos, plantas, pequeños peces etc., con una proporción importante de alimentos de origen terrestre, mientras que los animales marinos suelen presentar una dieta eminentemente carnívora/piscívora, propia del medio. Por lo tanto, es necesario caracterizar el metabolismo de cada especie para poder diseñar dietas que sean compatibles con sus posibilidades a nivel metabólico y, de este modo, optimizar el aprovechamiento de las mismas por parte del animal. Este hecho es, a su vez, de vital importancia a la hora de abordar uno de los mayores desafíos a los que se enfrenta la acuicultura en la actualidad, consistente en la necesidad urgente de encontrar alternativas a las fuentes tradicionales de nutrientes, fundamentalmente harinas y aceites de pescado,

procedentes de la pesca extractiva. Una actividad como la acuicultura, que crece a un ritmo muy acelerado, necesita solucionar este problema.

1.2. Búsqueda de alternativas a las fuentes de pescado.

Como se puso de manifiesto en el Congreso de la European Aquaculture Society (EAS) celebrado en Trondheim, Noruega, en agosto de 2005, la producción global de harina de pescado en la actualidad resulta insuficiente para satisfacer las necesidades de la acuicultura, en proceso de continua expansión. Los sustitutos más prometedores a las fuentes de pescado, son los productos vegetales, dada su elevada disponibilidad y su bajo coste, si bien presentan problemas en cuanto a su utilización por parte del animal: composición, digestibilidad, presencia de sustancias antinutritivas o la presencia de ciertos carbohidratos no digeribles (De la Gándara, 2006). En el planteamiento de una sustitución, total o parcial, de la harina de pescado por harinas vegetales, es necesario conocer las posibles consecuencias fisiológicas de un cambio tal en la composición de la dieta.

Los datos disponibles muestran que, cerca de un 30-50% de la harina de pescado, puede ser sustituida con éxito por fuentes de origen vegetal en las dietas de animales de acuicultura (Francis *et al.*, 2001), aunque existen importantes diferencias entre especies. Algunos estudios revelan que la sustitución total es posible, al menos en la trucha arco iris (Kaushik *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1998), mientras que no existen datos concluyentes en otras especies como la dorada (Robaina *et al.*, 1995, 1998), donde se ha alcanzado un nivel de sustitución en torno al 45% (Martínez, 2005). Hernández *et al.* (2007) abordaron la sustitución parcial de la harina de pescado por harina de soja en el sargo picudo, obteniéndose una buena tolerancia hasta una sustitución del 60%, sin efectos negativos de importancia, relacionados en su mayoría con la menor digestibilidad de la proteína de soja. Los coeficientes económicos reflejaron menores costes de producción, con la obtención de un producto en el que no se vieron afectadas sus propiedades organolépticas.

La utilización de aceite de pescado como fuente lipídica supone del mismo modo, un factor limitante para el desarrollo de una acuicultura sostenible (Barlow, 2000). El crecimiento acelerado del cultivo de especies carnívoras europeas como la dorada o la lubina, hace que las expectativas de futuro pasen por buscar alternativas al aceite de pescado como fuente lipídica (Sargent y Tacon, 1999; Tacon, 2004). Los principales candidatos son los aceites vegetales, con los que existe el problema de su composición, muy diferente de la que poseen los aceites de pescado, lo cual requiere de la colaboración del metabolismo del animal para ser compensada. Los peces que mantienen una alimentación de tipo dulceacuícola, son capaces de convertir los ácidos grasos 18:3n-3 (ácido linolénico, LNA) y 18:2n-6 (ácido linoleico, LA), con los que arrancan las principales series de ácidos grasos poliinsaturados, hacia sus correspondientes formas multi-insaturadas y de cadenas más largas (HUFA): 20:5n-3 (ácido eicosapentaenoico, EPA), 22:6n-3 (ácido docosahexaenoico, DHA) y 20:4n-6 (ácido araquidónico, AA), respectivamente (Figura 4). Sin embargo, los que mantienen un tipo de alimentación marina, tienen muy poca capacidad para elongar y desaturar los ácidos grasos, por lo que, para ellos, los HUFA se consideran también esenciales y deben ser aportados en la dieta (NCR, 1993; Tocher *et al.*, 2001, 2003).

La caracterización del metabolismo del animal constituye, pues, un paso fundamental en el estudio de una especie de piscifactoría. A la hora de elaborar piensos para su producción, constituirá un factor esencial conocer los requerimientos energéticos y nutricionales de la especie, así como la flexibilidad de que ésta dispone a la hora de abordar posibles sustituciones en las fuentes de nutrientes tradicionales. Este conocimiento nos ayudará a optimizar el proceso de cultivo así como la calidad del producto final para el consumo humano.

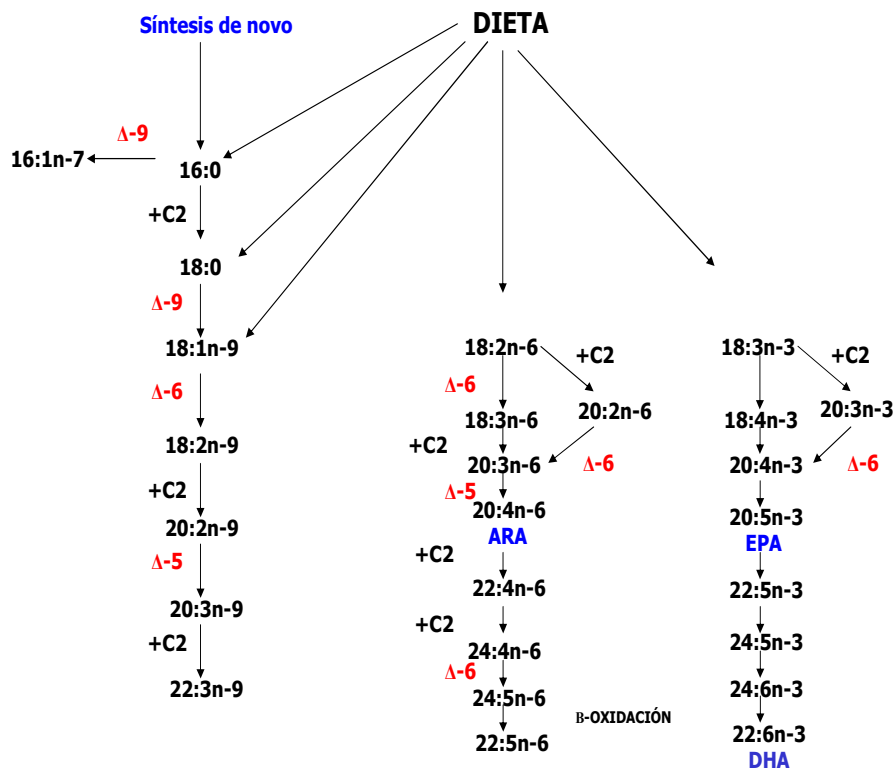


Figura 4. Series de biosíntesis de ácidos grasos, donde se indican las enzimas implicadas, tanto elongasas (+C2) como desaturasas ($\Delta-9$, $\Delta-6$ y $\Delta-5$).

En la presente Tesis Doctoral se utilizó la alimentación a demanda y, concretamente, la alimentación mediante cápsulas de gelatina para caracterizar el potencial regulador de la ingesta del sargo picudo (*Diplodus puntazzo*), una especie marina omnívora de interés en acuicultura y que resulta, por sus características nutricionales, un buen modelo para llevar a cabo estudios de regulación de la ingesta y selección de macronutrientes (Sala y Ballesteros, 1997; Mena Sellés y García García, 2002). De este modo, se profundizó en el comportamiento alimentario de la especie y se pudo establecer una hipótesis acerca de los mecanismos que estarían operando para que esa selección tenga lugar. Este tipo de estudios se enlazó con otros de carácter más aplicado, basados en la caracterización del potencial de la especie para el metabolismo lipídico a la hora de afrontar la sustitución del aceite de pescado tradicional por aceites vegetales.

1.3. El sargo picudo: una nueva especie para la acuicultura mediterránea.

Tradicionalmente, las actividades acuícolas en el Mediterráneo han estado cimentadas en la producción de dos especies, la lubina (*Dicentrarchus labrax*) y la dorada (*Sparus aurata*). La saturación de los mercados para estas especies ha provocado la necesidad de abrir la oferta de especies



cultivables. Buena parte de las especies candidatas pertenecen al orden de los espáridos, este es el caso del dentón (*Dentex dentex*), el pargo (*Pagrus pagrus*), la hurta (*Pagrus auriga*), el besugo (*Pagellus bogaraveo*), el sargo blanco (*Diplodus sargus*) o el sargo picudo (*Diplodus puntazzo*). Todas ellas son especies relacionadas, en las que se pueden aplicar, con pequeñas modificaciones, los conocimientos adquiridos en la producción de la dorada, con el problema subyacente de la competencia entre ellas (Basurco y Abellán, 1999; Abellán, 2006).

1.3.1. Nomenclatura y morfología.

El sargo picudo (*Diplodus puntazzo*, Cetti 1777 = *Puntazzo puntazzo*, Gmelin 1789), también denominado localmente morruda o cántara, pertenece a la familia de los espáridos. Su característica más patente es una cabeza con perfil cóncavo con un hocico puntiagudo y saliente, boca pequeña con ocho incisivos prominentes en la parte frontal de las mandíbulas y una sola fila de molares, sin colmillos. Ojos de tamaño mediano. Cuerpo alto, oval y comprimido, de hasta 60 cm de longitud. Coloración gris plateada, con unas 6 a 8 bandas transversales no completas, negras y estrechas, entre las que se pueden observar otras más estrechas y menos marcadas. También presenta un anillo en el pedúnculo caudal, una ancha banda negruzca en la frente, una ancha banda negra en la base de las aletas pectorales y en las aletas caudal, anal y la porción blanda de la dorsal orladas de negro. Aleta dorsal alargada,

ventrales pequeñas, pectorales largas y en punta y caudal escotada (Calvín, 2006; Hernández, 2006).

1.3.2. *Distribución geográfica y hábitos alimentarios.*

El sargo picudo habita en fondos rocosos cercanos a la costa, con algas y, a veces, con praderas de *Posidonia oceánica*. Se encuentra en el Mediterráneo y en el Atlántico.

Se trata de una especie de hábitos omnívoros (Sala y Ballesteros, 1997; Mena Sellés y García García, 2002), con una dieta variada basada fundamentalmente en pequeños crustáceos, moluscos y algas. A diferencia de las especies estrictamente carnívoras, como la dorada, el sargo picudo presenta un mayor desapego de la proteína animal y una alta capacidad para la utilización de lípidos e hidratos de carbono como fuentes alternativas de energía (Hernández *et al.*, 2001a). Las poblaciones naturales de esta especie sacian una parte importante de sus necesidades proteicas con proteínas vegetales (Mena Sellés y García García, 2002), habiendo sido demostrado que contenidos de hasta el 60% de harina de soja en dietas experimentales no afectan de forma significativa a su crecimiento así como su valoración por parte del consumidor (Rondán *et al.*, 2004b; Hernández *et al.*, 2007). Además, la composición en ácidos grasos del músculo del sargo picudo, después de la sustitución, resulta satisfactoria para el consumo humano (Rondán *et al.*, 2004a).

1.3.3. *Nutrición y Comportamiento.*

Usando piensos comercialmente disponibles para espáridos, se ha comprobado que los mejores rendimientos para el sargo picudo se obtienen con piensos con una relación de alrededor de 22g de proteína por MJ de energía (Hernández *et al.*, 2001a). En experiencias previas, también se ha observado que las dietas hiperenergéticas (en las que el exceso de energía es aportado principalmente por la grasa) no son una buena opción para el sargo picudo (Hernández *et al.*, 2005). Se ha comprobado, a su vez, que esta especie es capaz de

seleccionar a partir de dietas con diferentes composiciones nutricionales, componiendo una dieta completa, en la que, no sólo es regulada la ingesta diaria de energía (que apoya los datos obtenidos sobre la demanda energética), sino también la composición nutricional de la misma, mostrando un claro patrón de selección que es defendido en diferentes condiciones experimentales (Torrejón Atienza *et al.*, 2004; Vivas *et al.*, 2006). En estos experimentos, el sargo picudo seleccionó una dieta eminentemente proteica, lo cual podría indicar la similitud en las preferencias de proteína entre especies marinas con distintos hábitos alimentarios, estableciéndose la divergencia entre especies carnívoras y omnívoras, en la capacidad de estas últimas para usar proteínas de origen vegetal y carbohidratos como fuente de energía. En un estudio reciente se ha puesto de manifiesto que el sargo picudo presenta una dotación de enzimas digestivos adecuada para la digestión de la proteína pero también con un alto potencial para digerir polisacáridos vegetales, de acuerdo con sus hábitos omnívoros (Tramati *et al.*, 2005).

Todos los autores están de acuerdo en señalar la necesidad de producir dietas específicas para el sargo picudo, aprovechando sus condición de especie omnívora. Una dieta adaptada al sargo picudo podría contener altas cantidades de carbohidratos como fuente de energía. De hecho, ha sido demostrado por Hernández *et al.* (2001a) que esta especie es capaz de alimentarse con una dieta que contenga un 40% de proteína (P) y hasta un 36% de carbohidratos (CH) sin perjudicar su crecimiento y su calidad nutricional. Por ello, estas dietas serían más baratas que las elaboradas actualmente para dorada, lubina y otras especies carnívoras.

Además, la sustitución de la harina de pescado por harina de soja no produce grandes variaciones en los perfiles lipídicos del sargo picudo, aunque sí que se detecta una pérdida en ácidos grasos n-3, que deberían ser compensados con alguna fuente rica en este tipo de ácidos grasos. En un estudio sobre la sustitución de P por CH como fuente de energía, no se produjo una modificación significativa del perfil lipídico de la especie (Rondán *et al.*, 2004b).

Por otro lado, se ha observado que la sustitución total del aceite de pescado por aceite de soja o linaza en la dieta del sargo picudo, no afecta al crecimiento ni al índice de conversión de ésta especie tras tres meses de alimentación (Piedecausa *et al.*, 2007). A pesar de que el consumo de dietas con aceites vegetales como fuente lipídica redujo los porcentajes de los principales HUFA, el 20:4n-6 (ARA), el 20:5n-3 (EPA) y el 22:6n-3 (DHA) en el músculo del animal, esta reducción fue menor de la que cabía esperar analizando la composición de las dietas, determinándose que la dieta que contenía aceite de soja era la de mejor índice de conversión económico.

Vera *et al.* (2006) pusieron de manifiesto, mediante el uso de comederos a demanda y fotocélulas, que el sargo picudo es una especie con un patrón de alimentación estrictamente diurno. Su actividad locomotora, no obstante, muestra variaciones, apuntando a que, en esta especie, la actividades alimentaria y locomotora presentan fases independientes.

Por último, desde el punto de vista del producto final, el sargo picudo es, hasta la fecha, un desconocido en los grandes mercados y se consume de forma local, en zonas donde es capturado por pescadores con caña o con artes de pesca tradicionales características de determinadas zonas, como por ejemplo sería el caso del arte de pesca de la paranza, en el Mar Menor. Estudios de palatabilidad realizados por Hernández *et al.* (2001b) han mostrado que el sargo picudo aportaba a las personas encuestadas una impresión positiva al degustarlos. No obstante, el desconocimiento que los grandes mercados tienen de ésta especie es prácticamente el mismo que, hace tan solo 10 años, se tenía de la dorada. Los esfuerzos de comercialización que se han realizado, sin embargo, han contribuido a que la dorada sea hoy una de las especies más demandada en todos los mercados españoles. Además, hay que tener en cuenta que el sargo picudo es muy apreciado en otros países mediterráneos, como Italia, donde se obtienen altos precios de venta y no se debe descartar su producción para la exportación hasta que los mercados locales acepten el producto a gran escala (Hernández, 2006).

Objetivos

Objetivo general

Profundizar en el conocimiento de las pautas que rigen el comportamiento alimentario de los peces y caracterizar el potencial metabólico y regulador de la ingesta del sargo picudo para afrontar la sustitución de aceites de pescado por aceites vegetales.

Objetivos específicos de cada trabajo experimental

Art.1.1.

1. Comprobar la capacidad del sargo picudo para ser alimentado con dietas encapsuladas.
2. Detectar posibles preferencias por el color o la posición de las cápsulas en el tanque.
3. Dilucidar la necesidad de las propiedades orosensoriales de la dieta para la regulación de la ingesta de energía así como para la selección de macronutrientes en esta especie.

Art.1.2.

Analizar la capacidad del sargo picudo para regular la ingesta de energía y macronutrientes cuando es sometido a la dilución de la proteína con dietas encapsuladas.

Art.2.1.

Investigar el efecto de la dilución de grasa y el ayuno de grasa sobre la ingesta de energía y el patrón de selección de macronutrientes encapsulados por parte del sargo picudo.

Art.2.2.

Validar la técnica de encapsulación mediante un estudio de digestibilidad.

Art.4.1.

Analizar la capacidad del sargo picudo para la discriminación de dietas completas encapsuladas que divergen en la presencia o no de grasa.

Art.4.2.

Determinar la habilidad del sargo picudo para la discriminación y selección entre dietas completas encapsuladas que difieren únicamente en la fuente de lípido.

Art.3.

Analizar el efecto de la sustitución total del aceite de pescado por aceites vegetales sobre:

1. La composición de ácidos grasos de hepatocitos y enterocitos del tracto digestivo,
2. Las actividades de desaturación/elongación de aislamientos primarios de hepatocitos y enterocitos,
3. Las actividades de β -oxidación en hepatocitos y enterocitos del sargo picudo.

Material y métodos

3.1. Diseño Experimental General.

Una vez fijadas las bases sobre las que se asienta la presente Tesis Doctoral y planteados los objetivos, se procedió al diseño de los experimentos de la misma. La Figura 5 representa este proceso, en el cual se dio gran importancia al establecimiento de una línea argumental sólida, una unidad temática que vinculase todos los trabajos y sirviera de argamasa entre los distintos temas tratados. Esta unidad es la que se quiere resaltar en esta memoria, dado el carácter individual de cada uno de los artículos que la contienen.

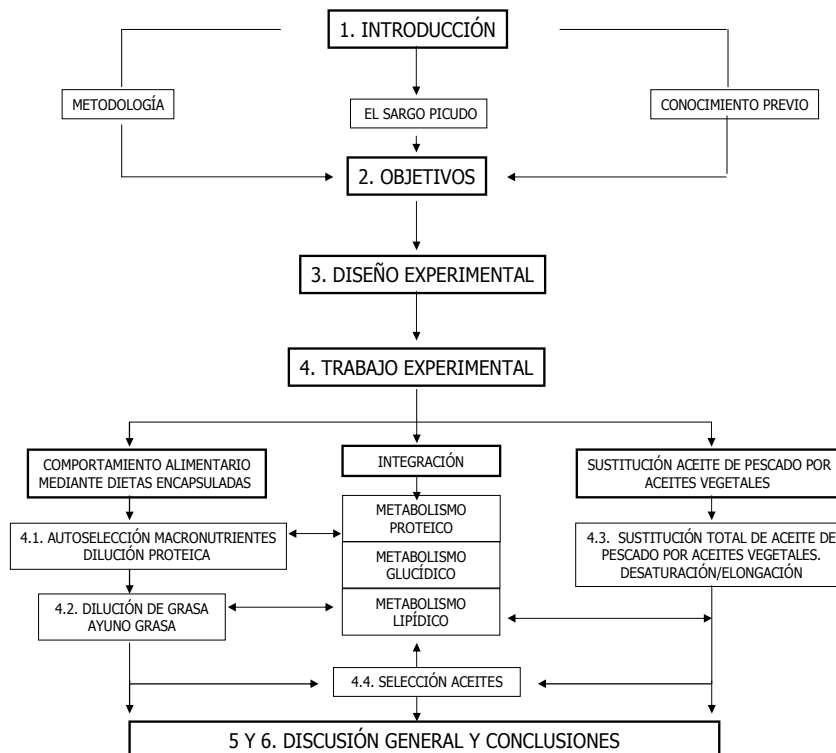


Figura 5. Unidad temática de la presente tesis.

Desde un principio se quiso destacar el porqué de la elección del sargo picudo como especie para el estudio del comportamiento alimentario y el metabolismo lipídico, situando la Tesis en el contexto biológico en el que se desarrollan los experimentos que se describen a continuación (Apartado 1.2.).

En los **Artículos 1, 2 y 4** se profundiza en el estudio de los mecanismos implicados en la selección de macronutrientes en el sargo picudo. Para ello, se utiliza la metodología descrita anteriormente por Rubio *et al.* (2003), consistente en el empleo de dietas empaquetadas en cápsulas de gelatina. Estos trabajos continúan con la línea abierta por nuestro grupo de investigación acerca de la utilización de sistemas de alimentación a demanda y vienen a ampliar el conocimiento de los procesos participantes en la regulación de la ingesta en peces. En un primer paso (Artículo 1, primera parte) se constata al sargo picudo como un buen modelo para utilizar esta técnica y, a continuación, se pone de manifiesto su capacidad para seleccionar, a partir de dietas de macronutrientes puros, y componer una dieta completa y equilibrada, adaptada a sus necesidades fisiológicas (Artículo 1). A partir de ahí, se puso a prueba la consistencia de la selección mediante la realización de experimentos de dilución y ayuno selectivos de aquellos macronutrientes cuya regulación parece ser la más importante en peces, la proteína y la grasa (Artículos 1 y 2). Con la información aportada por estos trabajos, se podía caracterizar la capacidad del sargo picudo para compensar el déficit parcial o total de un macronutriente y, de este modo, poder inferir la importancia relativa de cada uno de ellos, siempre asociando los resultados obtenidos con los hábitos alimentarios propios de la especie.

