

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA DE LA
REPRODUCCIÓ DE TELEÓSTEOS

EFFECTO DEL CONTENIDO LIPÍDICO DE LAS DIETAS
ADMINISTRADAS A REPRODUCTORES DE LUBINA
(DICENTRARCHUS LABRAX L.) SOBRE EL PROCESO
REPRODUCTOR Y SOBRE LA CALIDAD Y COMPOSICIÓ
DE LOS HUEVOS

JOSÉ MARÍA NAVAS ANTÓN

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2003

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 11
d'Abril de 1997 davant un tribunal format per:

- Dr. D. Antonio Núñez Cachaza
- Dra. D^a. Silvia Zanuy Doste
- Dr. D. Salvador Zamora Navarro
- Dr. D. Niall Bromage
- Dr. D. Juan Javier Díaz Mayans

Va ser dirigida per:
Manuel Carrillo Estévez

©Copyright: Servei de Publicacions
José María Navas Antón

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5760-4

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAT DE C.C. BIOLÒGICQUES



Efecto del Contenido Lipídico de las
Diets Administradas a Reproductores
de Lubina (*Dicentrarchus labrax* L.)
sobre el Proceso Reproductor y sobre
la Calidad y Composición de los
Huevos.

TESIS DOCTORAL

José María Navas Antón

València, 1927

Universitat de València

FACULTAT DE C.C. BIOLÒGIQUES

**EFFECTO DEL CONTENIDO LIPÍDICO DE LAS
DIETAS ADMINISTRADAS A REPRODUCTORES DE
LUBINA (*Dicentrarchus labrax* L.) SOBRE EL
PROCESO REPRODUCTOR Y SOBRE LA CALIDAD Y
COMPOSICIÓN DE LOS HUEVOS.**

TESIS DOCTORAL

José María Navas Antón

València, 1997

Universitat de València

FACULTAT DE C.C. BIOLÒGIQUES

**EFFECTO DEL CONTENIDO LIPÍDICO DE LAS
DIETAS ADMINISTRADAS A REPRODUCTORES DE
LUBINA (*Dicentrarchus labrax* L.) SOBRE EL
PROCESO REPRODUCTOR Y SOBRE LA CALIDAD Y
COMPOSICIÓN DE LOS HUEVOS.**

TESIS DOCTORAL

José María Navas Antón

València, 1997

Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

**EFECTO DEL CONTENIDO LIPÍDICO DE LAS DIETAS
ADMINISTRADAS A REPRODUCTORES DE LUBINA
(*Dicentrarchus labrax* L.) SOBRE EL PROCESO REPRODUCTOR Y
SOBRE LA CALIDAD Y COMPOSICIÓN DE LOS HUEVOS.**

José María Navas Antón

Valencia, abril de 1997

**Memoria presentada en el Departamento de Biología Animal, de la
Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia, para optar
al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, por**

José María Navas Antón

VºBº

El director del trabajo

**Dr. Manuel Carrillo Estévez
Profesor de Investigación del C.S.I.C.**

Valencia, Abril de 1997

El Dr. Manuel Carrillo Estévez, Profesor de Investigación del C.S.I.C., en el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (Castellón),

CERTIFICA:

Que D. José María Navas Antón, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Salamanca, ha realizado bajo su dirección, en el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, el trabajo de investigación presentado en esta memoria, para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Y para que así conste, firmo la presente

Dr. Manuel Carrillo Estévez

A mi madre y mis hermanos
A mi padre

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer, en primer lugar, al Dr. Manuel Carrillo y a la Dra. Silvia Zanuy su inestimable ayuda en la realización de este trabajo. Fueron ellos los que me brindaron la oportunidad de iniciar una tesis doctoral y a ellos debo buena parte de la formación científica que he adquirido en los últimos años. Me han facilitado, además, el establecimiento de relaciones con científicos y laboratorios extranjeros, lo cual ha supuesto un avance fenomenal en mi desarrollo intelectual y humano. Por otra parte, gracias a su constancia y dedicación, he visto cubiertas, sin ningún problema, todas las necesidades de instalaciones y material que tan especiales resultan en la investigación en acuicultura. Mi más sincero agradecimiento por todo ello.

También me gustaría expresar mi gratitud a los demás miembros del departamento de Fisiología de la Reproducción de Teleósteos. Al Dr. Jesús Ramos por su ayuda y la continua atención prestada para que las condiciones de las instalaciones fueran las ideales. Al Dr. Francesc Piferrer le he de agradecer, de una manera muy especial, su apoyo y su ánimo incondicional desde el momento en que se incorporó como investigador al equipo. A los doctores que se han formado en nuestro equipo y que ahora están trabajando en el extranjero, Joan Cerdá y Francisco Prat, por su asistencia desinteresada, muchas veces a costa de perder tiempo en sus propios experimentos, sobre todo en los aspectos técnicos de nuestro trabajo. Otro de los doctores que ahora están fuera, Evaristo Mañanós, no sólo hizo de guía, y muy bueno, en el laboratorio sino también, aunque de un modo un poco traumático, en mis inicios en los artes de la navegación a vela. Muchas gracias... Espero que sigamos saliendo al mar de vez en cuando; pero con menos viento y oleaje y sin peligro de que el barco se hunda por ser demasiado viejo. También he de dar las gracias a Amparo Gil, sobre todo por su paciencia a la hora de buscar y poner en orden todo el material del laboratorio.

A José Miguel Cerdá y a Mercedes Blázquez, los otros dos becarios con los que, desde un principio, compartí todo mi tiempo de trabajo, les quiero agradecer su ayuda y apoyo continuos pero sobre todo en esos primeros momentos que tan difíciles resultan siempre. A los demás becarios que se han ido incorporando al equipo, Johnny Asturiano, Alicia Felip, Lucinda Rodríguez y Jorge Mateos y a los doctores Gonzalo Martínez, Lisa Sorbera y Ferdinand Oyen me gustaría agradecerles no sólo su colaboración durante las horas de laboratorio,

sino también, y sobre todo, todos esos ratos buenos que hemos pasado juntos y que nos han convertido en algo más que simples compañeros de trabajo.

A los doctores Juan Carlos Navarro y Francisco Hontoria, a la Dr^a Rita María Ros (que tantas cosas me contó de su país) y al resto de becarios del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, Josep Calduch, Chimo Canales, Renato de Medeiros, Oswaldo Palenzuela, Manolo Redón, Pilar Muñoz, Concha Ríos e Inma Varó les tengo que dar las gracias por haber mostrado continuamente que el buen humor y las ganas de reír son tan importantes como el trabajo bien hecho. Espero que las discusiones y los chistes de cada comida, en todos los días de estos años no lleguen a olvidárseme nunca. Con Hilario Martí y Carlos Barata compartí no solo momentos de trabajo, sino también los que se pasan en un piso de estudiantes. Me gustaría agradecerles ese empeño, quizás inconsciente, por hacer que cada instante se convirtiera en una pequeña aventura, desde levantarnos cada mañana hasta encender cada noche el fuego.

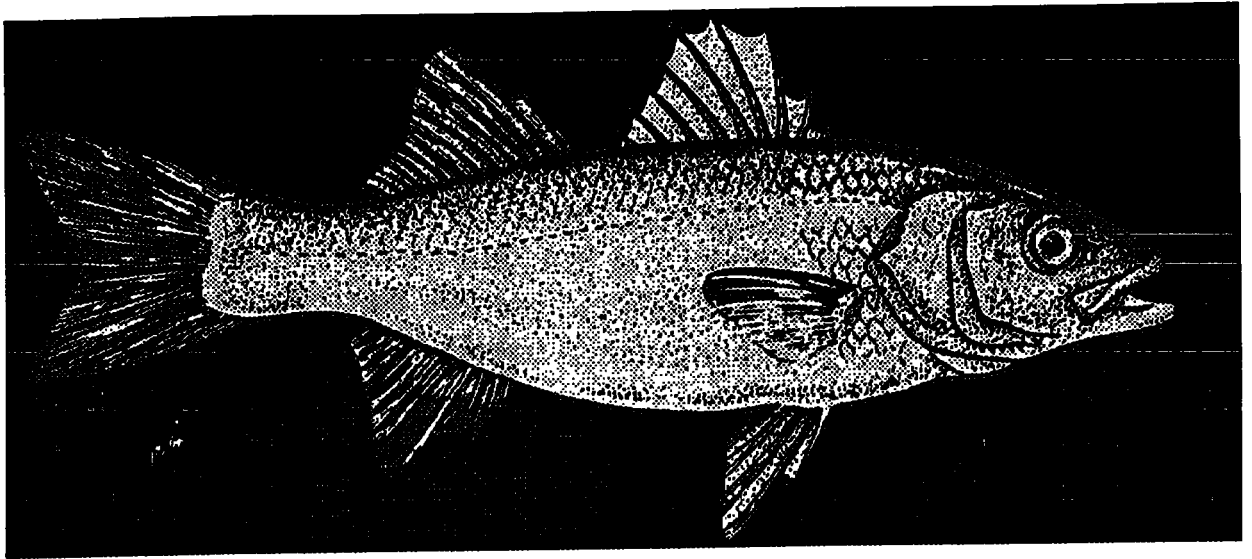
También quiero dar las gracias a todo el personal de los diferentes servicios del Instituto: a Angelines en la biblioteca (por su ayuda siempre que he necesitado cualquier libro o revista); a Miguel Angel, Xavi y Santiago en análisis químicos (por las conversaciones sanas y divertidas); a Vicenta, Rosa y Mercedes en limpieza (a las que me gustaría no haber dado demasiado trabajo); a José, Manolo y Chimo en vigilancia (por su charla y compañía cuando tocó trabajar a deshoras); a Manolo, Luis, Antonio, Emilio, Chimo y Angel en mantenimiento (que siempre estuvieron dispuestos a arreglar el rastro de averías que un becario va dejando detrás de vez en cuando); a José María, Juan Antonio, Ramón, Chimo y Conrado en animalario (que se encargaron de que los peces estuvieran bien cuidados y me ayudaron en mis muestreos); a Antonio en informática (que mantuvo en buen estado los ordenadores, a pesar de que en el disco duro ya no cabían ni los virus); a Pepe y M^a José, de histología (por su paciencia al procesar tantas y tantas muestras); a Beatriz, Alfredo, Isabel, Charo e Isabel en administración (por todo ese trabajo que ha permitido que la investigación se realice sin contratiempos. ¡Ah, y por enseñarme a manejar el fax y dejarme usar la máquina de escribir!). A todos ellos, muchas gracias.

También me gustaría agradecer a todo el personal científico del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal su ayuda, su apoyo, su consejo y su espíritu crítico. Las discusiones y charlas que hemos mantenido en estos años me han enseñado mucho y han hecho que intentara superarme continuamente en mi trabajo.

Quiero dar las gracias al Dr. Niall Bromage y a la Dra. Françoise Le Menn, que me han brindado la oportunidad de trabajar en sus laboratorios y de que mi formación humana y científica haya crecido de una manera formidable. También quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Olivier Kah (que nunca llegó a perder la paciencia mientras intentaba enseñarme a no hundirme con la tabla de vela): además de ayudarme enormemente en el plano científico, me ofreció su amistad, y su ejemplo ha supuesto en estos años un motivo de superación continua, a todos los niveles.

También tengo que dar las gracias a toda la gente que he ido conociendo a lo largo de estos años fuera del trabajo y que han compartido conmigo ese tiempo que te permite volver al laboratorio con buen ánimo al día siguiente. Quizás su contribución científica haya sido mínima, por no decir nula, pero sin ellos esta tesis nunca hubiera llegado a término. En especial a José Luis, que se ha ganado, por méritos propios, el sobrenombre de Happy, por haberme enseñado, con toda la paciencia del mundo, como se navega, y por haberme mostrado, continuamente, que es muy difícil que aparezca alguna razón realmente importante para ponerse de mal humor. A Isabelle, por su continua preocupación en hacer que Francia no fuera para mí un país extraño. A M^oJosé, a Greta y a Violeta, que han hecho que su casa se fuera convirtiendo poco a poco en la mía. A Máximo Hernanz, con el que tanto he charlado y paseado a lo largo de estos años, por haberme ayudado tantas veces a aclarar mis ideas. A Fernando y a Jesús, por haber compartido conmigo mucho tiempo de diversión y alegría y haber hecho que siempre tuviera presente que el mundo no acaba entre las tapas de una tesis doctoral. A Manolo, a Adolfo, a José Luis (Zayas) y a Rolf por haberme animado en su día a iniciar esta aventura y por haberme dejado saber continuamente que ellos estaban ahí, a pesar de la distancia.

Y, por su puesto, citar a mi familia. Me han animado siempre a seguir adelante y han permitido que un poco de mí mismo, que podía haber gastado a su lado, fuera a parar a estas páginas. Quizás darles las gracias resultara un gesto un poco superficial... Quizás, aunque no aparezcan como autores o no hayan estudiado Biología, esta tesis sea tan suya como mía.