En un trabajo aún no publicado, se quiso estudiar hasta qué punto las propiedades orosensoriales del alimento influyen en la selección de dietas completas en las que se usan distintos aceites como fuente de grasa. De este modo, se ampliaban las posibilidades de la técnica de encapsulación, a la vez que se profundizaba en los niveles de actuación de los mecanismos implicados en la regulación de la ingesta en peces. La discriminación entre dietas completas que sólo divergían en la composición de la fuente de grasa utilizada, sería únicamente posible si ésta se producía a nivel de los componentes de la grasa, es decir, de los ácidos grasos (Artículo 4).

El procedimiento a seguir en todos estos protocolos experimentales fue similar. Los animales eran alimentados una vez al día a saciedad. Para ello, las cápsulas eran dispuestas durante treinta minutos en comederos flotantes situados en los tanques. Transcurrido ese tiempo, las cápsulas no consumidas eran retiradas con un salabre y contabilizadas. Cuando se

utilizaban en un mismo tanque diferentes tipos de dietas encapsuladas, con diferentes colores, se usaba siempre el mismo número de cada una de ellas, número que correspondía a la máxima ingesta alcanzada por el animal. La ingesta de los peces era controlada a diario y el número de cápsulas que se les ofrecía variaba en función de esas ingestas máximas, permitiendo al animal ingerir un solo tipo de cápsulas para suplir sus demandas.

Dado que las distintas dietas encapsuladas poseían las mismas propiedades organolépticas, éstas fueron codificadas mediante el color de la pared de las cápsulas. Se establecía una misma relación color-dieta para cada tanque y se mantenía a lo largo de todo el experimento para ese tanque (a excepción de la fase 5 del primer experimento del Artículo 1). Sin embargo, esa relación se variaba entre tanques para eliminar posibles preferencias innatas por el color de las cápsulas.

El posible efecto de la posición de las cápsulas en el tanque sobre la selección fue analizada en el Artículo 1 y, al comprobarse que ésta no interfería en dicho proceso, las cápsulas fueron dispuestas todas juntas en un mismo flotador en los siguientes experimentos con dietas encapsuladas (segundo experimento del Artículo 1 y Artículo 2), salvo en el trabajo de selección de aceites (Artículo 4), donde se usaron pares de dietas completas encapsuladas, localizadas en sendos flotadores.

Con el fin de validar la técnica de encapsulación como técnica eficaz para llevar a cabo los estudios de auto-selección en peces, era necesario realizar un estudio de digestibilidad de las dietas encapsuladas en comparación con la de las dietas granuladas, al mismo tiempo que dilucidar si la gelatina de la pared de las cápsulas constituía una fuente útil de proteína para los peces. Para ello, se utilizó una dieta comercial para dorada (*Skretting D2 Excel*), que era presentada a los peces en forma granulada o encapsulada (2 grupos experimentales). Al igual que se hacía en los experimentos anteriores, las cápsulas eran dispuestas en los tanques en comederos flotantes durante treinta minutos a saciedad y, transcurrido ese tiempo, eran retiradas. Se usaron tanques dotados de sistemas de válvulas que permitían la recogida diaria

de las heces. Los piensos utilizados así como las heces recolectadas fueron analizadas tal y como se describe en el Artículo 2 (segunda parte) de la presente Tesis.

En el **Artículo 3** se describe la metodología a través de la cual se estudió el metabolismo del sargo picudo en lo que respecta a la utilización de los lípidos de la dieta. Los peces fueron alimentados tres veces al día a saciedad, los siete días de la semana, con una de las tres dietas completas granuladas (grupo FO: alimentado con dieta con aceite de pescado; grupo LNO: con dieta con aceite de linaza; grupo SO: con dieta con aceite de soja). Al cabo de nueve meses de alimentación, un total de catorce animales fueron sacrificados y tomadas las muestras correspondientes. Se obtuvieron aislamientos primarios de hepatocitos y enterocitos, del hígado y el tracto digestivo de los animales, los cuales fueron divididos en tres grupos (control: no radiactivo; LNA: incubado con el isótopo radiactivo [1-¹⁴C]linolénico; LA: incubado con el isótopo radiactivo [1-¹⁴C]linoleico), que fueron sometidos a la extracción del lípido total y, a partir de éste, a técnicas de cromatografía y seguimiento de las actividades enzimáticas implicadas en la elongación y desaturación de las cadenas alifáticas de los ácidos grasos:

1. *Muestras no radiactivas*

- Trans-esterificación del lípido total de muestras no radiactivas para la obtención de metil-ésteres de ácidos grasos (FAME) para su identificación y relativización por cromatografía de gases.

2. *Muestras radiactivas*

- Obtención de FAMEs de lípido radiactivo y separación mediante Cromatografía de Capa Fina impregnada con nitrato de plata (AgNO₃-TLC).
- Identificación de los ácidos grasos radiactivos mediante la incubación de la AgNO₃-TLC con una película sensible y escaneado con un sistema de análisis de imagen calibrado para la emisión del ¹⁴C (Personal Molecular Imagen FX, Biorad, Madrid, Spain).

- Determinación de las actividades de β -oxidación de hepatocitos y enterocitos.

De este modo, se trató de detectar preferencias del animal por un tipo de aceite en la dieta y, además, conocer cómo ese aceite (su composición) afecta a los enzimas responsables de su metabolismo (desaturasas y elongasas). A través de estos trabajos, de auto-selección y metabólicos, es posible responder a las preguntas sobre qué “prefiere” comer el pez, cuánto y cómo la composición de ese alimento afecta al metabolismo del animal y, por lo tanto, cuánto se está forzando su maquinaria enzimática.

Finalmente, en la Discusión General de la presente Tesis Doctoral, los resultados obtenidos de estos trabajos son discutidos dentro de la unidad temática establecida y extraídas las principales conclusiones.

3.2. Instalaciones.

Para la realización de los experimentos que componen la presente Tesis Doctoral, fueron usados los Laboratorios de Crononutrición de Peces del Departamento de Fisiología, U.D. Fisiología Animal, situado en la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia, así como los Laboratorios del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (IMIDA) de San Pedro del Pinatar, Murcia.



(a)



(b)

Figura 6. Laboratorios empleados para llevar a cabo los experimentos que componen la presente Tesis Doctoral: (a) Departamento de Fisiología de la Universidad de Murcia y (b) IMIDA San Pedro del Pinatar.

En los Laboratorios de Crononutrición de la Universidad de Murcia, se utilizó una instalación consistente en tres líneas de quince acuarios de 60-l de capacidad cada una, ubicados en un circuito cerrado de agua marina sintética. Cada línea es independiente del resto, dotada con sistemas de filtración física (perlón + foam), química (carbón activo) y biológica (biobolas + sustrato de microorganismos), lámpara ultravioleta, *skimmer* y sistemas de aireación e iluminación individuales, basados en la existencia de soplantes y lámparas temporizadas para cada acuario. Los parámetros físico-químicos del agua eran mantenidos dentro de un rango de valores constante. La temperatura del agua fue mantenida mediante la

utilización de aire acondicionado en la sala y refrigeradores asociados a los tanques reservorios (Figura 6a).

Los laboratorios del IMIDA de San Pedro del Pinatar utilizados consisten en hileras de tanques troncocónicos ubicados en un circuito cerrado con renovación de agua marina (Figura 6b y 7). Estos tanques formaban parte de un sistema de recirculación dotado con filtros biológicos, lámparas ultravioletas y un termostato para mantener una temperatura constante a lo largo de todo el experimento. El flujo de agua era regulado de forma constante para mantener unos niveles de saturación de oxígeno disuelto del 70%. Los animales eran mantenidos con el fotoperiodo natural a temperatura constante.



(a)



(b)

Figura 7. Fotografías del laboratorio del IMIDA de San Pedro del Pinatar donde fueron realizados los experimentos de digestibilidad, selección de dietas completas encapsuladas, con diferente composición lipídica, y de sustitución de aceites un tanque mostrando: (a) tanques en los que fue realizado el trabajo de digestibilidad y (b) válvulas del sistema de decantación con el que estaban dotados los tanques.

Para los experimentos de selección de dietas encapsuladas, fueron usados tanques de 70-l donde los peces eran mantenidos de forma individual. Por su parte, los experimentos de digestibilidad y alimentación con dietas completas granuladas con diferente fuente de grasa, se realizaron en tanques de 360-l de capacidad con grupos de animales. Los tanques eran provistos de flotadores para localizar las cápsulas (Figura 8).

3.3. Animales empleados.

Todos los experimentos fueron realizados con sargos picudos procedentes del criadero de Valle Ca Zuliani Societa Agrícola S.R.L. (Pila di porto Tolle, Italia) y mantenidos en las instalaciones del IMIDA de San Pedro del Pinatar.

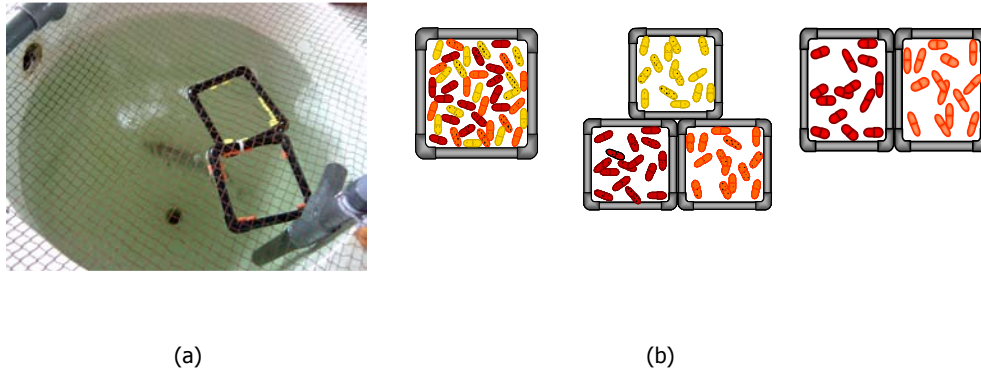


Figura 8. Fotografía de un tanque mostrando: (a) los comederos flotantes donde se situaba el alimento encapsulado; (b) dibujo que muestra las diferentes modalidades en las que las cápsulas eran presentadas a los peces según el experimento: en un solo flotador, en un triple comedero flotante o en dos.

3.4. Elaboración de dietas

En los experimentos de selección de dietas encapsuladas se utilizaron, dependiendo de la fase experimental, una dieta completa granulada, una dieta completa encapsulada y dietas de macronutrientes puros encapsulados, con las modificaciones relativas a los diferentes experimentos (dilución proteica, dilución grasa, ayuno grasa, selección entre dietas completas con diferente composición lipídica). En todos los experimentos, salvo en el de digestibilidad, se emplearon los mismos ingredientes para elaborar las dietas y se hicieron análisis de composición de macronutrientes, representados tal y como se muestra en la Tabla 2. Como fuente proteica se utilizaron caseína libre de vitaminas y gelatina (5:1) y, como fuente de grasa, aceite de hígado de bacalao y aceite de soja (3:1), los cuales se incluían en una matriz de sílice coloidal con el objetivo de obtener una grasa sólida fácil de encapsular. La fuente de carbohidratos utilizada fue la dextrina. Todas las dietas contenían suplementos vitamínicos y

minerales adecuados para la especie. En las dietas completas granuladas, se utilizaron la celulosa y el alginato sódico como aglutinante. Para la dilución del contenido de proteína se usó celulosa y para la dilución de la grasa, se aumentó la proporción de dióxido de sílice.

Tabla 2. Ingredientes y composición de las cápsulas por análisis aproximado de macronutrientes (n=4).

	CD	P	F	CH
<i>Ingredientes del contenido de las cápsulas (g kg⁻¹ peso seco)</i>				
Caseína	430	783	-	-
Gelatina	90	157	-	-
Aceite hígado bacalao	158	-	705	-
Aceite soja	52	-	235	-
Dextrina	210	-	-	940
Vitaminas y minerales	20	20	20	20
CaCO ₃ /CaPO ₄	40	40	40	40
<i>Análisis aproximado de las cápsulas (% materia seca)</i>				
Materia seca	90,1	91,2	97,9	88,5
Proteína bruta	57,9	91,9	19,9	18,3
Extracto de éter	11,5	1,8	55,0	1,3
NFE	24,2	0,6	1,7	74,7
Cenizas	6,4	5,7	21,3	5,7
Energía bruta (kJ g ⁻¹)*	23,7	22,2	35,6	17,6

CD: Dieta Completa; P: proteína; F: grasa; CH: carbohidratos; NFE: Extracto Libre de Nitrógeno.

*Calculado a partir de las medias de los porcentajes de macronutrientes usando los siguientes coeficientes de energía: 23,6 kJ g⁻¹ para P; 38,9 kJ g⁻¹ para F; y 16,7 kJ g⁻¹ para CH (Miglavys y Jobling, 1989)

Las dietas encapsuladas fueron realizadas por rellenado de cápsulas de gelatina dura de 0,2 ml de volumen, nº 4, (Roig Farma, Barcelona), con el polvo correspondiente a las diferentes dietas experimentales, usando para ello una máquina encapsuladora semi-automática (Tecnyfarma, Miranda de Ebro). Las cápsulas proporcionadas a un tanque dado eran almacenadas refrigeradas en una misma bolsa para evitar cualquier efecto de posibles contaminantes externos en la selección.

Para el experimento de digestibilidad se empleó una dieta comercial (Skretting D2 Excel) para dorada.

Para el experimento de sustitución del aceite de pescado por aceites vegetales, se elaboraron dietas completas isoenergéticas, con un contenido lipídico del 20%, variando entre ellas la fuente de lípido (aceite de hígado de bacalao: dieta FO; aceite de soja: dieta SO y aceite de linaza; dieta LO). Para obtener la composición deseada se usó harina de pescado, harina de trigo, gluten de trigo y una mezcla de vitaminas y minerales apropiada para la especie. Los ingredientes fueron mezclados y las dietas granuladas por extrusión.

3.5. Análisis de las dietas

El análisis de la composición en macronutrientes de las dietas, se realizó mediante los siguientes procedimientos: la humedad fue determinada mediante desecación de las muestras a 110°C durante 24 h hasta peso constante; la proteína cruda fue calculada por el método de Kjeldahl, utilizando el factor 6,25 para la conversión de nitrógeno en proteína; la grasa cruda se obtuvo por extracción con dietil éter; las cenizas por incineración a 450°C durante 24 h hasta peso constante y el porcentaje de extracto libre de nitrógeno (NFE) fue calculado por sustracción de la suma de los porcentajes de proteína cruda, grasa cruda y cenizas.

A causa de la naturaleza proteica de las cápsulas, una vez que están rellenas, aproximadamente el 18-20% de su composición, expresada como materia seca, se corresponde con la proteína procedente de su pared (Tabla 2).

El contenido energético de las dietas fue calculado a partir del porcentaje medio de macronutrientes, utilizando los siguientes coeficientes de energía: 23,6 kJ/g para proteína, 38,9 kJ/g para grasa y 16,7 kJ/g para carbohidratos (Miglavs y Jobling, 1989).

Trabajo experimental

Las páginas 63-71 de esta Tesis Doctoral se corresponden con el trabajo “Almáida-Pagán, P.F., Rubio, V.C., Mendiola, P., de Costa, J., Madrid, J.A., 2006. Macronutrient selection through post-ingestive signals in sharpnose seabream fed on gelatin capsules and challenged with protein dilution. *Physiol. Behav.* **88**, 550—558.”, que se encuentra publicado en la revista *Physiology and Behavior* y al cual se puede acceder *on line* a través del enlace:

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TOP-4KBVVG-1&_user=1595293&_coverDate=07%2F30%2F2006&_alid=1329181752&_rdoc=3&_fmt=high&_orig=search&_cdi=4868&_sort=r&_st=4&_docanchor=&_ct=3&_acct=C000053930&_version=1&_urlVersion=0&_userid=1595293&md5=9ef91bbe687226005aecf9572f052507

Las páginas 73-79 de esta Tesis Doctoral se corresponden con el trabajo “Almáida-Pagán, P.F., Seco-Rovira, V., Hernández, M.D., Madrid, J.A., de Costa, J., Mendiola, P., 2008. Energy intake and macronutrient selection in sharpnout seabream (*Diplodus puntazzo*) challenged with fat dilution and fat deprivation using encapsulated diets. *Physiol. Behav.* 93, 474-480.”, que se encuentra publicado en la revista *Physiology and Behavior* y al cual se puede acceder *on line* a través del enlace:

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TOP-4PWF0S7-1&_user=1595293&_coverDate=02%2F27%2F2008&_alid=1329181752&_rdoc=2&_fmt=high&_orig=search&_cdi=4868&_sort=r&_st=4&_docanchor=&_ct=3&_acct=C000053930&_version=1&_urlVersion=0&_userid=1595293&md5=dffae0a1fd96530cf91a14ab224b1646

Las páginas 81-90 de esta Tesis Doctoral se corresponden con el trabajo “Almáida-Pagán, P.F., Hernández, M.D., García García, B., Madrid, J.A., de Costa, J., Mendiola, P., 2007. Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils on n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid desaturation and elongation in sharpnout seabream (*Diplodus puntazzo*) hepatocytes and enterocytes. *Aquaculture* 272, 589—598.”, que se encuentra publicado en la revista *Aquaculture* y al cual se puede acceder *on line* a través del enlace:

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T4D-4PD4XB7-2&_user=1595293&_coverDate=11%2F26%2F2007&_alid=1329181752&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_cdi=4972&_sort=r&_st=4&_docanchor=&_ct=3&_acct=C000053930&_version=1&_urlVersion=0&_userid=1595293&md5=c42b36b75e7d046b2e09ec7f47fb844a

**SHARPSNOUT SEABREAM (*Diplodus puntazzo*) ABILITY FOR DIFFERENT OIL SOURCES
DISCRIMINATION USING ENCAPSULATED COMPLETE DIETS.**

P.F. Almaida-Pagán^{a,*}, M.D. Hernández^b, J.A. Madrid^a, J. De Costa^a & P. Mendiola^a.

^aDepartment of Physiology. Faculty of Biology. University of Murcia. 30100 Murcia, Spain.

^bIMIDA-Acuicultura, Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia, Apdo.65.30740, San Pedro del Pinatar, Murcia, Spain.

* Corresponding author:

Present address: Department of Physiology.

Faculty of Biology, University of Murcia.

Campus de Espinardo, 30100 - Murcia.

Spain.

Phone: + 34-968-364 931

Fax: + 34-968-363 963

E-mail: almaida@um.es

Running title: Selection of encapsulated complete diets with different oils by sharpsnout seabream.

Abstract.

Sharpsnout seabream ability for different oil sources discrimination was studied using gelatine capsules containing complete diets, only differing in the origin of their fat content. Twelve fish with an initial body weight of 330.8 ± 45.0 g (mean \pm SD) were challenged to an experiment in three experimental phases. In Phase 1 (Control, 29 days) fish were offered two colours of capsules containing the same complete diet (CD) and placed separately. After that, capsules content was changed and fish were fed with the two capsules colours containing an encapsulated complete diet with fish oil (FCD) and the same diet with cellulose substituting lipid content (NFD), respectively (Phase 2, 32 days). Finally, in Phase 3, fish were divided in two experimental groups, seven fish were fed on FCD diet plus the complete diet with linseed oil (LNCD) and five animals on FCD diet plus soybean oil (SCD) during 28 days. Obtained results showed sharpsnout seabream capacity for FCD and NFD discrimination. In Phase 2, sharpsnout seabream increased their FCD capsules intake until reach a percentage of 66.8%, changing their ingestion pattern with respect to Phase 1. During Phase 3 fish did not show any significant preference for any of the experimental diets, showing similar intake percentages for fish oil diet (FCD) and the vegetable oils ones (LNCD and SCD). Summarizing, fish were able to discriminate when fat was absent from diet without using orosensorial information, associating the colour of capsules with their post-ingestive and/or post-absorptive repercussions. With vegetable oils diets (Phase 3), fish did not reject these alternative lipid sources, showing similar intake percentages to those of FCD.

Keywords: sharpsnout seabream, fish, self-selection, gelatine capsules, post-ingestive mechanisms, associative learning, vegetable oils, complete diets discrimination.

1. Introduction.

Sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*, Cetti 1777) is a promising species for broadening the Mediterranean aquaculture. Previous studies have shown this sparid qualities to be cultured as an alternative to gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), the two most commonly farmed species in this region [1]. The sharpsnout seabream omnivorous feeding habits [2,3], so as their lower protein dependence and greater acceptance of vegetable proteins than carnivorous species [4] make them too an interesting model to study the different mechanisms implied in food intake regulation.

Several works on fish self-feeding have been performed using self-feeders with granulated diets [5-10] or encapsulated foods [11-16]. These protocols have shown that fish are capable to defend a complete and balanced diet, perfectly matched to their physiological demands and nutritional habits (carnivorous or omnivorous), when they are fed with pure and separated macronutrients diets. Studies with encapsulated foods have demonstrated that oropharyngeal information from food is not an essential factor for that regulation to occurs. Moreover, by means of self-selection methodologies, fish preferences by different food sources can be known and then characterizing fish ability to use different macronutrients.

In spite of their omnivorous habits, sharpsnout seabream show a high preference by protein (62.7% protein, 21.3% carbohydrate and 16.0% fat) with a very strong ability to sustain their level intake [10,11], only differing with carnivorous fish in sharpsnout seabream ability to utilize vegetable origin proteins so as their ability to use carbohydrate as an energy source [17].

Moreover, in a recent study, it has been demonstrated that sharpsnout seabream is capable to maintain energy intake so as macronutrient selection pattern with very low fat quantities and, only when fat is totally deprived, fish respond increasing protein and carbohydrate intake [12].

Encapsulation methodology can provide an important information in relation to current search of vegetable alternatives to fish oils for farmed fish diets, one of the most important challenges for aquaculture to be sustainable [18].

Using encapsulated diets, it is possible to avoid the interference of substances rejected by fish due to their palatability and analyze fish ability to discriminate and select among diets

containing fish oil (FCD) and fat deprived diet (NFD) or different plant oils: soybean oil (SCD) and linseed oil (LNCD).