Dicentrarchus labrax

ÍNDICE

Índice	I
Presentación	VII
Lista de abreviaturas	XIII
Lista de especies	XV
Índice de tablas	XVII
Índice de figuras	XXI

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1. EL PROCESO REPRODUCTOR	3
1.1.- Desarrollo ovárico	5
Primeras fases del desarrollo ovárico	6
Vitelogénesis	8
Maduración oocitaria	14
Atresia	16
Modelos de desarrollo ovárico en teleósteos	18
1.2.- Espermatogénesis y espermiogénesis	20
1.3.- Control endocrino del proceso reproductor	21
Función de las hormonas metabólicas	21
Control hipotalámico de la secreción de gonadotrofinas	22
Hormona liberadora de gonadotrofina (GnRH)	23
Dopamina	26
Gonadotrofinas	27
Niveles plasmáticos de esteroides sexuales a lo largo del ciclo reproductor	31
2.- FECUNDIDAD Y CALIDAD DE LA PROGENIE	34
2.1.- Fecundidad	34
Factores que afectan a la fecundidad	35
2.2.-Calidad del huevo	37
3.- INFLUENCIA DE FACTORES NUTRICIONALES EN EL PROCESO REPRODUCTOR	41
3.1.- Nivel de ingesta	41
3.2.- Requerimiento proteico y energético en peces	43
3.3.- Requerimientos de ácidos grasos para el éxito reproductivo ..	45
Mecanismos de síntesis de ácidos grasos	48
Necesidades de ácidos grasos en la dieta	53
3.4. Vitaminas, minerales y oligoelementos	55

CAPÍTULO II. MATERIAL Y MÉTODOS

1. ESPECIE ESTUDIADA:	
LUBINA, <i>Dicentrarchus labrax</i> (Linnaeus, 1758)	59
2.- DISEÑO EXPERIMENTAL	64
Experiencia 1	66
Experiencia 2	67
Experiencia 3	69
3.- MANTENIMIENTO DE LOS REPRODUCTORES Y RECOGIDA DE MUESTRAS	71
3.1.- Tanques para el mantenimiento de los reproductores	71
3.2.- Muestreos	72
Muestras de plasma	73
4.- RECOGIDA DE LAS PUESTAS	74
4.1.- Cálculo de la fecundidad	75
4.2.- Cálculo de la tasa de eclosión	76
5.- ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS DE ESTADOS DE DESARROLLO OOCITARIO Y CÁLCULO DE LA FECUNDIDAD TOTAL	77
6.- ANÁLISIS DE LÍPIDOS Y ÁCIDOS GRASOS	82
7.- ANÁLISIS HORMONALES Y DE VITELOGENINA	84
7.1.- Análisis de GtHII	84
Protocolo del ELISA	85
Características del ensayo	89
7.2.- Análisis de vitelogenina	91
Características del ensayo	93
7.3.- Análisis de 17β - estradiol	95
Preparación del anticuerpo antiE2	95
Desarrollo del ensayo	95
Características del ensayo	100
7.4.- Expresión de los resultados	101
8.- MÉTODOS ESTADÍSTICOS	102

CAPÍTULO III. EFECTO DE LA VARIACIÓN INESPECÍFICA DE LA CANTIDAD DE LÍPIDOS INGERIDA POR LOS REPRODUCTORES DE LUBINA, POR MEDIO DE LA MODIFICACIÓN DEL TIPO DE DIETA Y DE LA RACIÓN

RESUMEN	107
1.- INTRODUCCIÓN	111
2.- MATERIAL Y MÉTODOS	115
2.1.- Animales y tratamiento experimental	115
2.2.- Muestras	116
2.3.- Análisis hormonales	117
2.4.- Tratamiento estadístico	117
3.- RESULTADOS	121
3.1.- Variación de peso y talla de las hembras	121
3.2.- Resultados de puestas y características de huevos	123
Características de las puestas y valores de fecundidad	123
Diámetro de los huevos y de las gotas de grasa	126
Porcentaje de viabilidad y de eclosión de los huevos	128
3.3.- Análisis de lípidos y ácidos grasos	130
Composición en ácidos grasos de las dietas experimentales	130
Clases de lípidos presentes en los huevos.	
Primera y segunda épocas de puesta	131
Ácidos grasos presentes en los lípidos de los huevos.	
Primera época de puesta	133
Ácidos grasos presentes en los lípidos de los huevos.	
Segunda época de puesta	136
3.4.- Análisis de 17 β -estradiol y de vitelogenina	140
Niveles plasmáticos de 17 β -estradiol	140
Niveles plasmáticos de vitelogenina	141
4.- DISCUSIÓN	145
4.1.- Resultados de puesta	145
4.2.- Clases de lípidos presentes en los huevos	150
4.3.- Contenido en ácidos grasos de los huevos	152
4.4.- Niveles plasmáticos de 17 β -estradiol y de vitelogenina	158
Niveles plasmáticos de 17 β -estradiol	158
Niveles plasmáticos de vitelogenina	163

CAPÍTULO IV. EFECTO DEL AUMENTO ESPECÍFICO DE LA CANTIDAD DE ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES INGERIDA POR LOS REPRODUCTORES DE LUBINA

RESUMEN	167
1.- INTRODUCCIÓN	171
2.- MATERIAL Y MÉTODOS	174
2.1.- Animales y tratamiento experimental	174
2.2.- Muestras	175
2.3.- Análisis hormonales	176
2.4.- Tratamiento estadístico	176
3.- RESULTADOS	178
3.1. Variación en peso y talla de las hembras	178
3.2.- Resultados de puestas y características de huevos	180
Características de las puestas y valores de fecundidad	180
Diámetro de los huevos y de las gotas de grasa	182
Porcentajes de viabilidad y de eclosión de los huevos	184
3.3.- Análisis de lípidos y ácidos grasos	186
Composición en ácidos grasos de las dietas experimentales	186
Contenido lipídico de los huevos. Primera época de puesta	188
Contenido de ácidos grasos en los huevos.	
Primera época de puesta	190
3.4.- Análisis de GtHII, 17 β -estradiol y vitelogenina	193
Niveles plasmáticos de GtHII	193
Niveles plasmáticos de 17 β -estradiol	196
Niveles plasmáticos de vitelogenina	198
4.- DISCUSIÓN	200
4.1.- Resultados de puesta	200
4.2.- Composición de lípidos y ácidos grasos de los huevos	203
Composición lipídica de los huevos	203
Contenido de ácidos grasos de los huevos	204
4.3.- Niveles plasmáticos de GtHII, de 17 β -estradiol y	
de vitelogenina	206
Niveles plasmáticos de GtHII	206
Niveles plasmáticos de 17 β -estradiol	211
Niveles plasmáticos de vitelogenina	213