In previous studies performed in rainbow trout with pelleted diets [19,20], it was demonstrated fish ability for distinguishing a diet containing fish oil from a diet containing a plant oil. Rainbow trout have a general preference for the fish oil diet and from the three vegetable oils tested, linseed oil was the most avoided, followed by sunflower oil and rapeseed oil. Thus, with sea bass, Luz *et al.* demonstrated this species capacity to get this discrimination, being soybean and rapeseed oils the most selected vegetable oils [21]. However, in these studies conducted with pelleted diets is not possible to exclude diets sensorial characteristics interference and further works are necessary.

The main aims of present study were firstly to analyze sharpsnout seabream ability for distinguishing between fish oil and fat deprived diets (FCD vs. NFD), associating the colour of the capsules to the nutritive value of their content. The other objective was to study fish ability for different origin oils discrimination using encapsulated complete diets in order to avoid food orosensorial characteristics interference. This methodology let us to study fish self-selection based in nutritional utilization of the diets and connect behavioural works with those involved in metabolic use of diet components.

2. Materials and methods.

1.4. *Animal housing.*

This experiment was carried out at the IMIDA aquaculture facilities (San Pedro del Pinatar, Murcia) on sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo* C.) hatched and raised at Valle Ca Zuliani Societa Agrícola S.R.L. (Pila di Porto Tolle, Italy). Fish were allowed to acclimatize in raceway-type open circuit seawater in 93-l tanks, feeding on commercial diet manufactured for gilthead seabream (*Skretting* D2 Excel). Afterwards, fish were located individually in 70-l cylindro-conical tanks supplied with running seawater (salinity: 37g/l; NO_2^- : <0.1 mg/l; NO_3^- : <0.1 mg/l; NH_3 : <0.5 mg/l; pH: 7.7). The tanks were equipped with a recirculating system that included biological filtration, an ultraviolet lamp, and a thermostat to ensure a constant temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$). The water flow was regulated to maintain dissolved oxygen at 70% of the saturation level. The animals were subjected to a natural photoperiod, and were allowed to consume experimental diets (Table 1) once a day, six days a week. The experiment lasted 90 days (from October to January). The fish were weighed at the beginning and at the end of the experiment.

Encapsulated diets manufacture.

Fish were allowed to acclimate to encapsulated diets, during which time they were fed a standard complete diet (CD), packaged into gelatin capsules of two different colours (yellow and orange), containing the macronutrient proportions self-selected by them in previous published experiments: 57.9% P, 24.2% CH and 11.5% F. After that, sharpsnout seabream were challenged to lipid source discrimination in three different experimental Phases in which the same proportions of macronutrients were used with the only difference of the lipid source used: fish oil and soybean oil (3:1) in CD, fish oil in FCD, no fat in NFD, soybean oil in SCD and linseed oil in LNCD (see Table 1). Vitamin-free casein and gelatin (5:1) were included as P source, and dextrin as CH source. All diets included mixtures of vitamins and minerals, as well as sodium alginate and cellulose as binder and filler, respectively.

Encapsulated diets were made by filling n^o. 4, 0.2-ml gelatin capsules (Roig Farma, S.A., Barcelona, Spain) with the respective powdered diets (CD, FCD, NFD, SCD and LNCD), using a semi-automatic encapsulator (Tecnyfarma, Miranda de Ebro, Spain). All capsules supplied to a given tank were first stored in a single bag for at least 10 days, in order to prevent the fish from distinguishing their contents based on the chemical properties of any potential external contamination.

Diet moisture was determined by drying samples for 24 h at 110°C to constant weight. Crude protein was calculated using the Kjeldahl method ($N \times 6.25\%$), crude fat by means of diethyl ether extraction, ash by heating at 450°C for 24 h, and nitrogen free extract (NFE) as the remainder of crude protein + crude fat + ash.

Experimental design.

The same twelve individually located fish, with an initial body weight of 330.8 ± 45.0 g (mean \pm SD), were subjected to three consecutive experimental phases, whole experiment lasting for 90 days, as shown in Figure 1. In Phase 1, fish were fed once a day with the same standard complete diet (CD) packaged into two different colours of capsules (yellow and orange) placed separately in two floating containers. Capsules were made available in the water from 12:00 to 12:30 h and food intake was calculated by counting the remaining uneaten capsules. This phase lasted 29 days and was designed as a control phase in which fish reached a steady energy intake. The same colour-diet relationship was maintained in a given tank throughout all the experimental phases, but this relationship was balanced between the tanks.

In Phase 2, which lasted for 32 days, fish were fed with the two colours of capsules containing a complete diet with fish oil as only lipid source (FCD) or a not fat diet (NFD), with the same protein and carbohydrates proportions but with cellulose replacing lipid proportion. This phase was a first step to analyze sharpnose seabream ability to discriminate between diets with the highest difference in lipidic composition, FCD and NFD. Finally, in Phase 3 fish were separated in two experimental groups during 28 days (Figure 1). One of them had to select

between fish oil diet (FCD) or soybean oil diet (SCD) (n=5), the other one was fed with the two colours of capsules with FCD or linseed oil diet (LNCD), respectively (n=7). It was analyzed if sharpsnout seabream were able to discriminate between encapsulated complete diets only differing in their lipidic fraction composition (fish oil vs. vegetable oils).

The fish were weighed at the beginning and at the end of the experiment.

Data analysis.

Gross energy intake (GE) was estimated using the following coefficients: 23.6 kJ/g for P, 38.9 kJ/g for F and 16.7 kJ/g for CH [22], and was expressed as kJ/100g BW/day.

Statistical differences between daily intake means from Phases 2 and 3, % FCD ingestion from Phases 1 and 2, FCD and vegetable oils diets (LNCD or SCD) intake percentages from Phase 3, were contrasted using a paired samples t-test.

Statistical analysis was performed using SPSS, version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

3. Results.

Fish challenged to an adaptation period in which they were fed with the same standard complete diet (CD) packaged in two colours of capsules (orange and yellow) placed separately (Figure 1), quickly began to increase the number of capsules intake since the very first day they were offered to them. However, after the first three weeks, daily energy intake decreased and mean values reached 5.2 ± 0.9 kJ/100 gBW (end of Phase 1) due to an accidental temperature decrease. When it was corrected, energy intake increased again and reached a mean value of 8.9 ± 2.3 kJ/100 gBW (end of Phase 2)(Figure 2).

in Phase 3, sharpnose seabream were assigned to two experimental groups in which fish oil diet (FCD) plus one of the plant oils diets, soybean oil diet (SCD) or linseed oil diet (LNCD), were provided packed separately in gelatine capsules (yellow and orange): seven fish were fed with FCD and LNCD, while other five animals were supplied with FCD and SCD (Figure 1). Daily energy intake did not significantly changed respect Phase 2, maintaining values of 11.3 ± 3.0 and 10.2 ± 5.9 kJ/100 gBW, respectively for LNCD group ($P=0.324$), and 8.9 ± 2.7 and 7.7 ± 4.4 kJ/100 gBW, respectively for SCD group ($P=0.653$) (Figures 3 and 4).

In all experimental Phases data were represented to show possible selection patterns. When fish were fed with CD (Phase 1), the selection pattern obtained was used as control to compare with the follow experimental phases. When fish could choose between fish oil complete diet (FCD) and free-fat diet (NFD) (Phase 2), they changed this previous pattern, increasing their selection percentage of FCD (in grams) until 66.8%, clearly different to that calculated from the end of Phase 1, 28.9 % FCD ($P=0.001$) (Figure 5).

Finally, in Phase 3, capsule intake patterns obtained were compared with those of the end of Phases 1 and 2 in order to analyze if selection by fish was significantly different to those of previous experimental phases. In first group (FCD vs. LNCD), fish maintained a similar selection pattern during first week but this pattern changed since the second one, showing a non significant difference between intake of two diets at the end of the experiment ($P=0.937$) (Figure 6). In second group (FCD vs. SCD), fish changed previous

pattern since the very first day, showing a non significant preference by any of two experimental diets during the last week ($P=0.056$) (Figure 7).

Fish were weighed at the beginning and at the end of experiment showing a body weight increase through the experiment (90 days) of $40.0\pm 91.6\text{g}$ (mean \pm SD).

5. Discussion.

Sharpsnout seabream are able to discriminate when fat is absent from diet (Phase 2) and they do not reject alternative to fish oil diets. When they are challenged to select between FCD and free-fat diet (NFD), fish mainly ingest FCD capsules reaching values of 66.8% (in grams). Without using orosensorial information from diets, fish are able to distinguish between a complete diet and a free-fat diet associating the colour of capsules with their post-ingestive and/or post-absorptive consequences.

It has been previously pointed in fish [11,12] that receptors in the gastrointestinal tract and associated organs may detect the energy and macronutrient content in the diet during digestion, as it has been seen in mammals [23]. These receptors would trigger signals (neural activity and active peptides) that inform to brain centers about the nutritional properties of the food, and have influence on feeding behaviour.

Encapsulation methodology was used to analyze fish ability to discriminate among complete diets made from different fat sources (Phase 3). When fish were fed with FCD capsules plus encapsulated complete diets with one of the vegetable oils (SCD or LNCD), fish reached very similar intake quantities for two colours of capsules, without mainly selecting any of two experimental diets (FCD versus SCD, FCD versus LNCD) after 28 days.

Due encapsulation avoids orosensorial properties from diets, fish self-selection by fish only can occur through post-ingestive signals, not being affected by presence of substances rejected by animals at oropharyngeal level. Present results point to post-ingestive signals for not producing discriminatory responses in sharpsnout seabream fed on fish oil diet plus one of the

plant oils diets and remarks the role played by feeds palatability in short-term selection of different oils diets by fish.

Moreover, these data could confirm the secondary role played by fat in sharpsnout seabream food intake regulation, a species with a similar protein preference to that of carnivorous [4,8]. In spite of their omnivorous habits [2,3], it has been demonstrated sharpsnout seabream inability for C_{18} fatty acids (PUFA) desaturation and/or elongation to their corresponding highly unsaturated fatty acids (HUFA) when they were challenged to total substitution of fish oil by vegetable oils in their diet [24]. This is a similar characteristic to those reported for carnivorous species like sea bass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) [25-31], which have an absolute dietary requirement for C_{20} and C_{22} HUFA, presumably due to these marine species adaptation to a carnivorous/piscivorous diet, naturally rich in n-3 and n-6 HUFA, that it would have resulted in an evolutionary down-regulation of involved enzyme activities.

On the other hand, Piedecausa et al. [32] described that sharpsnout seabream tissues reflect diet composition when fish oil is totally replaced by soybean or linseed oils and, in a previous work, it was shown this species ability for energy intake regulation and macronutrient selection with very low fat levels in diet (about 13%) [12]. Sharpsnout seabream appear for being capable to preserve their fatty acid composition with both low fat concentrations and with low HUFA levels in their diet [24]. This fact has been shown in others marine species like sea bass and haddock where HUFAs are rapidly stored in tissue membranes while C_{18} PUFA act as readily oxidative substrates [27,33].

Summarizing, these studies with encapsulated diets let us to avoid oropharyngeal chemosensitivity interferences in self-selection studies. According to this, selection patterns obtained with separate macronutrient diets would be near of representing the nutritional requirements for the animals [15] and could connect traditional behavioural works, with pelleted diets, and others about the metabolic utilization of food. When orosensorial information from diets is absent, sharpsnout seabream are able to detect fat absence from diet, selecting the fish oil complete diet (FCD) in a 66.8% (in grams). Differences between these diets produce a discriminatory response in fish, based in their capacity to associate the post-ingestive effects of

diets with the colour of capsules. However, fish challenged to different oils discrimination, do not discriminate and then fed next to 50% of their final diet in form of vegetal oil diet. All these data point to the importance of diets palatability for short-term discrimination to occurs and sharpnout seabream's capacity to supply its physiological demands in a long-term with very low fat and HUFA levels in diet.

Acknowledgements

This research was supported by grants from CICYT (AGL2004-08137-CO4-02/ACU to JA Madrid) and the "Ministerio de Educación y Ciencia (MEC)" (AP2002-1368 to P.F. Almáida-Pagán). We are also grateful to the "Centro de Recursos Marinos (IMIDA) de San Pedro del Pinatar" for kindly sharing their installations and providing the animals.

References

- [1] Caggiano, M.; Canese, S.; Lupo, A.; Cirillo, A. Experiences of artificial reproduction and larval rearing of sheepshead bream (*Diplodus puntazzo*) in the South of Italy. In: Carrillo, M., Dahle, L., Morales, J., Sorgeloos, P., Svennevig, N., Wyban, J. (Compilers). From Discovering to Commercialization. World Aquaculture '93. E.A.S. 1993. Special Publication No 19, Ghent, Belgium, p.326.
- [2] Sala, E.; Ballesteros, E. Partitioning of space and food resources by three fish of the genus *Diplodus* (*Sparidae*) in a Mediterranean rocky infralitoral ecosystem. Mar. Ecol. Prog. Ser. 1997; 152: 273-283.
- [3] Mena Sellés, C.; García García, B. Importancia de la proteína vegetal en la dieta natural de poblaciones salvajes de Sargo picudo *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777): sus implicaciones en el cultivo intensivo. *Revista AquaTIC*, 17, October 2002.
- [4] Hernández, M.D.; Martínez, F.J.; Jover, M.; García García, B. Effects of partial replacement of fish meal by soybean meal in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) diet. *Aquaculture* 2007; 263: 159-167.
- [5] Aranda A, Sánchez-Vázquez FJ, Zamora S, Madrid JA. Self-design of diets by means of self-feeders: validation of procedures. *J Physiol Biochem* 2000;56:55–166.
- [6] Aranda, A.; Sánchez-Vázquez, F.J.; Madrid, J.A. Effect of short-term fasting on macronutrient self-selection in sea bass. *Physiol. Behav.* 2001; 73:105-9.
- [7] Sánchez-Vázquez, F.J.; Yamamoto, T.; Akiyama, T.; Madrid, J.A.; Tabata, M. Selection of macronutrients by goldfish operating self-feeders. *Physiol. Behav.* 1998; 65:211-8.
- [8] Sánchez-Vázquez, F.J.; Yamamoto, T.; Akiyama, T.; Madrid, J.A.; Tabata, M. Macronutrient self-selection through demand-feeders in rainbow trout. *Physiol. Behav.* 1999; 66:45-51.
- [9] Torrejón Atienza, M.; Chatzifotis, S.; Divanach, P. Macronutrient selection by sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Aquaculture* 2004; 232: 481-491.

- [10] Vivas, M.; Rubio, V.C.; Sánchez-Vázquez, F.J.; Mena, C.; García García, B.; Madrid, J.A. Dietary self-selection in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) fed paired macronutrient feeds and challenged with protein dilution. *Aquaculture* 2006;251:430-7.
- [11] Almáida-Pagán, P.F.; Rubio, V.C.; Mendiola, P.; De Costa, J.; Madrid, J.A. Macronutrient selection through post-ingestive signals in sharpsnout seabream fed gelatine capsules and challenged with protein dilution. *Physiol. Behav.* 2006; 88: 550-558.
- [12] Almáida-Pagán, P.F.; Seco-Rovira, V.; Hernández, M.D.; Madrid, J.A.; de Costa, J.; Mendiola, P. Energy intake and macronutrient selection in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) challenged with fat dilution and fat deprivation using encapsulated diets. *Physiol. Behav.* doi: 10.1016/j.physbeh.2007.10.006.
- [13] Rubio, V.C.; Sánchez-Vázquez, F.J.; Madrid, J.A. Macronutrient selection through postingestive signals in sea bass fed on gelatine capsules. *Physiol. Behav.* 2003; 78:795-803.
- [14] Rubio, V.C.; Vivas, M.; Sánchez-Mut, A., Sánchez-Vázquez, F.J.; Covés, D.; Dutto, G.; Madrid, J.A. Self-feeding of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) under laboratory and farming conditions using a string sensor. *Aquaculture* 2004; 213: 393-403.
- [15] Rubio, V.C.; Sánchez-Vázquez, F.J.; Madrid, J.A. Fish macronutrient selection postingestive signals: effect of selective macronutrient deprivation. *Physiol. Behav.* 2005;84:651-7.
- [16] Rubio, V.C.; Sánchez-Vázquez, F.J.; Madrid, J.A. Influence of nutrient preload on encapsulated macronutrient selection in European sea bass. *Physiol. Behav.* 2006;89:662-669.
- [17] Hernández, M.D.; Egea, M.A.; Rueda, F.M.; Aguado, F.; Martínez, F.J.; García, B. Effects of commercial diets with different P/E ratios on sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) growth and nutrient utilization. *Aquaculture* 2001; 195:321-9.
- [18] Sargent, J.R.; Tacon, A.G.J. Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *Proc. Nutr. Soc.* 1999;58: 377–383.
- [19] Geurden, I., Cuvier, A., Gondouin, E., Olsen, R.E., Ruohonen, K., Kaushik, S., Boujard. Rainbow trout can discriminate between feeds with different oil sources. *Physiol. Behav.* 2005; 85: 107-114.

- [20] Geurden, I., Corraze, G., Boujard, T. Self-feeding behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, offered diets with distinct feed oils. *Applied Animal Behaviour Science*, doi:10.1016/j.applanim.2006.12.006.
- [21] Luz, R.K.; Boluda-Navarro, D.; Sánchez-Vázquez, F.J.; Portella, M.C.; Zamora, S.; Madrid, J.A. Selection of diets made of different plant oils in adults and juveniles European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, L. *Aquaculture Europe´04—Biotechnology for Quality*, 20-23 October, Barcelona, Spain. Extended abstracts and short communications. Special publication N° 34; pp. 512-513.
- [22] Miglavs, I.; Jobling, M. The effects of feeding regime on proximate body composition and patterns of energy deposition in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *J. Fish Biol.* 1989; 35: 1-11.
- [23] Badman, M.K.; Flier, J.S. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science* 2005; 307:1909–14.
- [24] Almailda-Pagán, P.F.; Hernández, M.D.; García García, B.; Madrid, J.A.; de Costa, J.; Mendiola, P. Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils on n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid desaturation and elongation in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) hepatocytes and enterocytes. *Aquaculture*, doi:10.1016/j.aquaculture.2007.08.017.
- [25] Buzzi, M., Henderson, R.J., Sargent, J.R. The biosynthesis of docosahexaenoic acid [22:6 (n-3)] from linolenic acid in primary hepatocytes isolated from wild northern pike. *J. Fish Biol.* 1997;51: 1197–1208.
- [26] Izquierdo, M.S., Montero, D., Robaina, L., Caballero, MJ, Rosenlund, G, Gine´s, R. Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture*. 2005;250: 431– 444.
- [27] Mourente, G., Dick, J.R., Bell, J.G., Tocher, D.R. Effect of partial substitution of dietary fish oil by vegetable oils on desaturation and β -oxidation of [1-14C]18:3n-3 (LNA) and [1-14C]20:5n-3 (EPA) in hepatocytes and enterocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 2005;248: 173–186.

- [28] Mourente, G., Tocher, D.R. In vivo metabolism of [1-14C] linolenic acid (18:3n-3) and [1-14C] eicosapentaenoic acid (20:5n-3) in a marine fish: time course of the desaturation/elongation pathway. *Biochim. Biophys. Acta*, 1994;1212: 109–118.
- [29] Rodríguez, C., Pérez, J.A., Henderson, J. The esterification of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids by hepatocytes and liver microsomes of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comp. Biochem. Physiol. B*, 2002;132: 559–570.
- [30] Sargent, J.R., Henderson, R.J., Tocher, D.R. The lipids. In: Halver, J., Hardy, E. (Eds.), *Fish Nutrition*. Academic Press, Elsevier, San Diego, California, USA, 2002; pp. 181–257.
- [31] Sargent, J.R., Tacon, A.G.J. Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *Proc. Nutr. Soc.*, 1999;58: 377–383.
- [32] Piedecausa, M.A.; Mazón, M.J.; García García, B.; Hernández, M.D. Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) diets. *Aquaculture* 2006; 263: 211-219.
- [33] Nanton, D.A., Lall, S.P., Ross, N.W., McNiven, M.A. Effect of dietary lipid level on fatty acid β -oxidation and lipid composition in various tissues of haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 2003;135: 95–108.

Figure legends

Figure 1. Schematic drawing of the different experimental phases, according to the main objectives and feeding conditions. The same fish were subjected to the different experimental phases. Each Phase lasted the time necessary for the fish to reach a steady energy intake and diets selection pattern, also considering the discomfort of the treatment for the animals. In all of them, two colours of capsules (yellow and orange) were provided separately in two floating containers. Phase 1 (29 days): adaptation to encapsulated complete diet (CD) to obtain daily energy intake and possible capsule colour preferences. Phase 2 (FCD vs. NFD, 32 days): sharpshout seabream ability to discriminate between the diets with the highest difference in lipidic composition. Phase 3 (FCD vs. Vegetable oils diets, 28 days): fish capacity to different oil sources discrimination.

Figure 2. Average daily energy intake (kJ/100 gBW) of sharpshout seabream fed two colours of capsules placed separately in two floating containers and containing both the same standard complete diet (CD vs. CD, Phase 1) or fish oil complete diet versus free-fat diet (FCD vs. NFD, Phase 2). Values represent the mean \pm S.E.M of 12 fish. Horizontal arrows represent temperature values throughout the experimental phases.

Figure 3. Average daily energy intake (kJ/100 gBW) of sharpshout seabream fed two colours of capsules containing fish oil diet (FCD) versus free-fat diet (NFD) (Phase 2) or FCD versus linseed oil diet (LNCD) (Phase 3). Values represent the mean \pm S.E.M of 12 fish in Phase 2 and 7 fish in Phase 3.

Figure 4. Average daily energy intake (kJ/100 gBW) of sharpshout seabream fed two colours of capsules containing fish oil diet (FCD) versus free-fat diet (NFD) (Phase 2) or FCD versus soybean oil diet (SCD) (Phase 3). Values represent the mean \pm S.E.M of 12 fish in Phase 2 and 5 fish in Phase 3.

Figure 5. Food intake expressed as percentage of weight in grams for sharpsnout seabream fed two colours of capsules containing both a standard complete diet (Phase 1) or fish oil complete diet (FCD) versus free-fat diet (NFD) (Phase 2). Horizontal lines represent each diet intake means for the corresponding days (indicated by their length). Values represent the mean \pm S.E.M of 12 fish.

Figure 6. Food intake expressed as percentage of weight in grams for sharpsnout seabream fed two colours of capsules containing both a standard complete diet (Phase 1), fish oil complete diet (FCD) versus free-fat diet (NFD) (Phase 2) or FCD versus linseed oil diet (LNCD) (Phase 3). Values represent the mean \pm S.E.M of 12 fish from the last week of Phase 1 and 2 as controls; and the mean \pm S.E.M of 7 fish throughout entire Phase 3. Horizontal lines represent each diet intake means for the corresponding days (indicated by their length).

Figure 7. Food intake expressed as percentage of weight in grams for sharpsnout seabream fed two colours of capsules containing both a standard complete diet (Phase 1), fish oil complete diet (FCD) versus free-fat diet (NFD) (Phase 2) or FCD versus soybean oil diet (SCD) (Phase 3). Values represent the mean \pm S.E.M of 12 fish from the last week of Phase 1 and 2 as controls; and the mean \pm S.E.M of 5 fish throughout entire Phase 3. Horizontal lines represent each diet intake means for the corresponding days (indicated by their length).

Table 1. Ingredients and capsule composition by proximate analysis (n=3).

	CD	FCD	LNCD	SCD	NFD
<i>Capsule content ingredients (g kg⁻¹ dry weight)</i>					
Casein	391.4	391.4	391.4	391.4	391.4
Gelatin	78.3	78.3	78.3	78.3	78.3
Cod liver oil	104.1	138.8	—	—	—
Soybean oil	34.7	—	—	138.8	—
Linseed oil	—	—	138.8	—	—
Dextrin	130.5	130.5	130.5	130.5	130.5
Minerals y Vitamins	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Cellulose	155.0	155.0	155.0	155.0	293.8
Sodium alginate	46.0	46.0	46.0	46.0	46.0
CaCO ₃ /CaPO ₄	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
<i>Proximate analysis of the capsules (% dry matter)</i>					
Dry matter	90.1	91.3	89.9	88.5	92.1
Gross protein	57.9	55.6	58.9	56.2	57.5
Ether extract	11.5	12.7	12.6	13.3	1.1
NFE	24.2	26.3	22.9	24.4	35.6
Ash	6.4	5.4	5.6	6.1	5.8
Gross energy (kJ g ⁻¹) *	22.2	22.5	22.6	22.5	19.9

CD: Standard complete diet; FCD: Fish oil complete diet; LNCD: linseed oil complete diet; SCD: Soybean oil complete diet; NFD: No fat complete diet; NFE: Nitrogen-free extract.

* Calculated from the macronutrient percentage mean using the following energy coefficients: 23.6 kJ g⁻¹ for P; 38.9 kJ g⁻¹ for F; and 16.7 kJ g⁻¹ for CH [22].

Figure 1

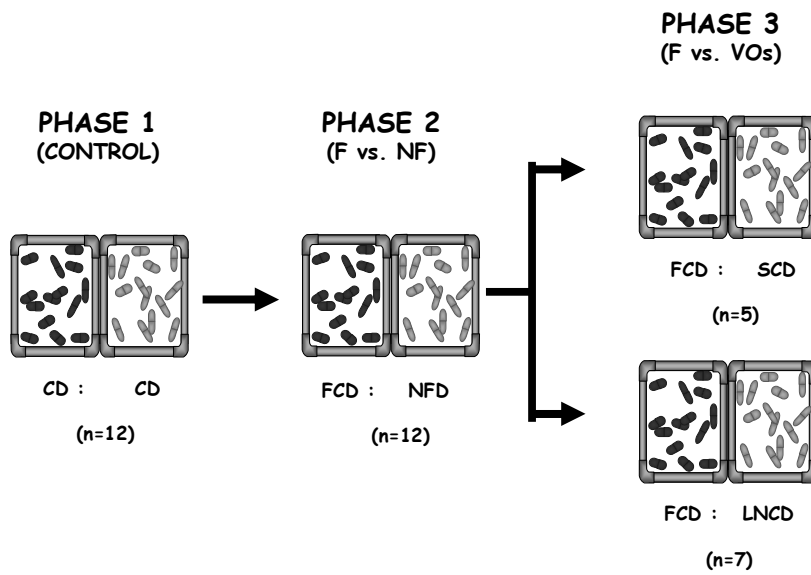


Figure 2

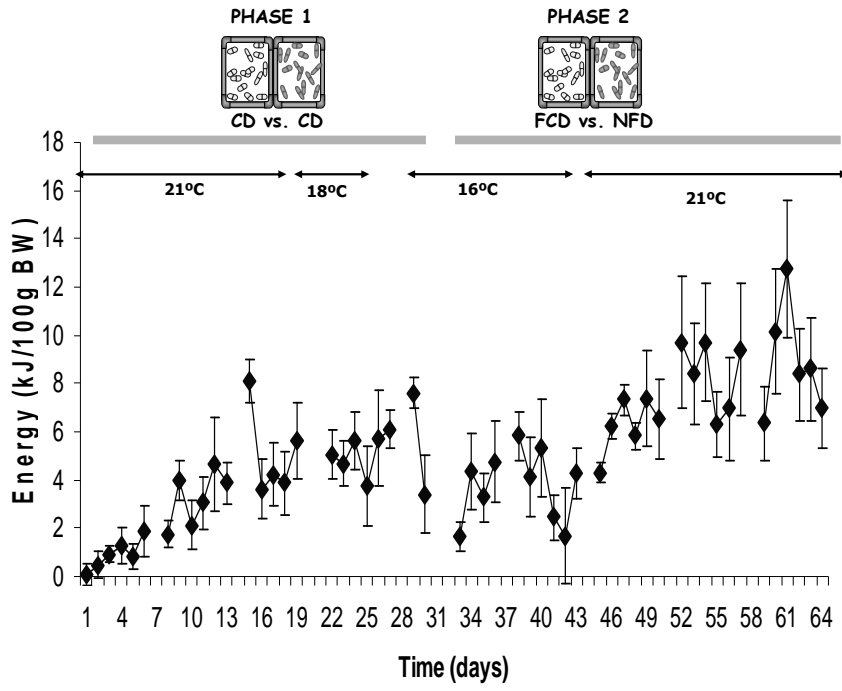


Figure 3

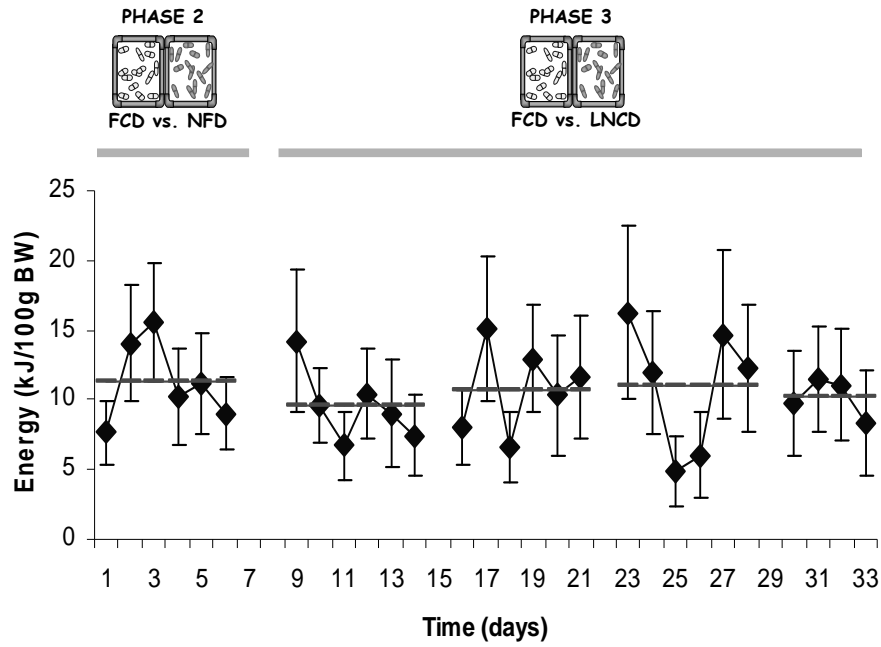


Figure 4

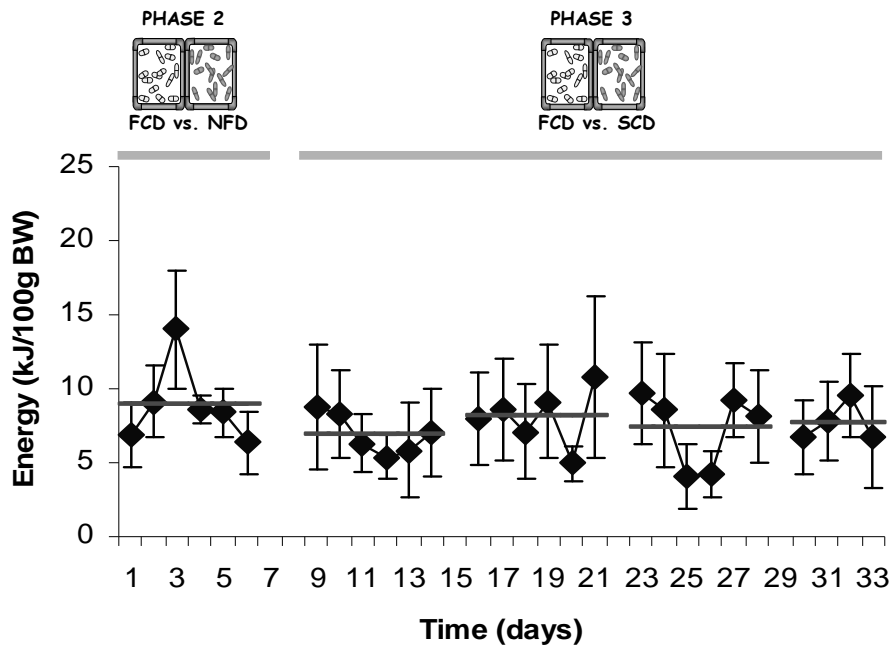


Figure 5

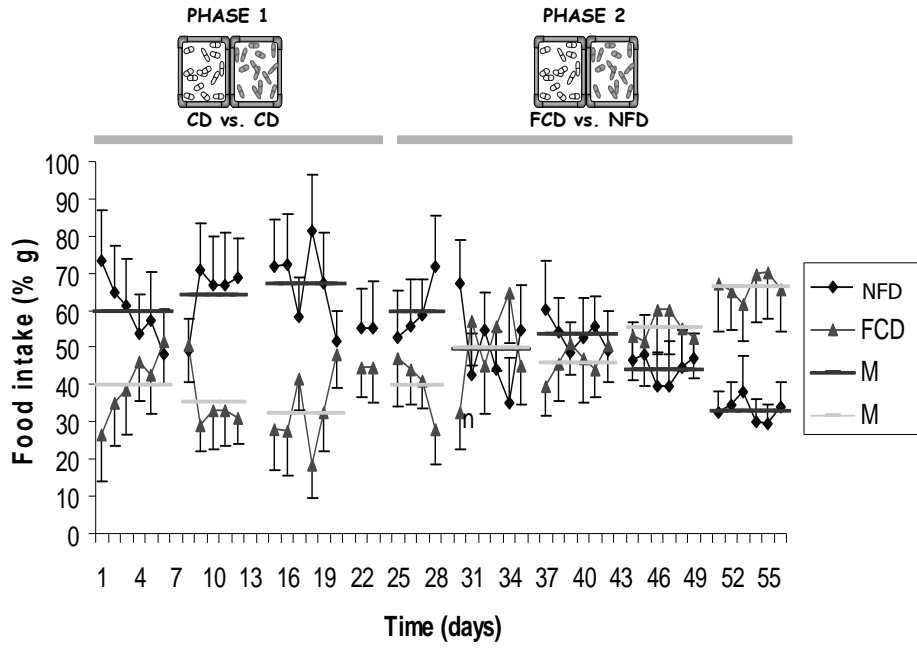


Figure 6

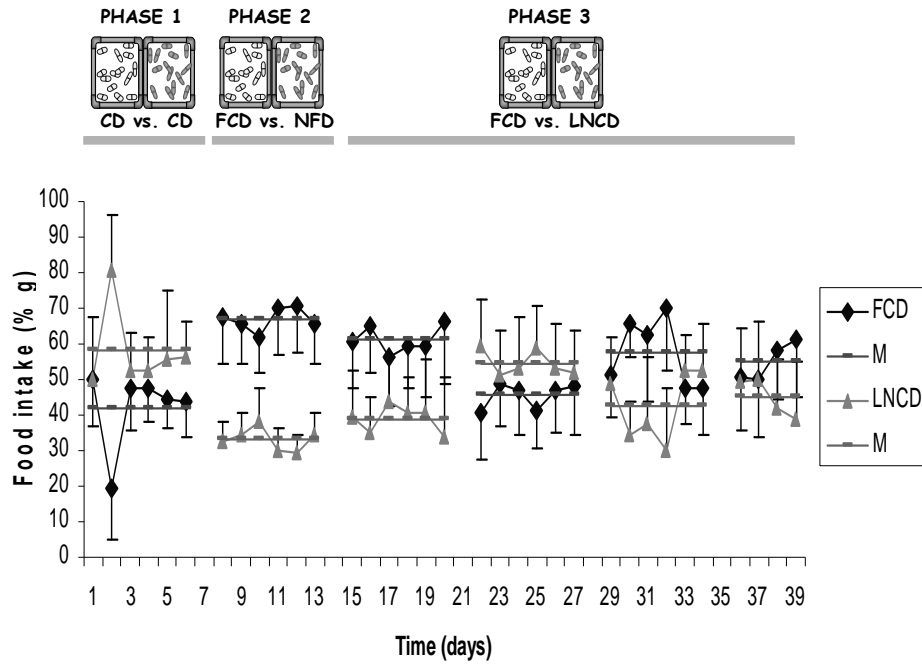
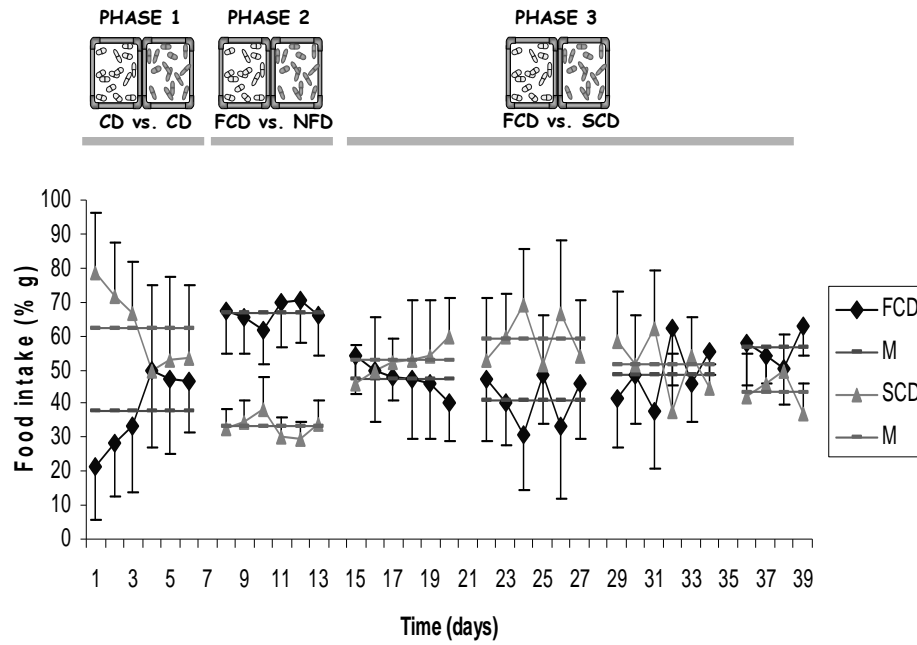


Figure 7



Discusión general

Una vez presentados los artículos que componen la presente Tesis Doctoral, cada cual con su correspondiente discusión, se trata en este apartado de realizar un ejercicio de integración para continuar con la línea argumental propuesta, reflejo de la unidad temática propia del presente trabajo, donde los artículos aportados se incorporen para extraer nuevas conclusiones en relación con las cuestiones planteadas al principio y, a partir de ahí, ubicarnos ante una nueva situación que orientaremos hacia distintas posibilidades de futuro.

A lo largo de esta memoria y, haciendo honor al título de la Tesis, se trata de abordar no sólo la caracterización de los mecanismos implicados en el control de la ingesta en peces, sino que se introduce el término de potencial regulador de la ingesta, algo muy importante dada la situación actual de la acuicultura, en la que la búsqueda de alternativas a las harinas y aceites de pescado utilizadas tradicionalmente, constituye uno de los grandes retos a corto plazo. En este sentido, se trata de estudiar en primer lugar, el hábitat de la especie, así como las fuentes de alimento propias de éste, algo que servirá para entender el comportamiento alimentario del animal y profundizar en el conocimiento de los mecanismos de regulación con que enfrenta las distintas situaciones experimentales. En segundo lugar, los estudios de comportamiento alimentario (Artículos 1, 2 y 4) nos permiten indagar en los mecanismos que operan en el control de la ingesta de alimento en peces, conocer las preferencias por las distintas dietas de los animales y llegar, incluso, a acercarnos a los requerimientos nutricionales de una especie. Finalmente, la introducción de estudios metabólicos (Artículo 3), permite caracterizar el funcionamiento de la maquinaria enzimática de la especie en presencia de diferentes fuentes de alimento. Agregar ese componente metabólico es fundamental para entender cuánto se fuerza al animal con cada cambio de dieta y cómo ésta puede afectar a los tejidos de la especie a medio y largo plazo.

La especie elegida para llevar a cabo esta caracterización del potencial metabólico y regulador de la ingesta, fue el sargo picudo, una especie que, por su carácter omnívoro (Sala y Ballesteros, 1999; Mena Sellés y García García, 2002), constituye un magnífico modelo para llevar a cabo estudios de comportamiento alimentario pero, sobre todo, se trata de un buen

modelo para indagar en esa “potencialidad” para ser alimentado con distintas fuentes nutricionales.

5.1. Estudios de comportamiento alimentario.

Los trabajos realizados acerca del comportamiento alimentario del sargo picudo (Artículos 1, 2 y 4), ponen de manifiesto la extraordinaria capacidad de los peces para defender una dieta completa adaptada a sus necesidades nutricionales, aún cuando son sometidos a las más exigentes condiciones experimentales, apuntando a que estos mecanismos en los peces no difieren en complejidad de los, mejor estudiados, de mamíferos.

A su vez, estos estudios remarcan el carácter multifactorial de la regulación de la ingesta de alimento en peces, donde el componente energético de la dieta es sólo uno de los factores participantes. La técnica de encapsulación de alimento se ha unido a las metodologías de alimentación auto-demanda en peces, permitiendo profundizar en el conocimiento de los mecanismos reguladores de la ingesta. La utilización de dietas encapsuladas abre una nueva perspectiva para enfocar la regulación de la ingesta y permite apreciar con claridad la enorme complejidad de mecanismos que subyacen en tal proceso.

5.1.1. Utilización de dietas de macronutrientes puros.

En el Artículo 1 de esta Tesis, se puso de manifiesto que el sargo picudo constituye un buen modelo para la alimentación con dietas encapsuladas, lo cual abrió la posibilidad de llevar a cabo toda una serie de experimentos que completaran el conocimiento cosechado con el empleo de otras metodologías de alimentación auto-demanda (Aranda *et al.*, 2000, 2001; Rubio *et al.*, 2003, 2004, 2005, 2006; Sánchez-Vázquez *et al.*, 1998, 1999, Torrejón Atienza *et al.*, 2004; Vivas *et al.*, 2006), las cuales han permitido estudiar la capacidad de los peces para seleccionar entre distintas fuentes de alimento y observar hasta dónde pueden llegar en el

mantenimiento de una dieta completa que se adapta perfectamente a sus necesidades nutricionales, así como a sus hábitos alimentarios.

La utilización de esta metodología basada en la **encapsulación del alimento** para peces, hizo posible la utilización de dietas de macronutrientes puros, algo complicado con dietas granuladas. De este modo, se puso de manifiesto que la regulación de la ingesta tiene lugar, también, a nivel de nutriente, y que la composición cualitativa (concentración relativa de los diferentes macronutrientes) de la dieta supone un factor de suficiente envergadura como para ser tenido muy en cuenta. Es más, los resultados obtenidos usando esta metodología, demuestran que los factores orosensoriales de la dieta no son imprescindibles para que esta regulación tenga lugar y que, por lo tanto, esa cascada de mecanismos fisiológicos que hemos mencionado anteriormente, puede comenzar a través de señales activadas a nivel post-ingestivo y/o post-absortivo (Artículo 1).

El sargo picudo fue capaz de seleccionar entre las dietas de macronutrientes puros, componiendo una dieta completa muy rica en proteína (62,7% proteína, 21,3% carbohidratos y 16,0% grasa) que defendió a lo largo de las distintas fases experimentales. En peces, con la excepción del carpín dorado, especie omnívora, se ha observado que la proteína es el macronutriente seleccionado en mayor proporción, tanto en experimentos utilizando dietas granuladas (Aranda *et al.*, 2000, 2001; Sánchez-Vázquez *et al.*, 1999; Torrejón Atienza *et al.*, 2004; Vivas *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2001) como encapsuladas (Rubio *et al.*, 2003, 2004, 2005, 2006). Además, en el segundo experimento del Artículo 1 de la presente Tesis, se observó cómo el sargo picudo, compensaba la reducción del contenido proteico de las cápsulas correspondientes, incrementando su ingesta de cápsulas de proteína, lo cual apunta a que la ingesta de proteína está fuertemente regulada en peces marinos, tanto en los carnívoros como en los omnívoros. Y es que, precisamente en los animales omnívoros, la ingesta de proteína debe estar más finamente regulada que en los carnívoros, puesto que la dieta de éstos es, en cierto modo, un seguro de cantidad y calidad de proteína. Respecto a la grasa y los carbohidratos, los peces marinos mantienen unos porcentajes de selección relativamente

cercanos, pareciendo existir para estos dos macronutrientes, un sistema de regulación más débil. En el Artículo 2 de esta Tesis, el sargo picudo no cambió su comportamiento alimentario cuando se le sometió a la dilución del contenido de grasa de las cápsulas de este macronutriente y sólo cuando las cápsulas de grasa fueron completamente retiradas, los animales respondieron incrementando su ingesta, tanto de proteína como de carbohidratos.