CAPÍTULO V. EFECTO DEL MOMENTO DE ADMINISTRACIÓN DE DIETAS RICAS EN ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES

RESUMEN	219
1.- INTRODUCCIÓN	223
2.- MATERIAL Y MÉTODOS	225
2.1.- Animales y tratamiento experimental	225
2.2.- Muestras	226
2.3.- Estudio de la distribución de frecuencias de desarrollo oocitario y de la fecundidad total real de las hembras	229
2.4.- Análisis hormonales	229
2.5.- Tratamiento estadístico	230
3.- RESULTADOS	231
3.1.- Variación de peso y talla de las hembras	231
3.2.- Resultados de puestas y características de huevos	233
Características de las puestas y valores de fecundidad	233
Diámetro de los huevos y de las gotas de grasa	236
Porcentajes de viabilidad y de eclosión de los huevos	238
Distribución de frecuencias de tamaño oocitario y fecundidad total real en los diferentes grupos experimentales	241
3.3.- Análisis de lípidos y ácidos grasos	243
Composición en ácidos grasos de las dietas experimentales	243
Clases de lípidos presentes en los huevos	
Primera y segunda épocas de puesta	244
Ácidos grasos presentes en los lípidos de los huevos	
Primera época de puesta	248
Ácidos grasos presentes en los lípidos de los huevos	
Segunda época de puesta	252
3.4.- Análisis de 17 β -estradiol y de vitelogenina	255
Niveles plasmáticos de 17 β -estradiol	255
Niveles plasmáticos de vitelogenina	257
4.- DISCUSIÓN	259
4.1.- Resultados de puesta y frecuencia de estados de desarrollo oocitario	259
4.2.- Composición de lípidos y ácidos grasos de los huevos	263
Composición lipídica de los huevos	263
Contenido de ácidos grasos de los huevos	264
4.3.- Niveles plasmáticos de 17 β -estradiol y de vitelogenina	266
Niveles plasmáticos de 17 β -estradiol	266
Niveles plasmáticos de vitelogenina	269

CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN GENERAL

1.- RESULTADOS DE PUESTA	273
1.1.- Efecto de la ración	273
1.2.- Efecto de la edad de los reproductores	274
1.3.- Relación entre el diámetro de los huevos y los valores de fecundidad	276
1.4.- Efecto de la composición de las dietas	277
1.5.- Efecto del momento de administración de una dieta rica en EFA	278
2.- COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LOS HUEVOS	280
2.1.- Clases de lípidos presentes en los huevos	280
2.2.- Contenido en ácidos grasos de los huevos	282
3.- NIVELES PLASMÁTICOS DE GtHII, DE 17 β -ESTRADIOL Y DE VITELOGENINA	288
3.1.- Niveles plasmáticos de GtHII	288
3.2.- Niveles plasmáticos de 17 β -estradiol	291
3.3.- Niveles plasmáticos de Vg	293
4.- ESQUEMA FINAL	296
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES	299
CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA	305

PRESENTACIÓN

Este trabajo de investigación ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Manuel Carrillo, perteneciente al Departamento de Fisiología de la Reproducción de Teleósteos del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS). Este centro, ubicado en la costa de la provincia de Castellón, pertenece al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Todo el trabajo experimental presentado en esta memoria se llevó a cabo en el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, con la excepción de los análisis de lípidos que se hicieron en el Instituto de Lipidología de la unidad del NERC asociada a la Universidad de Stirling, en Escocia y las medidas de oocitos, que realizaron en la facultad de biología de la Universidad de Brest, en Francia.

El desarrollo del trabajo fue posible gracias a una beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador (F.P.I.) otorgada por la Generalitat Valenciana. En el marco de esa misma beca se realizaron dos estancias de tres meses en el extranjero que permitieron profundizar en algunos aspectos concretos de la investigación. Una de esas estancias tuvo lugar en la Universidad de Burdeos, visitándose dos departamentos diferentes. En el departamento de Biología Marina, bajo la dirección de la Dra. Françoise Le Menn, se estudió la dinámica de los receptores de vitelogenina en el ovario de lubina. En el departamento de Neurocitología, bajo la dirección del Dr. Olivier Kah, se estudió la ubicación e interrelaciones de diferentes neuropéptidos y de los receptores de 17β -estradiol en el cerebro de trucha, mediante técnicas de inmunocitoquímica. La segunda estancia se llevó a cabo en el Instituto de Acuicultura de la Universidad de Stirling, bajo la dirección del Dr. Niall Bromage y permitió el tratamiento matemático de los datos obtenidos en los análisis de lípidos así como la redacción de trabajos que han sido enviados para su publicación.

En el departamento de Biología Marina de la Universidad de Burdeos se realizaron, además, tres estancias, bajo la codirección de los doctores Silvia Zanuy, Françoise

Le Menn y Manuel Carrillo en el marco de dos acciones integradas hispano-francesas otorgadas por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica bajo los títulos “Estudio del proceso vitelogénico de la lubina *Dicentrarchus labrax* L.” (nº 222-A) y “Los receptores oocitarios de la vitelogenina de la lubina en cultivo” (nº HF94-166). Durante estas estancias se estudió la distribución de los diferentes estadios de desarrollo oocitario en el ovario de la lubina así como la dinámica de los receptores de vitelogenina.

Todo el trabajo llevado a cabo en estos años se ha encuadrado dentro de varios proyectos de investigación, tanto nacionales como extranjeros, en los que ha participado el Departamento de Fisiología de la Reproducción de Teleósteos del IATS. Estos proyectos son los que a continuación se enumeran:

- **“The nutritional requirements of broodstock sea bass and their effects on egg quality and larval survival and growth”**. Financiado por la CEE (Proyecto FAR AQ 2 406 E UK). Duración: de septiembre de 1991 hasta septiembre de 1994. Coordinador: Manuel Carrillo. Investigador principal: Manuel Carrillo
- **“Egg quality determinants in teleosts fish”**. Financiado por la CE (Proyecto AIR 2 CT93 1005). Duración: de noviembre de 1996 hasta mayo de 1997. Coordinador: Niall Bromage. Investigador principal: Manuel Carrillo.
- **“Estudio de algunos factores ambientales y cerebrales que afectan a la aparición de la pubertad en la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.)”**. Financiado por la CICYT (Proyecto AGF 93-0127). Duración: de mayo de 1993 a mayo de 1996. Investigador principal: Silvia Zanuy Doste.