La utilización de dietas de macronutrientes puros permitió, a su vez, observar la existencia de **mecanismos de regulación específicos de nutriente**, mecanismos que ya han sido observados en mamíferos (Gietzen, 2000; Simpson y Raubenheimer, 2000; Smith *et al.*, 1999) y que podrían estar actuando también en peces. En la Introducción General de la presente memoria, se hacía referencia a que estos mecanismos nutriente-específicos podían actuar a cuatro niveles distintos (orosensoriales, gastrointestinales y órganos asociados, neurales y efectores) y se señalaban las posibles vías a través de las cuales podían operar. No obstante, es muy complicado pretender que la comprensión de los mecanismos a través de los cuales los nutrientes actúan sobre la función endocrina en peces, nos permita formular dietas que activen estos sistemas endocrinos, debido fundamentalmente a la naturaleza multifactorial de dichos sistemas (MacKenzie *et al.*, 1998).

Bass *et al.* (1992) han identificado al menos 10 localizaciones sensibles a aminoácidos concretos en el eje GH-IGFs de mamíferos, desde el hipotálamo hasta los receptores de IGFs. Dentro de cualquier sistema endocrino, coexisten múltiples puntos para la regulación, incluidos la síntesis de la hormona, su liberación, transporte vascular, metabolismo periférico, unión a receptor, aclarado y regulación neural (Eales, 1985). En peces, la mayoría de los estudios están enfocados hacia una pequeña parte de este sistema, fundamentalmente hacia los niveles de hormona en sangre y su unión al receptor. Muy pocos estudios se han realizado acerca de la función directa de un nutriente sobre un tejido endocrino, y los componentes específicos de las dietas capaces de influir sobre la función endocrina no han sido aún identificados para la mayoría de las hormonas. A pesar de eso, existe un número de mecanismos potenciales a través de los cuales los nutrientes podrían actuar sobre la función endocrina en peces. La

Tabla 4 muestra estos mecanismos, ilustrando que la mayoría de los estudios en peces se han centrado más en los efectos periféricos que en los efectos centrales (MacKenzie *et al.*, 1998).

Tabla 4. Mecanismos potenciales a través de los cuales la glucosa, los aminoácidos y los ácidos grasos pueden influir en la función endocrina en peces^a

Mecanismos periféricos

Estimulación directa de la síntesis y secreción de la hormona (ej. Hormonas pancreáticas e intestinales).*

Modulación de la disponibilidad del receptor a la hormona (receptor de GH en hígado).*

Alteración del transporte de la hormona y su eliminación (proteínas de unión a IGF plasmáticas).*

Alteración del sistema de transducción de la señal en la célula diana (activación de GH en células hepáticas).*

Efectos sobre la activación de la hormona (desyodación de la tiroxina en el hígado).*

Modulación de la producción de hormona tiroidea o pancreática por hormonas periféricas estimuladas por nutriente (efectos de la insulina sobre la desyodación, CCK sobre la insulina).

Mecanismos centrales (SNC e hipófisis)

Estimulación directa sobre la producción del neuropéptido regulador (NPY).

Proveyendo precursores para la síntesis de neurotransmisor (serotonina, dopamina).

Activación directa de la liberación hipofisiaria (GH).*

Modulación de la regulación hipotalámica sobre la producción hipofisiaria (TSH).

Estimulación autónoma nutriente-inducida de la secreción hormonal (Insulina).

Modulación de la producción hormonal en la hipófisis o el hipotálamo por hormonas periféricas estimuladas por nutriente (CCK y GH, Insulina y NPY).

^a La mayoría de los mecanismos han sido identificados en estudios realizados en mamíferos.

* Significa que existen evidencias de un mecanismo equivalente en peces (Modificado de MacKenzie *et al.*, 1998).

La integración de todas estas señales culminaría en el establecimiento de un comportamiento alimentario nutriente-específico o, lo que es lo mismo, una **selección dietaria**. Como se ha indicado en la Introducción General, las premisas fundamentales para que tenga lugar la selección dietaria son: a) existencia de una característica sensorial distintiva por parte de la dieta y b) la existencia de mecanismos post-ingestivos específicos.

Dado que la inclusión de macronutrientes puros en cápsulas duras de gelatina conlleva la eliminación de las diferencias quimiosensoriales y de textura de los mismos, evitando su posible interferencia en la selección y, puesto que tal proceso sólo es posible si las dietas presentan alguna propiedad química o física particular que pueda ser detectada por el animal antes de proceder a su ingestión (Thibault y Booth, 1999), las dos únicas características que podrían ser utilizadas por los peces para diferenciar entre las distintas dietas encapsuladas son el color de las mismas y su localización en el tanque (Rubio, 2004). En el Artículo 1 de esta Tesis fue demostrado, tal y como había ocurrido previamente con la lubina (Rubio *et al.* 2003), que, de esas dos posibles señales externas, el color es la más importante para que la selección tenga lugar, puesto que, al suministrar los tres tipos de cápsulas mezcladas en un mismo flotador, ésta se mantiene.

Además, considerando que, en este tipo de experimentos, todas las características externas de las dietas, salvo el color, son idénticas y que éste no constituye una característica diferencial de los macronutrientes en la naturaleza, los peces deben desarrollar un **aprendizaje asociativo** del tipo condicionado clásico (Pauloviano), para poder llevar a cabo la selección, donde el tipo de macronutriente actúa como estímulo incondicionado y el color de la cápsula como estímulo condicionado (Rubio *et al.*, 2003).

Los animales deben ser capaces, por tanto, de asociar el color de las cápsulas con su contenido, lo que implica necesariamente el análisis del contenido de las cápsulas mediante algún mecanismo post-ingestivo. Si eliminamos la detección rostral y orofaríngea, permanecen como posibilidades las señales nerviosas (quimiorreceptores del TGI), las concentraciones circulantes de nutrientes, las señales metabólicas y las endocrinas (Rubio, 2004) que, en cualquiera de los casos, estarían enviando información al cerebro del pez. Finalmente, sería el cerebro quien conectaría ambas informaciones, la pre-ingestiva (color) con la post-ingestiva. Una vez producida esta asociación, la selección puede ocurrir a dos escalas temporales distintas: intraprandial e interprandial. La **selección intraprandial** únicamente es posible si las comidas duran el tiempo suficiente para que los nutrientes puedan ser detectados en el TGI y/o

absorbidos. Para que se produzca la selección intraprandial los nutrientes deben estimular receptores específicos del estómago y el intestino o, una vez absorbidos, ser detectados por tejidos sensibles a sus niveles circulantes, o bien producir la liberación de hormonas de un modo rápido que permita la decisión de seguir o no consumiendo un determinado tipo de alimento (Thibault y Booth, 1999). En los experimentos realizados en esta Tesis, parece muy complicado que este tipo de selección tenga lugar, debido a la corta duración de la comida (treinta minutos) y a que la cápsula tarda en disolverse en el estómago y liberar su contenido. Por lo tanto, la **selección** debe realizarse mayoritariamente a nivel **interprandial**, es decir, el animal debe asociar los efectos post-ingestivos de una dieta ingerida en el pasado con las señales pre-ingestivas que recibe en el presente, e integrar toda esa información con la que se refiere al estado nutricional de su organismo y demás parámetros anteriormente citados. El resultado será el establecimiento de una respuesta motora que definirá su comportamiento ante las distintas dietas que se le ofrecen.

Estos mecanismos post-ingestivos son activados en presencia de los diferentes macronutrientes y, sin la necesidad de la información quimiosensorial rostral y orofaríngea, inician toda una cascada de señalización que abarca múltiples tejidos e informa al cerebro de la composición nutricional de la dieta. Los animales presentan una alta capacidad para discriminar el contenido de las diferentes dietas así como para detectar cambios en el contenido de las cápsulas. El sargo picudo defiende la dieta seleccionada aunque sea sometido a la dilución o al ayuno selectivos de un determinado macronutriente (Artículos 1 y 2), permitiendo un mayor acercamiento a los requerimientos nutricionales de la especie, unos requerimientos que, sin la interferencia de factores como el sabor, el olor o la textura de la dieta, siguen acompañados de un comportamiento alimentario preciso, perfectamente adaptado a las necesidades fisiológicas del animal.

Visto que esta metodología constituye una herramienta útil para llevar a cabo estudios de selección en peces, aboliendo la influencia de la palatabilidad de las dietas, es posible desarrollar nuevos experimentos para ampliar el conocimiento de los mecanismos específicos

de nutriente en esta especie, como podría ser el estudio del efecto de la administración de distintos péptidos reguladores, o de inhibidores metabólicos, sobre la selección de macronutrientes.

5.1.2. *Utilización de dietas completas encapsuladas.*

Como ya se ha mencionado, la incorporación de nuevas fuentes de proteína y de grasa de origen vegetal constituye uno de los grandes retos a los que se enfrenta la acuicultura actual con el fin de alcanzar la sostenibilidad. Recientemente, se han llevado a cabo estudios de selección de dietas completas con diferentes fuentes de grasa en lubina y trucha arco iris (Geurden *et al.*, 2005; Luz *et al.*, 2004), poniéndose de manifiesto la habilidad de ambas especies para discriminar entre los distintos aceites empleados. Sin embargo, este tipo de estudios nutricionales, enfocados en la búsqueda de fuentes alternativas, tanto de grasa como de proteína, se pueden ver influidos por la presencia, en dichas fuentes, de sustancias rechazadas por los peces, debido a su palatabilidad, lo que hace difícil diferenciar entre la capacidad de los peces para aprovechar metabólicamente esos nutrientes y el rechazo que generan las nuevas dietas. La encapsulación constituye un buen sistema para evitar la barrera ingestiva en este tipo de estudios.

En el Artículo 4 de la presente Tesis Doctoral, se puso de manifiesto que, en ausencia de las propiedades orosensoriales de las dietas completas, con distintos aceites como fuente de grasa (aceite de pescado, aceite de soja y aceite de linaza), los animales se alimentan indistintamente de cada una de ellas, por lo que, a corto plazo, los animales no rechazan ninguna dieta. Con este tipo de protocolo experimental, además, sería posible, con tiempos más largos de experimentación, indagar en la capacidad de los peces para seleccionar entre estas dietas completas encapsuladas, estableciéndose un paso más en el análisis de los mecanismos de regulación de la ingesta y selección dietaria, pues ya no estaríamos trabajando a nivel de macronutriente sino de sus elementos constituyentes (aminoácidos, ácidos grasos).

5.2. Estudios metabólicos.

Los peces se pueden clasificar, según sus hábitos alimentarios, en animales carnívoros/piscívoros y animales omnívoros, pudiendo ser, a su vez, y según su hábitat, dulceacuícolas y marinos. De este modo, se hace referencia al tipo de dieta que ingieren en su medio natural, que estará caracterizada, entre otros factores, por una composición más o menos definida. Es lógico pensar que los peces asociados a un tipo de hábitat determinado, el cual presentará unas fuentes de alimento disponibles peculiares, se hayan adaptado a la óptima utilización de esos ingredientes y que su metabolismo refleje, en cierto modo, la composición de su dieta. Por este motivo, a la hora de abordar la sustitución de unos ingredientes por otros de la dieta, nos encontraremos con barreras constitutivas de la especie y deberemos caracterizar las capacidades metabólicas de ésta para no perjudicar su bienestar y su crecimiento.

La grasa de la dieta es utilizada por los peces, no sólo como sustrato energético, sino también como fuente de ácidos grasos esenciales, por lo que, el tipo de aceite empleado en la elaboración de una dieta para ellos, tiene que ser rico en ácidos grasos poliinsaturados de 18 carbonos (PUFA C₁₈) con los que arrancan las principales series de ácidos grasos (n-3 y n-6) (Figura 4). También debe contener ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), que suponen un sustrato energético óptimo, y baja cantidad de ácidos grasos saturados (SAFA), ya que los peces tienen problemas de digestibilidad con ellos (NCR, 1993; Storebakken, 2002). Los aceites de pescado reúnen estas características, por lo que se han venido utilizando tradicionalmente en acuicultura. También es importante la cantidad de lípido que se incorpora en la dietas y, en esto, debemos distinguir entre animales carnívoros y omnívoros.

En los peces carnívoros, como es el caso de la lubina, existe una fuerte presión evolutiva por asegurar un determinado aporte de proteína, sin el cual son incapaces de crecer y regenerar sus tejidos de forma adecuada tras una agresión (Rubio, 2004). El siguiente macronutriente en importancia para los animales carnívoros es la grasa. En dos estudios

realizados en la lubina, se observó que ésta necesita que la grasa esté presente en su dieta para regular su ingesta (Rubio *et al.*, 2005; Vivas *et al.*, 2003). Estas especies parecen presentar una deficiente utilización de los carbohidratos. Por este motivo, junto con sus altas necesidades energéticas, una práctica generalizada durante años ha sido utilizar proporciones muy elevadas de grasa en el pienso. Sin embargo, éste puede ser un hecho controvertido, porque se han descrito algunos efectos secundarios, como una inhibición de la ingesta o un engrasamiento excesivo y, por lo tanto, una deficiente calidad del filete (Johansen *et al.*, 2003). Además, se ha observado que las dietas ricas en grasa inhiben las rutas lipogénicas en peces (Lin *et al.*, 1977; Likimani y Wilson, 1982; Arnesen *et al.*, 1993; Días *et al.*, 1998), pudiendo llegar a producir una inhibición casi total de las actividades de desaturación/elongación responsables de la síntesis de ácidos grasos (Rollin *et al.*, 2003). Otro efecto observado en animales alimentados con dietas ricas en grasa, concretamente en trucha arco iris, es una posible estimulación de la síntesis de la glucosa en el hígado (Panserat *et al.*, 2002), lo cual corroboraría la impresión general sobre la mala utilización de los carbohidratos por parte de los peces carnívoros.

En el caso del sargo picudo, considerado omnívoro (Sala y Ballesteros, 1999; Mena Sellés y García García, 2002), aparece una mayor capacidad de utilización de los carbohidratos de la dieta (Hernández *et al.*, 2001a), apreciándose que la verdadera diferencia entre los animales marinos, carnívoros y omnívoros, no radica en sus preferencias por la proteína de la dieta sino en la menor dependencia de estos últimos de la proteína de origen animal, así como por su mayor habilidad para utilizar los CH como fuente de energía.

Según se obtuvo en el Artículo 2 de esta Tesis, el sargo manifiesta una menor dependencia de la grasa, pudiendo regular su ingesta tras una fuerte dilución de la misma. Sólo modificó su comportamiento alimentario cuando las cápsulas de grasa fueron completamente retiradas de la dieta, incrementando rápidamente su ingesta total de energía así como de proteína y carbohidratos.

En cuanto a las consecuencias metabólicas de la sustitución de aceites en el sargo picudo, podríamos esperar que ocurriese algo parecido a lo observado con la proteína. El carácter omnívoro de esta especie la convertía en un modelo muy interesante para caracterizar su metabolismo lipídico, así como su respuesta ante el cambio de la composición de la grasa de la dieta. No obstante, los resultados arrojados por esta Tesis (Artículo 3) no dejaron lugar a dudas y el sargo picudo mostró un patrón metabólico propio de las especies marinas carnívoras, con una deficiencia manifiesta de las actividades de desaturación/elongación en dos de los tejidos más activos, el hígado y el tracto digestivo.

Aún así, a pesar de que las actividades de desaturación/elongación no se vieron modificadas con la sustitución del aceite de pescado por aceites vegetales (soja y linaza), sí que se pudo observar cierta respuesta del sargo picudo al cambio de aceites en la dieta. A pesar de que los perfiles de ácidos grasos de los tejidos estudiados reflejaron la composición de la dieta, los cambios observados, tanto en el hígado como en el tracto digestivo, resultaron estar moderadamente atenuados después de un periodo de alimentación experimental de nueve meses, al igual que se había observado con anterioridad en el músculo (Piedecausa *et al.*, 2007). Estos resultados apuntan, al igual que se ha observado en otras especies marinas, hacia la existencia de una alta capacidad para conservar los ácidos grasos de alto número de dobles enlaces (HUFA), que para ellos resultan esenciales, acudiendo a la oxidación del exceso de PUFA C₁₈ de la dieta, para obtener energía, así como, a la bioacumulación selectiva de los HUFA (MacKenzie *et al.*, 1998; Bell *et al.*, 2001a,b, 2002; Turchini *et al.*, 2003).

Tabla 5. Resumen de estudios realizados sobre la sustitución de aceites de pescado (FO) por aceites vegetales (VO) en peces.

Especies dulceacuícolas	Efectos de la sustitución de FOs por VO.	Referencias
Salmónidos Trucha arco iris.....	Sustitución total de FOs por aceite de soja, maíz, linaza o colza sin afectar el crecimiento. Aumento de actividades desaturación/elongación. Variaciones entre poblaciones de una misma especie, con diferentes hábitos alimentarios. En peces alimentados con aceite de oliva, se intensifican actividades de desaturación. En huevos y larvas, la inclusión de VO modifica la composición de ácidos grasos pero sin afectar el desarrollo reproductivo.	Bell <i>et al.</i> , 1997, 2001a,b, 2002, 2003; Buzzi <i>et al.</i> , 1996; Bencze Røra <i>et al.</i> , 2003; Caballero <i>et al.</i> , 2002; Geurden <i>et al.</i> , 2005, In Press; Labbe <i>et al.</i> , 1993; Menoyo, 2004; Olsen y Ringo, 1992; Richard <i>et al.</i> , 2006a. Tocher <i>et al.</i> , 1997; 2000, 2001, 2003; Torstensen <i>et al.</i> , 2000; Zheng <i>et al.</i> , 2004b.
Barbo africano	Peces alimentados con dietas que contenían aceite de girasol y aceite de palma, mostraron una ganancia de peso y una eficiencia de utilización de la dieta mayores que aquellos alimentados con dietas que contenían aceite de bacalao. La diferente composición de las dietas no afectó a los perfiles lipídicos del animal completo ni del músculo.	Ng <i>et al.</i> , 2004.
Bacalao de Murray	Es posible sustituir una alta proporción del FO de la dieta usando dietas basadas en la caseína.	Francis <i>et al.</i> , 2006.
Especies marinas		
Rodaballo	La sustitución total de FO por aceite de soja o linaza, no produjo efectos sobre la composición del cuerpo completo del animal. Bajo contenido lipídico del músculo (1-2%). En hígado y músculo, altos niveles de LA en peces alimentados con aceite de soja y altos niveles de LNA en peces alimentados con aceite de linaza Baja actividad desaturasa/elongasa, sin diferencias entre grupos experimentales. Después de un periodo de aclarado, se produjo un crecimiento similar en todos los grupos pero los efectos de los VO persistieron después de ocho semanas.	Bell <i>et al.</i> , 1995; Mørkøre <i>et al.</i> , 2007; Rodríguez <i>et al.</i> , 2002; Regost <i>et al.</i> , 2003.

	Efectos de la sustitución de FOs por VOs.	Referencias
Dorada	<p>Se ha conseguido una sustitución de los FOs por diversos VOs de hasta el 60% sin afectar al crecimiento, aunque es más difícil de conseguir a largo plazo. Para esto, el contenido lipídico de la dieta debe ser elevado.</p> <p>Las desaturadas y elongadas no se ven afectadas por la sustitución.</p> <p>El DHA y AA del músculo reflejan la composición de la dieta pero se recuperan después de 60 días de aclarado. El EPA se reduce más que éstos y no se recupera totalmente después de un periodo de aclarado de 90 días.</p> <p>Es posible alcanzar altos niveles de sustitución combinada de harina y aceites de pescado, por fuentes vegetales.</p>	Alexis, 1997; Benedito-Palos <i>et al.</i> , 2007; Caballero <i>et al.</i> , 2004; Izquierdo <i>et al.</i> , 2003, 2005; Kalogeropoulos <i>et al.</i> , 1992; Montero <i>et al.</i> , 2003.
Lubina	<p>En la sustitución parcial de FO por aceite de colza, linaza y oliva, no se observaron efectos negativos sobre crecimiento y supervivencia.</p> <p>Es posible la sustitución de hasta un 60% del FOs por aceite de soja o de linaza. La sustitución a largo plazo afecta al crecimiento.</p> <p>El hígado y el músculo reflejaron la composición de la dieta.</p> <p>Sin estimulación de las desaturadas.</p> <p>Después del aclarado de 14 semanas, la mayoría de los perfiles lipídicos fueron restaurados.</p>	Montero <i>et al.</i> , 2005; Mourente <i>et al.</i> , 2005; Mourente y Bell, 2006; Mourente y Dick., 2003; Parpoura y Alexis, 2001; Izquierdo <i>et al.</i> ; 2003; Richard <i>et al.</i> , 2006b; Sargent <i>et al.</i> , 1999; Tibaldi <i>et al.</i> , 2006; Yldiz y Sener, 1997.
Rodaballo de cola amarilla	Es posible la sustitución de hasta un 60% de FO por VOs sin afectar el crecimiento.	Watanabe, 2002.