El trabajo recopilado en esta memoria ha dado lugar a diferentes comunicaciones a congresos nacionales e internacionales, así como a publicaciones en revistas de ámbito internacional:

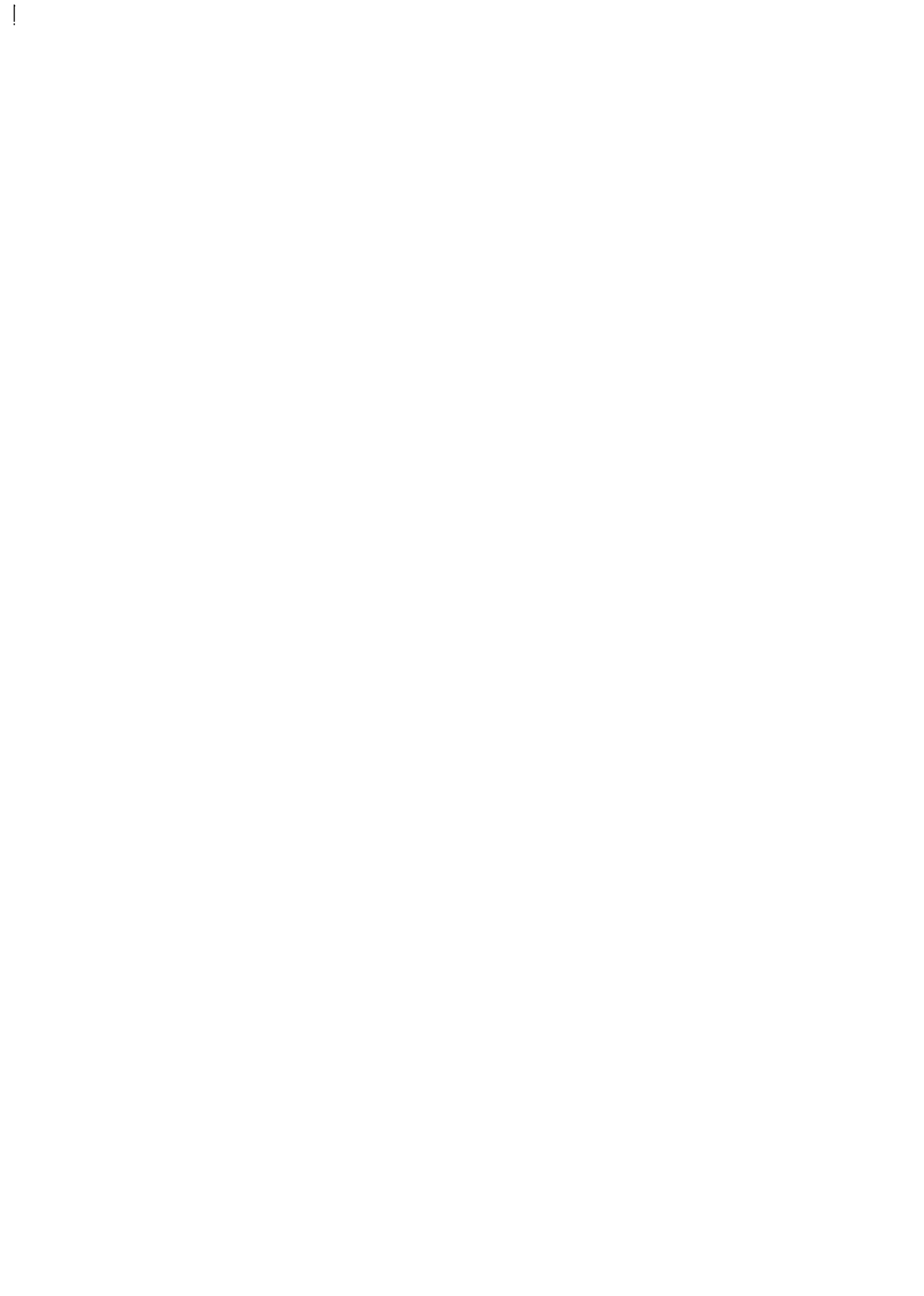
- **Navas JM**, Thrush M, Ramos J, Bruce M, Zanuy S, Carrillo M, Bromage N. The effect of seasonal alteration in the lipid composition of broodstock diets on egg quality in the european sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *5th. Int. Symp. of Reprod. Physiol. of Fish. Austin, Texas, July 2-8 1995*. Goetz F and Thomas P, eds. pp.: 108-110.
- **Navas JM**, Mañanós E, Thrush M, Ramos J, Zanuy S, Carrillo M, Zohar Y, Bromage N. Effect of the lipid composition of the diet on the hormonal levels and spawning performance of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *5th. Int. Symp. of Reprod. Physiol. of Fish. Austin, Texas, July 2-8 1995*. Goetz F and Thomas P, eds. pp.: 131.
- **Navas JM**, Thrush M, Ramos J, Zanuy S, Carrillo M, Bromage N. "Calidad de puesta y niveles plasmáticos de vitelogenina en reproductores de lubina (*Dicentrarchus labrax*) mantenidos con diferentes dietas". *Actas del IV Cong. Nac. Acuic.* (A. Cerviño, A. Landin, A. de Coó, A. Gerra y M. Torre, Edit.) pp.: 103-108. (1993). España
- Thrush M, **Navas JM**, Ramos J, Bromage N, Carrillo M. "The effect of artificial diets on lipid class and total fatty acid composition of cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*)eggs". *Actas del IV Cong. Nac. Acuic.* (A. Cerviño, A. Landin, A. de Coó, A. Gerra y M. Torre, Edit.) pp.: 37-42. (1993). España.

- Ramos J, Thrush M, Navas JM, Zanuy S, Carrillo M, Bromage N. "Efecto del enriquecimiento lipídico de dietas artificiales sobre el crecimiento, fecundidad y calidad de puesta en la lubina (*Dicentrarchus labrax*)". *Actas del IV Cong. Nac. Acuic.* (A. Cerviño, A. Landin, A. de Coó, A. Gerra y M. Torre, Edit.) pp.: 13-18. (1993). España.
- Bell JG, Farndale BM, Bruce MP, Navas JM, Carrillo M. Effects of broodstock dietary lipid on fatty acid compositions of eggs from sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*. En prensa.
- Navas JM, Bruce M, Thrush M, Farndale B, Bromage N, Zanuy S, Carrillo C, Bell JG. The impact of seasonal alteration in the lipid composition of broodstock diets on egg quality in the european sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *The Journal of Fish Biology*. En revisión.
- Carnevali O, Mosconi G, Centonze F, Navas JM, Zanuy S, Carrillo M. Influence of diet on yolk protein components in sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Scientia Marina*. Enviada.
- Ramos J, Thrush M, Navas JM, Zanuy S, Carrillo M, Bromage N. Effect of artificial diets on broodstock growth, egg quality and larval survival in the sea bass. Broodstock management and egg and larval quality congress. 1992. Stirling. Reino Unido.
- Navas JM, Thrush M, Ramos J, Carrillo M, Zanuy S, Bromage N. Vitellogenin and 17B- Oestradiol levels in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) broodstock fed with different diets. 17th conference of european comparative endocrinologists. 5-10 September, 1994. Córdoba. Spain.

- Carnevali O, Mosconi G, Centonze F, **Navas JM**, Zanuy S, Bromage N. Yolk protein components and egg quality in sea bass *Dicentrarchus labrax* 17th conference of european comparative endocrinologists. 5-10 september, 1994. Córdoba. Spain

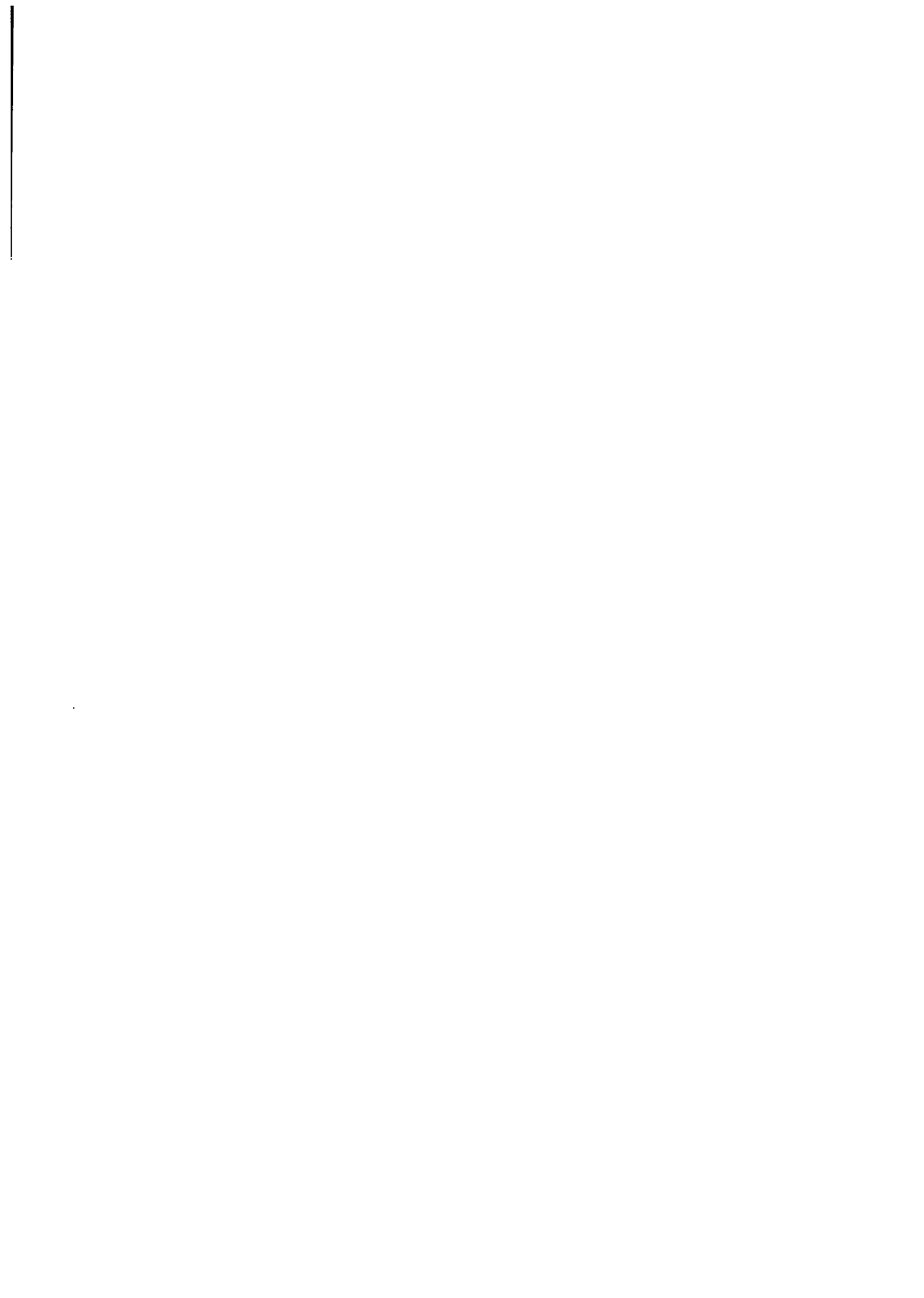
Conviene hacer notar que el trabajo de investigación llevado a cabo en los años de confección de la presente memoria no se ha limitado, únicamente, a los experimentos que aquí se presentan. La continua colaboración existente entre el departamento de Fisiología de la Reproducción de Teleósteos del IATS y otros laboratorios ha permitido abordar nuevos temas de investigación para establecer las bases de futuros trabajos a desarrollar en nuestro instituto. En el laboratorio dirigido por la Dra. Françoise Le Menn se llevaron a cabo estudios acerca de la dinámica de los receptores de vitelogenina y en el grupo de investigación del Dr. Olivier Kah se estudiaron las relaciones existentes a nivel cerebral entre neuronas que expresan los receptores de estradiol y otros neuropéptidos. Los resultados obtenidos han dado lugar a publicaciones en revistas de ámbito internacional y a comunicaciones en congresos.