El seguimiento de las actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo lipídico de peces, así como la observación de los perfiles lipídicos de los principales tejidos del animal, después de ser alimentados con dietas con diferente composición de ácidos grasos, constituye, pues, una magnífica herramienta, no sólo para abordar la sustitución de los aceites de pescado por aceites vegetales, sino también para seguir aprendiendo acerca de los mecanismos que participan en el mantenimiento de las funciones del organismo y la incorporación de nutrientes del medio. Este fue el primero de los trabajos de este tipo que fue llevado a cabo por nuestro grupo, por lo que esta línea queda abierta a futuros experimentos en los que se pretende una mayor caracterización de todos los procesos que culminan en la composición lipídica de los principales tejidos del animal, ya sea por ser la porción comestible de los mismos (músculo), como por lo activas que se muestran sus membranas (branquias, cerebro). En esta caracterización, no sólo es posible trabajar a nivel de ácidos grasos individuales, sino que existe toda una batería de técnicas de fraccionamiento y cromatográficas que nos permiten obtener los perfiles de las diferentes clases lipídicas y, de este modo, saber cuál es el destino de los diferentes ácidos grasos en el interior de la célula. Además, es posible llevar a cabo medidas enzimáticas para obtener información acerca del estrés oxidativo que sufren las células en especies que compensan la sustitución de aceites incrementando sus actividades de desaturación/elongación, especialmente aquellas que se muestran más activas en la transformación de ácidos grasos, como es el caso de los enterocitos y hepatocitos. Es importante conocer hasta qué punto se está forzando al animal con la sustitución, así como el efecto que este hecho podría tener sobre sus tejidos a medio y largo plazo.

La determinación del potencial metabólico de una especie, en lo que se refiere a la utilización de los lípidos de la dieta, también está siendo abordada desde un punto de vista genético. Los estudios sobre la sustitución de aceites en las dietas de piscifactoría, empiezan a incluir perfiles de expresión de los genes involucrados en la síntesis de las desaturasas y elongasas, perfiles que están siendo realizados para numerosas especies de peces marinos y dulceacuícolas (Agaba *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2004a) y que están ampliando enormemente las posibilidades de actuación en este tema.

En definitiva, todos estos trabajos pueden ser utilizados de forma conjunta para llegar, en última instancia, a la caracterización del potencial de la especie para ser alimentada con diferentes dietas, variando su composición nutricional. Para ello, será importante tener en cuenta que esa nueva dieta no debe ser rechazada por el animal, que pueda ser utilizada por éste para suplir sus demandas fisiológicas y que, en el caso de que se fuerce la maquinaria enzimática de la especie, que este hecho no produzca una degeneración de los factores que determinan la salubridad del producto para el consumo humano.

Conclusiones

The word 'Conclusiones' is displayed in a large, dark grey, sans-serif font. Below it, the same word is repeated in a lighter, semi-transparent blue color, creating a reflection effect. The text is centered within a light grey rectangular background.

1. El sargo picudo es un buen modelo para el estudio de los mecanismos implicados en la regulación de la ingesta, usando cápsulas de gelatina. En ausencia de la información orosensorial de las dietas, esta especie es capaz de discriminar y seleccionar una dieta completa a partir de macronutrientes puros encapsulados, desarrollando para ello un aprendizaje asociativo entre los efectos post-ingestivos ocasionados por la ingesta de un macronutriente y el color de la cápsula que lo contiene.
2. La encapsulación del alimento no ocasiona disminución en los coeficientes de digestibilidad de las dietas y los macronutrientes y la gelatina de la cápsula puede ser considerada como una fuente útil de proteína que es absorbida con facilidad por los animales.
3. El sargo picudo defiende una ingesta diaria de energía (17,4 kJ/100 gPC), así como un patrón de selección de macronutrientes (62,7% proteína, 21,3% carbohidratos y 16,0% grasa), estables. Al igual que ocurre en especies estrictamente carnívoras como la lubina o la dorada, esta especie marina omnívora, selecciona una dieta eminentemente proteica, sosteniendo una alta ingesta relativa de proteína tras una dilución del contenido de las cápsulas de este macronutriente de cerca del 40%, manifestando una alta capacidad para regular la ingesta de proteína.
4. La ingesta de grasa posee un papel secundario dentro de los mecanismos de regulación del sargo picudo. La especie no muestra cambios en su comportamiento alimentario cuando el contenido de grasa de las cápsulas es reducido en un 40% y, únicamente ante el ayuno selectivo de este macronutriente, el animal responde aumentando la ingesta total de energía y del número total de cápsulas. Este hecho pone de manifiesto que esta especie es capaz de mantener sus funciones con concentraciones muy bajas de grasa en la dieta.
5. El sargo picudo es capaz de detectar la ausencia de grasa cuando es sometido a la selección entre cápsulas con una dieta completa y cápsulas con la misma dieta, en la que

se ha sustituido la grasa por celulosa, manifestando una alta capacidad de asociación entre los efectos post-ingestivos de éstas y el color de las cápsulas.

6. Cuando la especie es alimentada con dietas completas encapsuladas, conteniendo diferentes fuentes de grasa, la cantidad seleccionada de cada dieta tiende a igualarse sin aparecer preferencias por ninguna de ellas. La ausencia de los factores orosensoriales de las dietas propicia que los peces puedan ingerir indistintamente dietas con fuentes alternativas de grasa que, de otro modo, podrían ser rechazadas.

7. El sargo picudo es incapaz de compensar la diferencia de composición de los aceites vegetales con respecto al aceite de pescado, mostrando actividades de desaturación/elongación hepáticas y digestivas insignificantes. Los tejidos del animal reflejan claramente la composición de las dietas, aunque el descenso en las concentraciones de los principales ácidos grasos (ácido eicosapentaenoico, EPA, y ácido docosahexaenoico, DHA) se ven atenuadas. La hipótesis más razonable para explicar estos datos parece estar en la existencia de una gran capacidad para la bioacumulación de los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) en los peces marinos, así como para su preservación de la β -oxidación, en detrimento de los ácidos grasos poliinsaturados de 18C (PUFA C₁₈), en exceso tras ingerir las dietas con aceites vegetales.

Conclusión general

El sargo picudo es capaz de componer, seleccionando entre preparaciones encapsuladas de macronutrientes puros, una dieta completa y equilibrada que se ajusta a sus necesidades fisiológicas, aún en ausencia de la información orosensorial del alimento. La técnica de encapsulación ha permitido comprobar este último extremo, que resalta la complejidad de los mecanismos implicados en la regulación de la ingesta en peces al implicar también, y de manera relevante, a la información post-ingestiva. Los resultados obtenidos indican que esta especie muestra una clara preferencia por la proteína de la dieta, a pesar de su carácter omnívoro, para cuya ingesta presenta una alta capacidad de regulación, posiblemente debido a ese carácter omnívoro. Sin embargo, los carbohidratos y la grasa parecen jugar un papel secundario en tal regulación, apuntando hacia la existencia de mecanismos específicos de macronutriente que actuarían por separado. Así pues, el perfil omnívoro de la especie estaría caracterizado por una menor dependencia de la proteína de origen animal y una mayor aceptación de la proteína vegetal, así como por una alta capacidad para la utilización de los carbohidratos de la dieta como sustratos energéticos. Además, el sargo picudo manifiesta una gran capacidad para mantener sus funciones en presencia, tanto de bajas concentraciones de grasa en la dieta, como de bajas cantidades de HUFA, recurriendo en tales casos, no a un aumento de las actividades de desaturación/elongación de ácidos grasos, sino a una alta bioconservación de los HUFA en detrimento de los PUFA C18, que serían encaminados hacia la β -oxidación.

Resumen general

1. Objetivos.

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue profundizar en el conocimiento de las pautas que rigen el comportamiento alimentario de los peces, relacionando este tipo de información con la caracterización del metabolismo de macronutrientes que éstos presentan. Con este fin, utilizamos una especie candidata para abrir el mercado piscícola del mediterráneo, el sargo picudo (*Diplodus puntazzo*) que, por su condición omnívora, representa un buen modelo para ampliar el estudio de los procesos de auto-selección de macronutrientes en peces, así como para abordar la sustitución del aceite de pescado de las dietas de piscifactoría por aceites vegetales.

Objetivos específicos de cada trabajo experimental

Art.1.1.

1. Comprobar la capacidad del sargo picudo para ser alimentado con dietas encapsuladas.
2. Detectar posibles preferencias por el color o la posición de las cápsulas en el tanque.
3. Dilucidar la necesidad de las propiedades orosensoriales de la dieta para la regulación de la ingesta de energía así como para la selección de macronutrientes en esta especie.

Art.1.2.

Analizar la capacidad del sargo picudo para regular la ingesta de energía y macronutrientes cuando es sometido a la dilución de la proteína con dietas encapsuladas.

Art.2.1.

Investigar el efecto de la dilución de grasa y el ayuno de grasa sobre la ingesta de energía y el patrón de selección de macronutrientes encapsulados por parte del sargo picudo.

Art.2.2.

Validar la técnica de encapsulación mediante un estudio de digestibilidad.

Art.4.1.

Analizar la capacidad del sargo picudo para la discriminación y selección de dietas completas encapsuladas que divergen en la presencia o no de grasa.

Art.4.2.

Determinar la habilidad del sargo picudo para la discriminación entre dietas completas encapsuladas que difieren únicamente en la fuente de lípido.

Art.3.

Analizar el efecto de la sustitución total del aceite de pescado por aceites vegetales sobre:

1. La composición de ácidos grasos de hepatocitos y enterocitos del tracto digestivo,
2. Las actividades de desaturación/elongación de aislamientos primarios de hepatocitos y enterocitos,
3. Las actividades de β -oxidación en hepatocitos y enterocitos del sargo picudo.

2. Metodología.

2.1. Diseño experimental.

Mediante los diferentes trabajos experimentales que componen la presente Tesis Doctoral, se siguió una línea argumental en la que se quiso resaltar las cualidades que hacen del sargo picudo una especie de interés, no solo para abrir el mercado de especies cultivables en el Mediterráneo, sino también, para llevar a cabo estudios metabólicos y de selección de dietas que permitan seguir avanzando en el conocimiento de los mecanismos implicados en la regulación de la ingesta en peces. Con este fin, se llevaron a cabo los diferentes trabajos experimentales que componen los artículos incluidos en esta Tesis. Los artículos 1, 2 y 4 se corresponden con trabajos realizados utilizando la técnica de empaquetado de dietas en el interior de cápsulas de gelatina. Ésta metodología supone un paso adelante en lo que se refiere a las técnicas de alimentación auto-demanda, ya que permite abolir de la selección las características orosensoriales de la dietas, que inevitablemente actúan con las dietas granuladas.

En los Artículos 1 y 2 de esta Tesis, fue evaluada la capacidad del sargo picudo para componer una dieta completa y equilibrada usando dietas de macronutrientes puros encapsulados separadamente (Artículo 1, primera parte), así como analizar el potencial de la especie para regular la ingesta de los diferentes macronutrientes tras la dilución del contenido proteico de las cápsulas de proteína (Artículo 1, segunda parte), la dilución del contenido lipídico de las cápsulas de grasa y el ayuno específico de grasa (Artículo 2, primera parte).

Así mismo, la segunda parte del Artículo 2 consistió en la validación de la metodología de encapsulación mediante el análisis de los coeficientes de digestibilidad de dietas granuladas y encapsuladas. Se trató de comprobar si el proceso de encapsulación modificaba la digestibilidad de las dietas y, también, si la gelatina que compone la pared de las cápsulas podía ser considerada como una fuente útil de proteína.

En un trabajo aún no publicado, los animales fueron sometidos a la discriminación entre pares de dietas completas encapsuladas (Artículo 4). En un primer experimento, los animales tenían que seleccionar entre una dieta completa con aceite de pescado como fuente de grasa (FCD) y la misma dieta en la que el porcentaje correspondiente a la grasa había sido sustituido por celulosa (NFD). En segundo lugar, se establecieron dos grupos a partir de los mismos peces de la fase anterior, uno de los cuales fue alimentado con la dieta de aceite pescado (FCD) y la misma dieta completa donde el contenido lipídico fue alcanzado con aceite de soja (SCD), mientras que el otro fue alimentado con la dieta FCD y la misma dieta completa donde se utilizó aceite de linaza como fuente de grasa (LNCD).

Por último, la información aportada por los trabajos de auto-selección, fue complementada con un estudio acerca del metabolismo de lípidos de la especie, usando una metodología consistente en el seguimiento de las actividades de desaturación/elongación implicadas en la transformación de los ácidos grasos esenciales de 18C (PUFA C₁₈), en sus correspondientes derivados de cadenas más largas y con mayor número de dobles enlaces (HUFA). La caracterización de las capacidades metabólicas de la especie y de cómo éstas quedan reflejadas en la composición de los principales tejidos del animal, constituyen elementos de gran importancia a la hora de interpretar los resultados aportados por los trabajos anteriores, a la vez que proyectan los datos arrojados por la presente Tesis Doctoral hacia una posible aplicación en la elaboración de dietas para la especie, bien adaptadas a sus requerimientos y ajustadas a su potencial para compensar la posible introducción de alternativas a las materias primas utilizadas tradicionalmente.

2.2. Animales empleados.

Se utilizaron sargos picudos procedentes del criadero de Valle Ca Zuliani Societa Agrícola S.R.L. (Pila di porto Tolle, Italia) y mantenidos en las instalaciones del IMIDA de San Pedro del Pinatar.

2.3. Instalaciones.

Los experimentos se realizaron en los Laboratorios de Crononutrición de Peces del Departamento de Fisiología, U.D. Fisiología Animal, situados en la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia, así como en los Laboratorios del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (IMIDA) de San Pedro del Pinatar, Murcia.

3. Resultados y Discusión.

Durante el primer experimento de esta Tesis Doctoral (Artículo 1), quedó demostrado que el sargo es un buen modelo para ser alimentado con dietas encapsuladas. Casi desde el primer día en que las cápsulas les fueron ofrecidas, los peces comenzaron a ingerirlas, tragándoselas enteras, e incrementando progresivamente la ingesta diaria de energía hasta alcanzar unos niveles constantes, así como un patrón de selección de macronutrientes estable. Este hecho permitió continuar con el protocolo de encapsulación y desarrollar nuevas fases experimentales en las que los animales fueron alimentados con tres dietas de macronutrientes puros encapsulados individualmente y dispuestos en tres flotadores separados cuya posición era rotada cada diez días o todas juntas en un mismo flotador, para abolir cualquier posible influencia de la posición de las cápsulas. Incluso, la relación color de la cápsula-macronutriente, que era mantenida para un mismo tanque a lo largo de todo el experimento, fue alterada para demostrar que el factor fundamental en la selección era el contenido de las cápsulas y no la posible existencia de preferencias innatas por el color.

Los peces alcanzaron y defendieron una dieta completa conformada por un 62,7% de proteína (P), un 21,3% de carbohidrato (CH) y un 16,0% de grasa (F), muy similar a la obtenida en un trabajo previo con dietas granuladas y comederos a demanda (Vivas *et al.*, 2006). De este modo, quedó demostrado que la regulación de la ingesta, no sólo ocurre a nivel energético, sino también de los nutrientes que la integran y que las propiedades orosensoriales de las dietas no constituyen el único factor para que dicha regulación tenga lugar. A su vez, parece demostrada la existencia de mecanismos que estarían actuando a nivel post-ingestivo y/o post-absortivo, probablemente involucrando señales nerviosas y péptidos reguladores en una compleja red que implicaría al tracto gastrointestinal y vísceras asociadas, tejidos periféricos y el sistema nervioso central. Esta información sería asociada por parte del animal con el color de las cápsulas, estableciendo un aprendizaje asociativo que haría posible la selección.

Cuando el contenido de las cápsulas que contenían la dieta de proteína pura fue reducido en un 40% con celulosa, los peces siguieron manteniendo su ingesta de energía, así como su patrón de selección, el cual defendieron incrementando su ingesta de cápsulas de proteína (Artículo 1). Estos resultados pusieron de manifiesto la importancia de la proteína para esta especie quien, a pesar de sus hábitos omnívoros (Sala y Ballesteros, 1997; Mena Sellés y García García, 2002) y, posiblemente, debido a ellos, selecciona una dieta fundamentalmente proteica, muy similar a aquella seleccionada por especies carnívoras como la lubina y la trucha arco iris (Aranda *et al.*, 2000; Sánchez-Vázquez *et al.*, 1999).

El carácter omnívoro del sargo picudo no radicaría, por lo tanto, en una preferencia menor por la proteína sino en un mayor desapego de la proteína animal y una mayor capacidad para utilizar proteínas de origen vegetal, así como para usar los carbohidratos como fuente de energía (Hernández *et al.*, 2001a). Este hecho fue respaldado por los resultados del experimento en el que el contenido de las cápsulas de grasa fue rebajado hasta el 13,4%, incrementando la proporción de dióxido de sílice en la mezcla y donde, a continuación, los peces fueron privados de las cápsulas de grasa (Artículo 2). Los resultados obtenidos señalaron la capacidad del sargo de mantener sus funciones vitales con muy bajas cantidades de grasa en la dieta. Únicamente cuando ésta fue retirada por completo, el animal respondió incrementando la ingesta total de energía, así como el número de cápsulas ingeridas de proteína y carbohidratos.

Como parte del Artículo 2 de la presente Tesis, fueron realizadas medidas de digestibilidad de las dietas encapsuladas en contraposición a la de dietas granuladas. Los resultados de estos análisis concluyeron que la encapsulación no produce alteraciones de la digestibilidad de las dietas y apuntaron a que la gelatina de la pared de las cápsulas es una proteína que es absorbida rápidamente por los peces y puede ser considerada como proteína útil.

Siguiendo con la línea de regulación de la ingesta por parte del sargo picudo, se realizó un nuevo experimento con dietas encapsuladas donde se analizó la capacidad de la especie para discriminar entre una dieta completa encapsulada, con aceite de pescado como fuente de grasa (FCD), y una dieta similar en la que se había sustituido la proporción correspondiente a la grasa por celulosa (NFD). Los animales pusieron de manifiesto su capacidad de discriminación, seleccionando la dieta FCD en un 66,8% (Artículo 4). En un segundo experimento de este trabajo, los peces fueron separados en dos grupos en función de los pares de dietas con que fueron alimentados. Uno de ellos fue alimentado con la dieta FCD y con una dieta completa con aceite de soja (SCD), el otro con la dieta FCD y con una dieta completa con aceite de linaza (LNCD). El resultado fue que los animales modificaron su patrón de selección con respecto a la fase anterior (FCD vs. NFD) y comieron indistintamente ambos tipos de dietas (FCD y dietas con aceites vegetales) demostrando que, si se eliminan los factores orosensoriales de estas dietas, no existe rechazo por parte de los peces. Los animales, en el tiempo que duró el experimento, no discriminaron entre los distintos aceites (a nivel de su composición de ácidos grasos) algo que parece lógico basándonos en los resultados anteriores, puesto que el sargo es capaz de mantener sus funciones vitales con muy bajas concentraciones de grasa en su dieta.

Por último, se cambió por completo de metodología para llevar a cabo un trabajo más aplicado, caracterizando la capacidad del sargo picudo para ser alimentado con dietas con aceites vegetales. Se estudió la capacidad de la especie para compensar los cambios de composición de los aceites vegetales con respecto al aceite de pescado. Los datos obtenidos pusieron de manifiesto la incapacidad del sargo picudo para desaturar y elongar los PUFA C₁₈, abundantes en los aceites vegetales, hacia los correspondientes HUFA, necesarios para un adecuado funcionamiento del organismo y para alcanzar un producto de alta calidad para el consumo humano. No obstante, los perfiles de ácidos grasos obtenidos en los animales alimentados con las dietas SCD y LNCD mostraron que, si bien reflejaban la composición de la dieta, las concentraciones de PUFA C₁₈ eran menores de las esperadas, mientras que ocurría lo contrario con los HUFA. En otros estudios, se ha observado que los peces marinos

presentan una alta capacidad para preservar los HUFA de la β -oxidación, en detrimento del exceso de PUFA C₁₈ producido por la ingesta de aceites vegetales (Mourente *et al.*, 2005).

En nuestro caso, las medidas de β -oxidación no arrojaron diferencias significativas salvo para enterocitos inoculados con ácido [1-¹⁴C] linoleico procedentes de animales alimentados con dieta de linaza con respecto de aquellos animales alimentados con dieta FCD.

4. Conclusiones.

1. El sargo picudo es un buen modelo para el estudio de los mecanismos implicados en la regulación de la ingesta, usando cápsulas de gelatina. En ausencia de la información orosensorial de las dietas, esta especie es capaz de discriminar y seleccionar una dieta completa a partir de macronutrientes puros encapsulados, desarrollando para ello un aprendizaje asociativo entre los efectos post-ingestivos ocasionados por la ingesta de un macronutriente y el color de la cápsula que lo contiene.
2. La encapsulación del alimento no ocasiona disminución en los coeficientes de digestibilidad de las dietas y los macronutrientes y la gelatina de la cápsula puede ser considerada como una fuente útil de proteína que es absorbida con facilidad por los animales.
3. El sargo picudo defiende una ingesta diaria de energía (17,4 kJ/100 gPC), así como un patrón de selección de macronutrientes (62,7% proteína, 21,3% carbohidratos y 16,0% grasa), estables. Al igual que ocurre en especies estrictamente carnívoras como la lubina o la dorada, esta especie marina omnívora, selecciona una dieta eminentemente proteica, sosteniendo una alta ingesta relativa de proteína tras una dilución del contenido de las cápsulas de este macronutriente de cerca del 40%, manifestando una alta capacidad para regular la ingesta de proteína.
4. La ingesta de grasa posee un papel secundario dentro de los mecanismos de regulación del sargo picudo. La especie no muestra cambios en su comportamiento alimentario cuando el contenido de grasa de las cápsulas es reducido en un 40% y, únicamente ante el ayuno selectivo de este macronutriente, el animal responde aumentando la ingesta total de energía y del número total de cápsulas. Este hecho pone de manifiesto que esta especie es capaz de mantener sus funciones con concentraciones muy bajas de grasa en la dieta.