- **Navas JM**, Anglade I, Bailhache Th, Pakdel F, Breton B, Jégo P, Kah O. Do gonadotrophin-releasing hormone neurons express estrogen receptors in the rainbow trout? A double immunohistochemical study. *The Journal of Comparative Neurology*. 1996; 363: 461-474.
- Linard B, Anglade I, Corio M, **Navas JM**, Pakdel F, Saligaut Ch, Kah O. Estrogen receptors are expressed in a subset of tyrosine hydroxylase-positive neurons of the anterior preoptic region in the rainbow trout. *Neuroendocrinology*. 1996; 63: 156-165.
- Linard B, Anglade I, Bennani S, Salbert G, **Navas JM**, Bailhache T, Pakdel F, Jégo P, Valotaire Y, Saligaut C, Kah O. 1995. Some insights into sex steroid feedback mechanisms in the trout. *5th. Int. Symp. of*



LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidónico	
DHA	Ácido Docosahexaenoico	("Docosahexaenoic Acid")
EFA	Ácidos Grasos Esenciales	("Essential Fatty Acids")
EPA	Ácido Eicosapentaenoico	("Eicosapentaenoic Acid")
E2	17 β -estradiol	
FL	Fosfolípidos	
FSH	Hormona Folículo Estimulante	("Follicle Stimulating Hormone")
FR	Fecundidad Relativa	
FT	Fecundidad Total	
GABA	Ácido γ -aminobutírico	(" γ -Aminobutiric Acid")
GCH	Gonadotropina Coriónica Humana	
GnRH	Hormona Liberadora de la Gonadotropina	("Gonadotrophin Releasing Hormone")
GtH	Gonadotropina	("Gonadotrophin Hormone")
GVM	Migración de la Vesícula Germinal	("Germinal Vesicle Migration")
HSD	20 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa	
HUFA	Ácidos Grasos Altamente Insaturados	("Highly Unsaturated Fatty Acids")
KT	11-ketotestosterona	
LH	Hormona Luteinizante	("Luteinizing Hormone")
LHRH	Hormona Liberadora de la LH	("LH Releasing Hormone")
LN	Lípidos Neutros	
MIH	Hormona Inductora de la Maduración	("Maturation Inducing Hormone")
MPF	Factor Promotor de la Maduración	("Maturation Promoting Factor")
PUFA	Ácidos Grasos Poliinsaturados	("Polyunsaturated Fatty Acids")
SEM	Error Estándar de Media	("Standard Error of the Mean")
T	Testosterona	
T3	Triiodotironina	
T4	Tiroxina	
Vg	Vitelogenina	
17, 20BP	17, 20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona	
17, 20β, 21 P	17, 20 β , 21-trihidroxi-4-pregnen-3-ona	



LISTA DE ESPECIES

La denominación científica de las especies que se citan a continuación aparece en el texto, al menos, la primera vez que se hace referencia a una especie dada. Los nombres en castellano y en inglés correspondientes a cada especie son los citados en la obra de Vera (1992).

<i>Acheilognatus rhombea</i>	Rodeo	Bitterling
<i>Acipenser baeri</i>	Esturión	Sturgeon
<i>Ammodytes personatus</i>	Lanzón japonés	Sand eels
<i>Anguilla anguilla</i>	Anguila europea	European eel
<i>Boops boops</i>	Boga	Bogue
<i>Caranx spp.</i>	Jurel	Horse mackerel
<i>Carassius auratus</i>	Pez rojo	Goldfish
<i>Clarias gariepinus</i>	Pez gato	Catfish
<i>Clupea arengus</i>	Arenque	Herring
<i>Cynoscion nebulosus</i>	Corvina pintada	Smallscale weakfish
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa	Carp
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Lubina	Seabass
<i>Fundulus heteroclitus</i>		
<i>Gadus morhua</i>	Bacalao	Cod
<i>Gadus virens</i>	Palero	Saithe
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Espinoso	Three spined stickleback
<i>Gobius niger</i>	Chaparrudo	Black goby
<i>Heteropneustes fossilis</i>	Pez gato	African catfish
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Fletán atlántico	Atlantic halibut
<i>Ictalurus nebulosus</i>	Pez gato	Catfish
<i>Katsuwonus plelamis</i>	Bonito	Bonito
<i>Liopretta obscura</i>		
<i>Liza aurata</i>	Galupe	Golden grey mullet

<i>Mallotus spp.</i>	Capelán	Capelin
<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	Eglefino	Haddock
<i>Micropogonias undulatus</i>	Corvinón brasileño	Atlantic croaker
<i>Morone saxatilis</i>	Lubina americana	Striped bass
<i>Oncorhynchus keta</i>	Salmón chum	Chum salmon
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Salmón coho	Coho
<i>Oncorhynchus masou</i>	Salmón masu	Masu salmon
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trucha arco iris	Rainbow trout
<i>Oryzias latipes</i>		Medaka
<i>Pagrus major</i>	Pargo japonés	Red seabream
<i>Paracentropistis cabrilla</i>	Cabrilla	Comber
<i>Paramisgurnus dabryanus</i>		Chinese loach
<i>Plecoglossus altivelis</i>		Ayu
<i>Pleuronectes platessa</i>	Platija	
<i>Pseudocaranx dentex</i>	Jurel dentón	Striped jack
<i>Rutilus rutilus</i>	Rutilo	Roach
<i>Salmo salar</i>	Salmón atlántico	Atlantic salmon
<i>Salmo trutta</i>	Trucha común	Trout
<i>Scomber trachurus</i>	Jurel	Horse mackerel
<i>Scophthalmus maximus</i>	Rodaballo	Turbot
<i>Scorpaena spp.</i>	Pez escorpión	Scorpionfish
<i>Sparus aurata</i>	Dorada	Gilthead seabream
<i>Trachurus spp.</i>	Chicharro, jurel	Mackerel, scad
<i>Tridentiger obscurus</i>		
<i>Verasper moseri</i>		Barfin flounder
<i>Xenopus</i>		

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo I. Introducción.

Tabla I.1. Secuencia aminoacídica de los nueve tipos conocidos de GnRH 24

Capítulo III. Variación inespecífica de la cantidad de lípidos ingerida por los reproductores.