5. El sargo picudo es capaz de detectar la ausencia de grasa cuando es sometido a la selección entre cápsulas con una dieta completa y cápsulas con la misma dieta, en la que se ha sustituido la grasa por celulosa, manifestando una alta capacidad de asociación entre los efectos post-ingestivos de éstas y el color de las cápsulas.
6. Cuando la especie es alimentada con dietas completas encapsuladas, conteniendo diferentes fuentes de grasa, la cantidad seleccionada de cada dieta tiende a igualarse sin aparecer preferencias por ninguna de ellas. La ausencia de los factores orosensoriales de las dietas propicia que los peces puedan ingerir indistintamente dietas con fuentes alternativas de grasa que, de otro modo, podrían ser rechazadas.
7. El sargo picudo es incapaz de compensar la diferencia de composición de los aceites vegetales con respecto al aceite de pescado, mostrando actividades de desaturación/elongación hepáticas y digestivas insignificantes. Los tejidos del animal reflejan claramente la composición de las dietas, aunque el descenso en las concentraciones de los principales ácidos grasos (ácido eicosapentaenoico, EPA, y ácido docosahexaenoico, DHA) se ven atenuadas. La hipótesis más razonable para explicar estos datos parece estar en la existencia de una gran capacidad para la bioacumulación de los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) en los peces marinos, así como para su preservación de la β -oxidación, en detrimento de los ácidos grasos poliinsaturados de 18C (PUFA C₁₈), en exceso tras ingerir las dietas con aceites vegetales.

Conclusión general

El sargo picudo es capaz de componer, seleccionando entre preparaciones encapsuladas de macronutrientes puros, una dieta completa y equilibrada que se ajusta a sus necesidades fisiológicas, aún en ausencia de la información orosensorial del alimento. La técnica de encapsulación ha permitido comprobar este último extremo, que resalta la complejidad de los mecanismos implicados en la regulación de la ingesta en peces al implicar también, y de manera relevante, a la información post-ingestiva. Los resultados obtenidos indican que esta especie muestra una clara preferencia por la proteína de la dieta, a pesar de su carácter omnívoro, para cuya ingesta presenta una alta capacidad de regulación, posiblemente debido a ese carácter omnívoro. Sin embargo, los carbohidratos y la grasa parecen jugar un papel secundario en tal regulación, apuntando hacia la existencia de mecanismos específicos de macronutriente que actuarían por separado. Así pues, el perfil omnívoro de la especie estaría caracterizado por una menor dependencia de la proteína de origen animal y una mayor aceptación de la proteína vegetal, así como por una alta capacidad para la utilización de los carbohidratos de la dieta como sustratos energéticos. Además, el sargo picudo manifiesta una gran capacidad para mantener sus funciones en presencia, tanto de bajas concentraciones de grasa en la dieta, como de bajas cantidades de HUFA, recurriendo en tales casos, no a un aumento de las actividades de desaturación/elongación de ácidos grasos, sino a una alta bioconservación de los HUFA en detrimento de los PUFA C18, que serían encaminados hacia la β -oxidación.

Referencias

1. Abellán, E., 2006. Nuevas especies de peces explotables en acuicultura marina. En: Zamora, S., Martínez, F.J. and Rubio, V.C. (Eds.). *Acuicultura III: cultivo y alimentación de peces*, pp. 65–83.
2. Ablett, R.F., Taylor, M.J., Selivonchik, D.P., 1983. The effect of high-protein and high-carbohydrate diets on [¹²⁵I]iodoinsulin binding in skeletal muscle plasma membranes and isolated hepatocytes of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br. J. Nutr.* 50, 129–139.
3. Agaba, M.K., Tocher, D.R., Zheng, X., Dickson, C.A., Dick, J.R., Teale, A.J., 2005. Cloning and functional characterisation of polyunsaturated fatty acid elongases of marine and freshwater teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 42B, 342–352.
4. Alexis, M.N., 1997. Fish meal and oil replacers in Mediterranean marine fish diets. In: Tacon, A., Basurco, B. (Eds.), *Feeding Tomorrow's Fish*, pp. 183–204.
5. 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. *Journal of Physiology and Biochemistry* 56, 155–156.
6. Aranda, A., Sánchez-Vázquez, F.J., Madrid, J.A., 2001 Effect of short-term fasting on macronutrient self-selection in sea bass. *Physiol. Behav.* 73, 105–109.
7. Arnesen, P., Krodaahl, A., Kristiansen, I., 1993. Lipogenic enzyme activities in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 105, 541–546.
8. Barlow, S., 2000. Fishmeal and oil: sustainable feed ingredients for aquafeeds. *Global Aquacult. Advocate* 4, 85–88.
9. Bass, J.J., Spencer, G.S.G., Hodgkinson, S.C., 1992. Nutritional control of the growth hormone axis. In Boorman, K.N., Buttery, P.J., Lindsay, D.B. (Eds.), *The Control of Fat and Lean Deposition*. Butterworth Heinemann, Oxford, pp. 175–195.
10. Basurco, B., Abellán, E., 1999. Finfish species diversification in the context of the Mediterranean marine fish farming development. In: *Marine finfish species diversification. Current situation and prospects in Mediterranean aquaculture. Options Mediterraneennes*. Vol: B, 24, 9-25.
11. Beck, B., Stricker-Krongrad, A., Burlet, A., Maz, J-P., Musse, N., Nicolas, J-P., Burlet, C., 1994. Macronutrient type independently of energy intake modulates hypothalamic neuropeptide-Y in Long-Evans rats. *Brain Res. Bull.* 34, 85–91.
12. Bell, J.G., Castell, J.D., Tocher, D.R., MacDonald, F.M., Sargent, J.R., 1995. Effects of different dietary arachidonic: docosahexaenoic acid ratios on phospholipid fatty acid compositions and prostaglandin production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Physiol. Biochem.* 14, 139–151.
13. Bell, J.G., Tocher, D.R., Farndale, B.M., Cox, D.I., McKinney, R.W., Sargent, J. R., 1997. The effect of dietary lipid on polyunsaturated fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) undergoing parr-smolt transformation. *Lipids* 35, 515–525.

14. Bell, J.G., Henderson, R.J., Tocher, D.R., McGhee, F., Dick, J.R., Porter, A., Smullen, R.P., Sargent, J.R., 2001b. Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid composition and hepatocyte fatty acid metabolism. *J. Nutr.* 131, 1535–1543.
15. Bell, J.G., Henderson, R.J., Tocher, D.R., McGhee, F., Dick, J.R., Porter, A., Smullen, R.P., Sargent, J.R., 2002. Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. *J.Nutr.* 132, 222–230.
16. Bell, J.G., Tocher, D.R., Henderson, R.J., Dick, J.R., Crampton, V.O., 2003. Altered fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing linseed and rapeseed oils can be partially restored by a subsequent fish oil finishing diet. *J. Nutr.* 133, 2793–2801.
17. Bell, M.V., Dick, J.R., Porter, A.E.A., 2001a. Biosynthesis and tissue deposition of docosahexaenoic acid (22:6n-3) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Lipids* 36, 1153–1159.
18. Bencze Røra, A.M., Regost, C., Lampe, J., 2003. Liquid holding capacity, texture and fatty acid profile of smoked fillets of Atlantic salmon fed diets containing fish oil or soybean oil. *Food Research International* 36, 211–239.
19. Benedito-Palos, L., Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.A., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2007. Combined replacement of fish meal and oil in practical diets for fast growing juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L): Networking of systemic and local components of GH/IGF axis. *Aquaculture* 267, 199–212.
20. Bubenik, G.A., Pang, S.F., Hacker, R.R., Smith, P.S., 1996. Melatonin concentrations in serum and their relationship to the intake and passage of food. *Journal of Pineal Research* 21, 251–256.
21. Burton-Freeman, B., Gietzen, D.W., Schneeman, B.O., 1999. Cholecystokinin and serotonin receptors in the regulation of fat-induced satiety in rats. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 276, R429-R434.
22. Buzzi, M., Henderson, R.J., Sargent, J.R., 1996. The desaturation and elongation of linolenic acid and eicosapentaenoic acid by hepatocytes and liver microsomes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing fish oil or olive oil. *Biochem. Biophys. Acta* 1299, 235–244.
23. Caballero, M.J., Obach, A., Rosenlund, G., Montero, D., Gisvold, M., Izquierdo, M.S., 2002. Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 214, 253–271.
24. Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., Kjørsvik, E., Fernández, A.J., Rosenlund, G., 2004. Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by

- short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. *Journal of fish Diseases* 27, 531–541.
25. Calvín, J.C., 2006. Fondos Marinos de Murcia. Tipos, paisajes, flora y fauna, estado de conservación y mejores inmersiones. En: Calvín J.C. (Eds.).
 26. Carlson, N.R., 1998. Ingestive Behavior: Eating. En: *Physiology and Behavior*. Allyn and Bacon, Boston, pp. 376–408.
 27. Carneiro, N.M., Navarro, I., Gutiérrez, J., Plisetskaya, E.M., 1993. Hepatic extraction of circulating insulin and glucagon in brown trout (*Salmo trutta fario*) after glucose and arginine injection. *J. Exp. Zool.* 267, 416–422.
 28. Cerdá-Reverter, J.M., Rubio, V.C., Sánchez, E., 2006. Control neural de la ingesta en peces. En: Zamora, S., Martínez, F.J., Rubio, V.C. (Eds.), 2006. *Acuicultura III: cultivo y alimentación en peces*. Universidad de Murcia. pp.287–326.
 29. Covasa, M., Ritter, R.C., 2000. Satiating in response to macronutrient signals from the intestine: mechanisms and implications for macronutrient selection. En: *Neural and Metabolic Control of Macronutrient Intake*. Berthoud, H.R. y Seeley, R.J. (Eds.). CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 263–278.
 30. Cross-Mellor, S.K., Kent, W.D.T., Ossenkopp, K.P., Kavaliers, M., 1999. Differential effects of lipopolysaccharide and cholecystokinin on sucrose intake and palatability. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 277, R705–R715.
 31. De la Gándara, F., 2006. Situación actual de la acuicultura. En: Zamora, S., Martínez, F.J. and Rubio, V.C. (Eds.). *Acuicultura III: cultivo y alimentación de peces*, pp. 15–38.
 32. Días, J., Álvarez, M.J., Díez, A., Ariel, J., Corraze, G., Bautista, J.M., Kaushik, S.J., 1998. Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein/energy juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 161, 169–186.
 33. Eales, J.G., 1985. The peripheral metabolism of thyroid hormones and regulation of thyroidal status in poikilotherms. *Can. J. Zool.* 63, 1217–1231.
 34. Eales, J.G., Higgs, D.A., Uin, L.M., MacLatchy, D.L., Bres, O., McBride, J.R., Dosanjh, B.S., 1990. Influence of dietary lipid and carbohydrate levels and chronic 3,5,3'-triiodo-L-thyronine treatment on thyroid function in immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 80, 146–154.
 35. Eales, J.G., MacLatchy, D.L., Higgs, D.A., Dosanjh, B.S., 1992. The influence of dietary protein and caloric content on thyroid function and hepatic thyroxine 5'-monodeiodinase activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Can. J. Zool.* 70, 1526–1535.
 36. Eales, J.G., MacLatchy, D.L., Sweeting, R.M., 1993. Thyroid hormone deiodinase systems in salmonids, and their involvement in the regulation of thyroidal status. *Fish Physiol. Biochem.* 11, 313–321.

37. Eilertson, C.D., Sheridan, M.A., 1995. Pancreatic somatostatin-14 and somatostatin-25 release in rainbow trout is stimulated by glucose and arginine. *Am. J. Physiol.* 269, R1019–R1023.
38. Francis, G., Makkar, H.P.S. and Becker, K., 2001. Antinutritional factors present in plant derived alternative fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, 197–227.
39. Francis, D.S., Turchini, G.M., Jones, P.L., De Silva, S.S., 2006. Effects of dietary oil source on growth and fillet fatty acid composition of Murray cod, *Maccullochella peelii peelii*. *Aquaculture* 253, 547–556.
40. Geurden, I., Cuvier, A., Gondouin, E., Olsen, R.E., Ruohonen, K., Kaushik, S., Boujard. Rainbow trout can discriminate between feeds with different oil sources. *Physiol. Behav.* 2005; 85: 107-114.
41. Geurden I., Corraze G., Boujard T., In Press. Self-feeding behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, offered diets with distinct feed oils. *Applied Animal Behaviour Science* doi:10.1016/j.applanim.2006.12.006.
42. Gietzen, D.W., 2000. Amino acid recognition in the central nervous system. En: *Neural and Metabolic Control of Macronutrient Intake*. Berthoud, H.-R. y Seeley, R.J. (Eds.). CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 339–357.
43. Gutiérrez, J., Plisetskaya, E.M., 1991. Insulin binding to liver plasma membranes in salmonids with modified plasma insulin levels. *Can. J. Zool.* 69, 2745–2750.
44. Harmon, J.S., Eilertson, C.D., Sheridan, M.A., Plisetskaya, E.M., 1991. Insulin suppression is associated with hypersomatostatinemia and hyperglucagonemia in glucose-injected rainbow trout. *Am. J. Physiol.* 261, R609–R613.
45. Hernández, M.D., 2006. El cultivo de una especie omnívora: el sargo picudo (*Diplodus puntazzo*). En: Zamora, S., Martínez, F.J. and Rubio, V.C. (Eds.). *Acuicultura III: cultivo y alimentación de peces*, pp. 97–114.
46. Hernández, M.D., Egea, M.A., Rueda, F.M., Aguado, F., Martínez, F.J. and García, B., 2001a. Effect of commercial diets with different P/E ration on sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) growth and nutrient utilization. *Aquaculture* 195, 321–329.
47. Hernández, M.D., Martínez, F.J., García García, B., 2001b. Sensory evaluation of farmed sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Aquaculture International* 9, 519–529.
48. Hernández, M.D. García García, B., Martínez, F.J., Jover, M., 2005. Efecto del contenido en lípidos de la dieta sobre el crecimiento y la composición corporal en el sargo picudo (*Diplodus puntazzo*). Libro de actas del IX Congreso Nacional de Acuicultura. pp. 107–110.

49. Hernández, M.D., Martínez, F.J., Jover, M., García García, B., 2007. Effects of partial replacement of fish meal by soybean meal in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) diet. *Aquaculture* 263, 159–167.
50. Higgs, D.A., Eales, J.G., 1979. Influence of diet composition on radiothyrosine kinetics in brook trout *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). *Can. J. Zool.* 57, 396–402.
51. Higgs, D.A., Dosanjh, B.S., Uin, L.M., Himick, B.A., Eales, J.G., 1992. Effects of dietary lipid and carbohydrate levels and chronic 3,5,3'-triiodo-L-thyronine treatment on growth, appetite, food and protein utilization and body composition of immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, at low temperature. *Aquaculture* 105, 175–190.
52. Himick, B.A., Eales, J.G., 1990. The acute effects of food and glucose challenge on plasma thyroxine and triiodothyronine levels in previously starved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 78, 34–41.
53. Himick, B.A., Higos, D.A., Eales, J.G., 1991. The acute effects of alteration in the dietary concentrations of carbohydrate, protein and lipid on plasma T4, T3 and glucose levels in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 82, 451–458.
54. Höfer, D., Püschel, B., Drenckhahn, D., 1996. Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of α -gustducin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 93, 6631–6634.
55. Huether, G., 1994. Melatonin synthesis in the gastrointestinal tract and the impact of nutritional factors on circulating melatonin. En: *The aging clock. The pineal gland and other pacemakers in the progression of aging and carcinogenesis*. Pierpaoli, W., Regelson, W., Fabris, N. (Eds.). The New York Academy of Sciences, New York, pp. 146–158.
56. Ince, B.W., 1980. Amino acid stimulation of insulin secretion from the in situ perfused eel pancreas; modification by somatostatin, adrenaline, and theophylline. *Gen. Comp. Endocrinol.* 40, 275–282.
57. Ince, B.W., So, S., 1984. Differential secretion of glucagons-like and somatostatin-like immunoreactivity from the perfused eel pancreas in response to D-glucose. *Gen. Comp. Endocrinol.* 53, 389–397.
58. Izquierdo, M.S., Obach, A., Arantzamendi, L., Montero, D., Robaina, L., Rosenlund, G., 2003. Dietary lipid sources for seabream and seabass: growth performance, tissue composition and flesh quality. *Aquacult. Nutr.* 9, 397–407.
59. Izquierdo, M.S., Montero, D., Robaina, L., Caballero, MJ, Rosenlund, G, Gine's, R., 2005. Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture* 250, 431–444.

60. Jeanningros, R., 1982. Vagal unitary responses to intestinal amino acid infusions in the anesthetized cat: a putative signal for protein induced satiety. *Physiol. Behav.* 28, 9–21.
61. Johansen, S.J.S., Sveier, H., Jobling, M., 2003. Lipostatic regulation of feed intake in Atlantic salmon *Salmo salar* L. Defending adiposity at the expense of growth?. *Aquacult. Res.* 34, 317–331.
62. Kalogeropoulos, N., Alexis, M.N., Henderson, R.J., 1992. Effects of dietary soybean and cod-liver oil levels on growth and body composition of gilthead bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 104, 293–308.
63. Kasumyan, A.O., 1997. Gustatory reception and feeding behaviour in fish. *Journal of Ichthyology* 37, 72–86.
64. Kaushik, S.J., Cravedi, J.P., Lalles, J.P., Sumpter, J., Fauconneau, B., Laroche, M., 1995. Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 133, 257–274.
65. Kezuka, H., Iigo, I., Furukawa, K., Aida, K. y Hanyu, I., 1992. Effects of photoperiod, pinealectomy and opthalmectomy on circulating melatonin rhythms in the goldfish (*Carassius auratus*). *Zoological Science* 9, 1147–1153.
66. Labbe C., Loir M., Kaushik S., Maise G., 1993. The influence of both rearing temperatura and dietary lipid origin on fatty acid composition of spermatozoan polar lipids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Effect on sperm cryopreservation tolerance. In Kaushik SJ, Luquet P (eds.). *Fish Nutrition in Practice*, INRA, Paris, pp. 49–59.
67. Lamb, C.F., 2001. Gustation and feeding behaviour. In: Houlihan, D., Boujard, T., Jobling, M., editors. *Food intake in fish*. Great Britain: Blackwell Science, pp. 108–130.
68. Leatherland, J.F., Cho, Y., Hilton, J., 1984. Effect of diet on serum thyroid hormone levels in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardason). *Comp. Biochem. Physiol.* 78A, 601–605.
69. Likimani, T.A., Wilson, R., 1982. Effects of diet on lipogenic enzyme activities in channel catfish hepatic and adipose tissue. *J. Nutr.* 112, 112–117.
70. Lin, H., Romsos, D.R., Tack, P.I., Leveille, G.A., 1977. Influence of diet on *in vitro* and *in vivo* rates of fatty acids synthesis in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum). *J. Nutr.* 107, 1677–1682.
71. Luz, R.K.; Boluda-Navarro, D.; Sánchez-Vázquez, F.J.; Portella, M.C.; Zamora, S.; Madrid, J.A. Selection of diets made of different plant oils in adults and juveniles European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, L. *Aquaculture Europe´04—Biotechnology for Quality*, 20-23 October, Barcelona, Spain. Extended abstracts and short communications. Special publication N° 34; pp. 512-513.

72. Machado, C.R., Garofalo, M.A.R., Roselino, J.E.S., Kettelhut, I.C., Migliorini, R.H., 1988. Effects of starvation, refeeding and insulin on energy-linked metabolic processes in catfish (*Rhamdia hilarii*) adapted to a carbohydrate-rich diet. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71, 429–437.
73. Martin, M.T., Azpiroz, F., Malagelada, J.R., 1998. Melatonin in the gastrointestinal tract. *Thérapie* 53, 453–458.
74. Martínez, S., 2005. Contribución al estudio del crecimiento y aprovechamiento nutritivo de la dorada (*Sparus aurata*, L.) alimentada con piensos con diferentes fuentes proteicas y lipídicas. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, pp. 204
75. MacKenzie, D.S., VanPutte, C.M., Leiner, K.A., 1998. Nutrient regulation of endocrine function in fish. *Aquaculture* 161, 3–25.
76. Mei, N., 1978. Vagal glucoreceptors in the small intestine of the cat. *Journal of Physiology, London*, 282, 485.
77. Melone, J., 1986. Vagal receptors sensitive to lipids in the small intestine of the cat. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 17, 231.
78. Melroe, G.T., Ehrman, M.M., Kittilson, J.D., Sheridan, M.A., 2000. Glucose regulates pancreatic preprosomatostatin I expression. *FEBS Lett.* 465, 115–118.
79. Mena Sellés, C., García García, B., 2002. Importancia de la proteína vegetal en la dieta natural de poblaciones salvajes de Sargo picudo *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777): sus implicaciones en el cultivo intensivo. *Revista AquaTIC* 17 October 2002 (<http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=152>).
80. Menoyo D., 2004. Utilización de aceites vegetales en la alimentación del salmon atlántico (*Salmo salar* L.): efectos sobre el metabolismo y la calidad. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. Tesis Doctoral.
81. Miglavs I, Jobling M., 1989. The effects of feeding regime on proximate body composition and patterns of energy deposition in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *J Fish Biol.* 35, 1–11.
82. Montero, D., Kalinowski, T., Obach, A., Robaina, L., Tort, L., Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., 2003. Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health. *Aquaculture* 225, 353–370.
83. Montero, D., Robaina, L., Caballero, M.J., Ginés, R., Izquierdo, M.S., 2005. Growth, feed utilization and flesh quality of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing vegetable oils: a time course study on the effect of re-feeding period with a 100% fish oil diet. *Aquaculture* 248, 121–134.
84. Mørkøre, T., Netteberg, Ch., Johnsson, L., Pickova, J., 2007. Impact of dietary oil source on product quality of farmed Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture* 267, 236-247.
85. Mourente, G., Bell, J.G., 2006. Partial replacement of dietary fish oil with blends of vegetable oils (rapeseed, linseed and palm oils) in diets for European sea bass

- (*Dicentrarchus labrax L.*) over the whole production cycle: effects on flesh and liver fatty acid composition and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Comp. Biochem. Physiol.* 145B, 389–399.
86. Mourente, G., Dick, J.R., 2003. Influence of partial substitution of dietary fish oil by vegetable oils on the metabolism (desaturation and β -oxidation) of [1-14C]18:3n-3 in isolated hepatocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *Fish Physiol. Biochem.* 26, 297–308.
 87. Mourente, G., Dick, J.R., Bell, J.G., Tocher, D.R., 2005. Effect of partial substitution of dietary fish oil by vegetable oils on desaturation and β -oxidation of [1-14C] 18:3n-3 (LNA) and [1-14C] 20:5n-3 (EPA) in hepatocytes and enterocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *Aquaculture* 248, 173–186.
 88. Narnaware, Y.K., Peter, R.E., 2001. Neuropeptide Y stimulates food consumption through multiple receptors in goldfish. *Physiol. & Behav.* 74, 185–190.
 89. National Research Council (NRC), 1993. *Nutrient Requirements of Fish*. National Academy Press, Washington D.C., USA.
 90. Nelson, L., Sheridan, M.A., 2005. Regulation of somatostins and their receptors in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 117–133.
 91. Ng, W.K., Wang, Y., Ketchimenin, P., Yuen, K.H., 2004. Replacement of dietary fish oil with palm fatty acid distillate elevates tocopherol and tocotrienol concentrations and increases oxidative stability in the muscle of African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture* 233, 423–437.
 92. Olsen, R.E., Ringo, E., 1992. Lipids of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L. II. Influence of dietary fatty acids on the elongation and desaturation of linoleic and linolenic acids. *Fish Physiol. Biochem.* 9, 393–399.
 93. Panserat, S., Perrin, A., Kaushik, S., 2002. High dietary lipids induce liver Glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Nutr.* 132, 137–141.
 94. Parpoura, A.C.R., Alexis, M.N., 2001. Effects of different dietary oils in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) nutrition. *Aquac. Int.* 9, 463–476.
 95. Pérez-Sánchez, J., Martí-Palanca, H., Kaushik, S.J., 1995. Ration size and protein intake effect circulating growth hormone concentration, hepatic growth hormone binding and plasma insulin-like growth factor-I immunoreactivity in a marine teleost, the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *J. Nutr.* 125, 546–552.
 96. Peyon, P., Saied, H., Lin, X., Peter, R.E., 1999. Postprandial variation in cholecystokinin gene expression in goldfish brain. *Molecular Brain Research* 74, 190–196.
 97. Pickett, G.D. y Pawson, M.G., 1994. *Sea bass. Biology, exploitation and conservation*. Chapman & Hall, London.

98. Piedecausa, M.A., Mazón, M.J., García García, B., Hernández, M.D., 2007. Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) diets. *Aquaculture* 263, 211–219.
99. Plisetskaya, E.M., Buchelli-Narvaez, L.I., Hardy, R.W., Dickhoff, W.W., 1991. Effects of injected and dietary arginine on plasma insulin levels and growth of Pacific salmon and rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. A* 98, 165–170.
100. Regost, C., Arzel, J., Robin, J., Rosenlund, G., Kaushik, S.J., 2003. Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*): 1. Growth performance, flesh fatty acid profile, and lipid metabolism. *Aquaculture* 217, 465–482.
101. Richard, N., Kaushik, S., Larroquet, L., Panserat, S., Corraze, G., 2006a. Replacing dietary fish oil by vegetable oils has little effects on lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.* 96, 299–309.
102. Richard, N., Mourente, G., Kaushik, S., Corraze, G., 2006b. Replacement of a large portion of fish oil by vegetable oils does not affect lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *Aquaculture* 261, 1077–1087.
103. Riley, W.W.Jr., Higgs, D.A., Dosanjh, B.S., Eales, J.G., 1993. Influence of dietary amino acid composition on thyroid function of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 112, 253–269.
101. Robaina, L., Izquierdo, M.S., Moyano, F.J., Socorro, J., Vergara, J.M., Montero, D., Fernández-Palacios, H., 1995. Soybean and lupin seed meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implications. *Aquaculture* 130, 219–233.
102. Robaina, L., Izquierdo, M.S., Moyano, F.J., Socorro, J., Vergara, J.M., Montero, D., 1998. Increase of the dietary n-3/n-6 fatty acid ratio and addition of phosphorus improves liver histological alterations induced by feeding diets containing soybean meal to gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 161, 281–293.
103. Rodgers, B.D., Helms, L.M.H., Grau, E.G., 1992. Effects of fasting, medium glucose, and amino acid concentrations on prolactin and growth hormone release, in vitro, from the pituitary of the tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 86, 344–351.
104. Rodríguez, C., Pérez, J.A., Henderson, J., 2002. The esterification of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids by hepatocytes and liver microsomes of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 132, 559–570.
105. Rollin, X., Médale, F., Gutierrez, S., Blanc, D., Kaushik, S.J., 2003. Short-and long-term nutritional modulation of acetyl-CoA carboxylase activity in selected tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.* 89, 803–810.

106. Rolls, E.T., 2000. Taste, olfactory, visual and somatosensory representations of the sensory properties of foods in the brain, and their relation to the control of food intake. En: *Neural and Metabolic Control of Macronutrient Intake*. Berthoud, H.-R. y Seeley, R.J. (Eds.). CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 247–262.
107. Rondán, M., Hernández, M.D., Egea, M.A., García, B., Rueda, F.M., Martínez, F.J., 2004a. Effect of feeding rate on fatty acid composition of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Aquaculture Nutrition* 10, 301–307.
108. Rondán, M., Hernández, M.D., Egea, M.A., García, B., Jover, M., Rueda, F.M., Martínez, F.J., 2004b. Effects of fishmeal replacement with soybean meal as protein source, and protein replacement with carbohydrates as an alternative energy source on sharpsnout sea bream, *Diplodus puntazzo*, fatty acid profile. *Aquac. Res.* 35, 1220–7.
109. Ronner, P., Scarpa, A., 1987. Secretagogues for pancreatic hormone release in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 65, 354–362.
110. Rubio, V.C., 2004. Regulación de la ingesta de macronutrientes en peces teleósteos. Influencia de factores ambientales, nutricionales y neuroendocrinos. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
111. 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.
112. Rubio, V.C., Vivas, M., Sánchez-Mut, A., Sánchez-Vázquez, F.J., Covés, D., Dutto, G., Madrid, J.A., 2004. Self-feeding of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) under laboratory and farming conditions using a string sensor. *Aquaculture* 233, 393–403.
113. 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.
114. Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J., Madrid, J.A., 2006. Influence of nutrient preload on encapsulated macronutrient selection in European sea bass. *Physiol. Behav.* 89, 662–669.
115. Sala, E., Ballesteros, E., 1997. Partitioning of space and food resources by three fish of the genus *Diplodus* (*Sparidae*) in a Mediterranean rocky infralitoral ecosystem. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 152, 273–283.
116. Sánchez-Vázquez, F.J., Yamamoto, T., Akiyama, T., Madrid, J.A., 1998. Selection of macronutrients by goldfish operating self-feeders. *Physiol. Behav.* 65, 211–218.
117. 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.

118. Sargent, J.R., Tacon, A.G.J., 1999. Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *Proc. Nutr. Soc.* 58, 377–383.
119. Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., Tocher, D., 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179, 217–229.
120. Seeley, R.J., Berthoud, H.R., 2000. Neural and metabolic of macronutrient selection: consensus and controversy. In: *Neural and Metabolic Control of Macronutrient Intake*. Berthoud, H.R., and Seeley, R.J. (Eds.). CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 489–496.
121. Sheridan, M.A., Kittilson, J.D., 2004. The role of somatostatins in the regulation of metabolism in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 138, 323–330.
122. Simpson, S.J., Raubenheimer, D., 2000. Geometric models of macronutrient selection. En: *Neural and Metabolic Control of Macronutrient Intake*. Berthoud, H.-R. y Seeley, R.J. (Eds.). CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 29–42.
123. Smith, B.K., York, D.A., Bray, G.A., 1999. Activation of hypothalamic serotonin receptors reduced intake of dietary fat and protein but not carbohydrate. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 277, R802–R811.
124. Storebakken, T., 2002. Atlantic salmon (*Salmo salar*). In: *Nutrient Requirements and Feeding and Finfish for Aquaculture*. CAB International, Oxon UK, pp. 79–102.
125. Tacon, A.G.J., 2004. Use of fish meal and fish oil in aquaculture: a global perspective. *Aquat. Res. Cult. Dev.* 1, 3–14.
126. Thibault, L., Booth, D.A., 1999. Macronutrient-specific dietary selection in rodents and its neural bases. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 23, 457–528.
127. Thissen, J.P., Ketelslegers, J.M., Underwood, L.E., 1994. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr. Rev.* 15, 80–101.
128. Tibaldi, E., Hakim, Y., Uni, Z., Tulli, F., de Francesco, M., Luzzana, U., Harpaz, S., 2006. Effects of the partial substitution of dietary fish meal by differently processed soybean meals on growth performance, nutrient digestibility and activity of intestinal brush border enzymes in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 261, 182–193.
129. Tocher, D.R., Bell, J.G., Dick, J.R., Sargent, J.R., 1997. Fatty acyl desaturation in isolated hepatocytes from Atlantic salmon (*Salmo salar*): stimulation by dietary borage oil containing γ -linolenic acid. *Lipids* 32, 1237–1247.
130. Tocher, D.R., Bell, J.G., Henderson, R.J., McGhee, F., Mitchell, D., Morris, P.C., 2000. The effect of dietary linseed and rapeseed oils on polyunsaturated fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) undergoing parr-smolt transformation. *Fish Physiol. Biochem.* 23, 59–73.

131. Tocher, D.R., Bell, J.G., MacGlaughlin, P., McGhee, F., Dick, J.R., 2001. Hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition of liver in salmonids: effects of dietary vegetable oil. *Comp. Biochem. Physiol. B* 130, 257–270.
132. Tocher, D.R., Bell, J.G., Dick, J.R., Crampton, V.O., 2003. Effects of dietary vegetable oil on Atlantic salmon hepatocyte fatty acid desaturation and liver fatty acid compositions. *Lipids* 38, 723–732.
133. Torrejón Atienza, M., Chatzifotis, S., Divanach, P., 2004. Macronutrient selection by sharp snout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Aquaculture* 232, 481–491.
134. Torstensen, B.E., Lie, Ø., Frøyland, L., 2000. Lipid metabolism and tissue composition in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) — effects of capelin oil, palm oil, and oleic acid-enriched sunflower oil as dietary lipid sources. *Lipids* 35, 653–664.
135. Tramati, C., Savona, B., Mazzola, A., 2005. A study of the pattern of digestive enzymes in *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777)(*Osteichhyes, Sparidae*): evidence for the definition of nutritional protocols. *Aquaculture International* 13, 89–95.
136. Turchini, G.M., Mentasti, T., Frøyland, L., Orban, E., Caprino, F., Moretti, V.M., Valfre, F., 2003. Effects of alternative dietary lipid sources on performance, tissue chemical composition, mitochondrial fatty acid oxidation capabilities and sensory characteristic in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquaculture* 225, 251–267.
137. Vera, L.M., Madrid, J.A., Sánchez-Vázquez, F.J., 2006. Locomotor, feeding and melatonin daily rhythms in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Physiol. Behav.* 88, 167–172.
138. Vivas, M., Sánchez-Vázquez, F.J., García García, B., Madrid, J.A. 2003. Macronutrient self-selection in European sea bass in response to dietary protein or fat restriction. *Aquac. Res.* 34, 271–80.
139. 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.
140. Watanabe, T., 2002. Strategies for further development of aquatic feeds. *Fisheries Sci.* 68, 242–252.
141. Watanabe, T., Verakunpiriya, V., Watanabe, K., Viswanath, K., Satoh, S., 1998. Feeding of rainbow trout with non-fish meal diets. *Fish. Sci.* 63, 258–266.
142. Wester, T.J., Britton, R.A., Klopfenstein, T.J., Ham, G.A., Hickok, D.T., Krehbiel, C.R., 1995. Differential effects plane of protein or energy nutrition on visceral organs and hormones in lambs. *J. Anim. Sci.* 73, 1674–1688.
143. White, B.D., He, B., Dean, R.G., Martin, R.J., 1994. Low protein diets increase neuropeptide-Y gene expression in the basomedial hypothalamus of rats. *J. Nutr.* 124, 1152–1160.

144. Yamamoto, T., Shima, T., Furuita, H., Shiraishi, M., Sánchez-Vázquez, F.J., and Tabata, M., 2001. Influence of decreasing water temperature and shortening of the light phase on macronutrient self-selection by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and common carp *Cyprinus carpio*. *Fisheries Science* 67, 420–429.
145. Yildiz, M., Sener, E., 1997. Effect of dietary supplementation with soybean oil, sunflower oil or fish oil on the growth of seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). Workshop of the CIHEAM Network on Technology of Aquaculture in the Mediterranean, 24–26 June, Zaragoza, Spain. 9 pp.
146. Zheng, X., Seilliez, I., Hastings, N., Tocher, D.R., Panserat, S., Dickson, C.A., Bergot, P., Teale, A.J., 2004a. Characterization and comparison of fatty acyl D6 desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* 139B, 269–279.
147. Zheng, X., Tocher, D.R., Dickson, C.A., Bell, J.G., Teale, A.J., 2004b. Effects of diets containing vegetable oil on expression of genes involved in highly unsaturated fatty acid biosynthesis in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 236, 467–483.



Producción científica

El contenido de la presente Tesis Doctoral ha dado lugar a la siguiente producción científica:

1. Publicaciones:

- 1.1. 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 on gelatine capsules and challenged with protein dilution. *Physiol. Behav.* 88, 550—558.
- 1.2. Almaida-Pagán, P.F., Seco-Rovira, V., Hernández, M.D., Madrid, J.A., de Costa, J., Mendiola, P., In Press. Energy intake and macronutrient selection in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) challenged with fat dilution and fat deprivation using encapsulated diets. *Physiol. Behav.* doi:10.1016/j.physbeh.2007.10.006.
- 1.3. Almaida-Pagán, P.F., Hernández, M.D., García García, B., Madrid, J.A., de Costa, J., Mendiola, P., 2007. Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils on n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid desaturation and elongation in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) hepatocytes and enterocytes. *Aquaculture* 272, 589—598.
- 1.4. Almaida-Pagán, P.F., Hernández, M.D., Madrid, J.A., de Costa, J., Mendiola, P. Sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) ability for different oil sources discrimination using encapsulated complete diets. Enviado a *Physiol. Behav.*

2. Comunicaciones a Congresos:

- 2.1. Almaida-Pagán, P.F., Rubio, V.C., Madrid, J.A., Mendiola, P., de Costa, J., 2004. Ability of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) to select macronutrient by feeding on gelatine capsules. Aquaculture Europe 2004, "Biotechnologies for Quality". Barcelona, España, Special Publication nº 34, pp. 112—113.
- 2.2. Almaida-Pagán, P.F., Seco-Rovira, V., Madrid, J.A., de Costa, J., Mendiola, P., 2005. Selección de macronutrientes a través de señales postingestivas: Efecto de la dilución de proteína, dilución de grasa y ayuno de grasa en el sargo picudo (*Diplodus puntazzo*). X Congreso Nacional de Acuicultura, Gandía (Valencia) 2005. Libro de Resúmenes, pp. 164—165.
- 2.3. Almaida-Pagán, P.F., Hernández, M.D., García García, B., Madrid, J.A., de Costa, J., Mendiola, P., 2007. Efecto de la sustitución total de aceite de pescado por aceites vegetales sobre las actividades de desaturación/elongación de hígado y digestivo del sargo picudo (*Diplodus puntazzo*). XI Congreso Nacional Acuicultura, Vigo 2007. Libro de Resúmenes, pp. 1221—1224.
- 2.4. Seco-Rovira, V., Almaida-Pagán, P.F., de Costa, J., Mendiola, P., 2007. Efecto de inhibidores metabólicos: Mercaptoacetato y 2-Desoxi-D-Glucosa, sobre la ingesta de alimento en el carpín. XI Congreso Nacional Acuicultura, Vigo 2007. Libro de Resúmenes, pp. 75—78.

3. Becas y contratos de investigación.

- 3.1. Beca de Postgrado para la Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Ciencia. Convocatoria 2002. Referencia: AP2002-1368. Duración 4 años. Transcurridos tres años y cinco meses de la misma se convirtió en el contrato que se señala a continuación.
- 3.2. Contrato de trabajo en prácticas con la Universidad de Murcia a través del programa FPU del Ministerio de Educación y Ciencia. Duración: 7 meses.
- 3.3. Contrato de trabajo de duración determinada con la Universidad de Murcia para la Colaboración en el Proyecto de Investigación "Red temática de investigación cooperativa en envejecimiento y fragilidad. RETICEF". Duración: 4 meses.

4. Participación en tareas docentes.

Participación en tareas docentes haciendo uso de la *venia docendi* del programa FPU del Ministerio de Educación y Ciencia. 120 horas. 2004-06.

5. Estancias breves.

Estancia breve dentro del programa FPU del Ministerio de Educación y Ciencia, en el Departamento de Biología Animal de la Facultad de Biología, Universidad de la Laguna, Tenerife, con el fin de trabajar en técnicas de determinación de lípidos a partir de muestras biológicas, así como de caracterización del metabolismo de ácidos grasos y seguimiento de actividad desaturasa en peces. Mayo-Julio 2004.

Apéndice


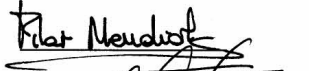

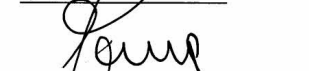


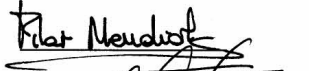

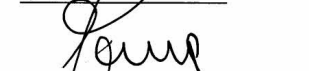


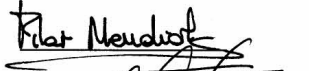

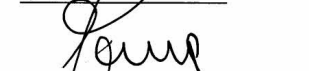


1. Índice de impacto de las revistas donde han sido publicados los artículos que componen esta Tesis Doctoral.



Mark	Journal Title	ISSN	Total Cites	Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Citing Half-life
<input checked="" type="checkbox"/>	PHYSIOL BEHAV	0031-9384	12057	2.445	0.316	301	>10.0	9.1
Cited Journal Citing Journal Source Data								
Journal Information								
Full Journal Title:PHYSIOLOGY & BEHAVIOR ISO Abbrev. Title:Physiol. Behav. JCR Abbrev. Title:PHYSIOL BEHAV ISSN:0031-9384 Issues/Year: 12 Language: MULTI-LANGUAGE Journal Country/Territory: UNITED STATES Publisher: PERGAMON-ELSEVIER SCIENCE LTD Publisher Address: THE BOULEVARD, LANGFORD LANE, KIDLINGTON, OXFORD OX5 1GB, ENGLAND Subject Categories: BEHAVIORAL SCIENCES								

Mark	Journal Title	ISSN	Total Cites	Factor	Immediacy Index	Articles	Half-life	Half-life
<input checked="" type="checkbox"/>	AQUACULTURE	0044-8486	15143	2.081	0.247	787	8.0	9.4
Cited Journal Citing Journal Source Data								
CITED JOURNAL DATA								
Journal Information								
Full Journal Title:AQUACULTURE ISO Abbrev. Title:Aquaculture JCR Abbrev. Title:AQUACULTURE ISSN:0044-8486 Issues/Year: 24 Language: MULTI-LANGUAGE Journal Country/Territory: NETHERLANDS Publisher: ELSEVIER SCIENCE BV Publisher Address: PO BOX 211, 1000 AE AMSTERDAM, NETHERLANDS Subject Categories: FISHERIES MARINE & FRESHWATER BIOLOGY								

2. Autorización de los co-autores que han participado en las publicaciones.

	UNIVERSIDAD DE MURCIA DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA UNIDAD DOCENTE DE FISIOLÓGIA ANIMAL <i>Facultad de Biología</i>										
<p>Murcia, 8 de Octubre de 2007,</p> <p>A la Comisión General de Doctorado,</p> <p>Los abajo firmantes, DECLARAN:</p> <p>Que el trabajo realizado en la tesis: "Caracterización del potencial metabólico y regulador de la ingesta del sargo picudo (<i>Diplodus puntazzo</i>)" es original y ha sido realizado fundamentalmente por el autor de la misma, Pedro Francisco Almaida Pagán. Los co-autores, certifican que los artículos contenidos en la presente tesis, no serán presentados en ninguna otra tesis.</p> <table><tr><td>1. Pilar Mendiola López.</td><td></td></tr><tr><td>2. Jorge de Costa Ruíz.</td><td></td></tr><tr><td>3. Juan Antonio Madrid Pérez.</td><td></td></tr><tr><td>4. Vera Cruz Rubio Fernández.</td><td></td></tr><tr><td>5. Vicente Seco Rovira.</td><td></td></tr></table>		1. Pilar Mendiola López.		2. Jorge de Costa Ruíz.		3. Juan Antonio Madrid Pérez.		4. Vera Cruz Rubio Fernández.		5. Vicente Seco Rovira.	
1. Pilar Mendiola López.											
2. Jorge de Costa Ruíz.											
3. Juan Antonio Madrid Pérez.											
4. Vera Cruz Rubio Fernández.											
5. Vicente Seco Rovira.											
<hr/> <p><i>Campus de Espinardo • 30100 Murcia • Teléfono: 968 36 49 31 • Fax: 968 36 39 63</i></p>											



Región de Murcia
Consejería de Agricultura y Agua



Instituto Murciano de Investigación y
Desarrollo Agrario y Alimentario.

Murcia, 8 de Octubre de 2007,

A la Comisión General de Doctorado,

Los abajo firmantes, DECLARAN:

Que el trabajo realizado en la tesis: **"Caracterización del potencial metabólico y regulador de la ingesta del sargo picudo (*Diplodus puntazzo*)"** es original y ha sido realizado fundamentalmente por el autor de la misma, Pedro Francisco Almáida Pagán. Los co-autores, certifican que los artículos contenidos en la presente tesis, no serán presentados en ninguna otra tesis.

1. María Dolores Hernández Llorente.

2. Benjamín García García.