Tabla III.1. Materias primas utilizadas en la manufactura del pienso con un 9% de lípidos, que sirvió de base para la fabricación de la dieta con el 15% de lípidos 118

Tabla III.2. Composición porcentual aproximada de la dieta natural y de los dos tipos de pienso con los que se alimentaron los animales 119

Tabla III.3. Porcentajes de ácidos grasos presentes en la fracción lipídica de la dieta natural y de las dos dietas artificiales 120

Tabla III.4. Características de las puestas y peso en postpuesta de las hembras de los diferentes grupos experimentales en los dos períodos de puesta considerados 124

Tabla III.5. Fecundidad total y fecundidad relativa de los diferentes grupos experimentales en los dos períodos de puesta considerados 126

Tabla III.6. Diámetro medio de los huevos y de la gota de grasa de cada grupo experimental en los dos períodos de puesta considerados 127

Tabla III.7. Clases de lípidos presentes en los lípidos totales extraídos de los huevos de los diferentes grupos experimentales en la primera época de puesta . . 132

Tabla III.8. Clases de lípidos presentes en los lípidos totales extraídos de los huevos de los diferentes grupos experimentales en la segunda época de puesta . . . 132

Tabla III.9. Clases de ácidos grasos presentes en los lípidos totales de los huevos de los diferentes grupos experimentales en la primera época de puesta . . . 135

Tabla III.10. Clases de ácidos grasos presentes en los lípidos totales de los huevos de los diferentes grupos experimentales en la segunda época de puesta . . . 139

Capítulo IV. Efecto del aumento específico de la cantidad de ácidos grasos ingerida por los reproductores.

Tabla IV.1. Composición porcentual de la dieta natural y de los diferentes tipos de pienso utilizados 176

Tabla IV. 2. Porcentajes de ácidos grasos presentes en la fracción lipídica de la dieta natural y de las dietas artificiales utilizadas 177

Tabla IV.3. Características de las puestas y peso en postpuesta de las hembras de los diferentes grupos experimentales. 181

Tabla IV.4. Fecundidad total y fecundidad relativa correspondientes a los distintos grupos experimentales 183

Tabla IV.5. Diámetro medio de los huevos y de la gota de grasa 183

Tabla IV. 6. Contenido lipídico y clases de lípidos de los huevos de los diferentes grupos experimentales en la primera época de puesta 191

Tabla IV. 7. Porcentaje de ácidos grasos de los lípidos de los huevos de los distintos grupos experimentales en la primera época de puesta 192

Capítulo V. Efecto del momento de administración de dietas ricas en ácidos grasos esenciales

Tabla V.1. Composición aproximada de las dietas utilizadas 227

Tabla V.2. Porcentaje de ácidos grasos presentes en cada una de las dos dietas utilizadas en el experimento 228

Tabla V.3. Algunas características de las puestas y peso en postpuesta de las hembras de los diferentes grupos experimentales 234

Tabla V.4. Fecundidad total y relativa de los diferentes grupos experimentales en los tres períodos de puesta estudiados 236

Tabla V.5. Diámetros medios de los huevos y de la gota de brasa obtenidos en cada uno de los grupos estudiados en las diferentes épocas de puesta 237

Tabla V.6. Clases de lípidos presentes en los lípidos totales extraídos de los huevos en la primera época de puesta 246

Tabla V.7. Clases de lípidos presentes en los lípidos totales extraídos de los huevos en la segunda época de puesta 247

Tabla V.8. Porcentajes de ácidos grasos de los lípidos de los huevos de los diferentes grupos experimentales en la primera época de puesta 251

Tabla V.9. Porcentajes de ácidos grasos de los lípidos de los huevos de los diferentes grupos experimentales en la segunda época de puesta 254

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo I. Introducción.

- Figura I.1.** Estructura de algunos de los ácidos grasos citados en el presente trabajo. 47
- Figura I.2.** Ácidos grasos obtenidos tras las reacciones de alargamiento y desaturación
 50
- Figura I.3.** Posible mecanismo alternativo para la desaturación de tipo $\Delta 4$, que implica
 a una desaturasa $\Delta 6$ 52

Capítulo II. Material y métodos.

- Figura II.1.** Estados de desarrollo oocitario considerados en el presente trabajo . . . 81
- Figura II.2.** Esquema de los pasos seguidos en el ELISA que se utilizó para determinar
 las concentraciones plasmáticas de GtHII 90
- Figura II.3.** Esquema del desarrollo de un ELISA para vitelogenina 94

Capítulo III. Variación inespecífica de la cantidad de lípidos ingerida por los reproductores.

- Figura III.1.** Evolución del peso y de la talla de las hembras de los diferentes grupos
 experimentales desde el inicio del experimento hasta la finalización del primer
 período de puesta 122
- Figura III.2.** Porcentajes de viabilidad y de eclosión de los huevos de los diferentes
 grupos experimentales en los dos períodos de puesta considerados . . . 129

Figura III.3. Niveles plasmáticos de 17β -estradiol en las hembras de los diferentes grupos experimentales a lo largo del primer período reproductor 143

Figura III.4. Niveles de vitelogenina plasmática detectados en las hembras de los diferentes grupos experimentales a lo largo del primer período reproductor 144

Capítulo IV. Efecto del aumento específico de la cantidad de ácidos grasos ingerida por los reproductores.

Figura IV.1. Peso y talla de las hembras de los diferentes grupos experimentales en cada uno de los meses durante el primer año de experimentación 179

Figura IV.2. Porcentajes de viabilidad y de eclosión de los diferentes grupos experimentales en los dos períodos de puesta estudiados 185

Figura IV.3. Niveles plasmáticos de GtHIII detectados en las hembras de los diferentes grupos experimentales a lo largo del primer ciclo experimental 195

Figura IV.4. Concentración plasmática de 17β -estradiol en las hembras de los distintos grupos experimentales durante el primer ciclo experimental 197

Figura IV.5. Niveles plasmáticos de vitelogenina detectados en los diferentes grupos experimentales durante el primer período experimental 199

Capítulo V. Efecto del momento de administración de dietas ricas en ácidos grasos esenciales

Figura V.1. Esquema del protocolo experimental seguido en esta experiencia . . . 227

Figura V.2. Variación del peso y talla de las hembras a lo largo del primer año de experimentación 232

Figura V.3. Porcentajes de viabilidad y de eclosión de los huevos de los diferentes grupos experimentales en los tres períodos de puesta estudiados . . . 239

Figura V.4. Porcentajes medios correspondientes a los distintos estados de desarrollo oocitario considerados en las partes anterior, media y posterior del ovario y en los ovarios de las hembras de cada grupo experimental 242

Figura V.5. Niveles plasmáticos de 17 β -estradiol observados en las hembras de los grupos Abr-Sep y Ene-Dic durante el primer año experimental 256

Figura V.6. Niveles de vitelogenina plasmática observados en los grupos Abr-Sep y Ene-Dic a lo largo del primer período experimental 258

Capítulo VI. Discusión general.

Figura VI.1. Esquema de los efectos e interacciones observadas en el presente trabajo entre el tamaño del reproductor, la época y duración de la administración de las dietas y la composición de las mismas sobre los mecanismos hormonales que regulan la reproducción y sobre los resultados de puesta 297

I

INTRODUCCIÓN

1. EL PROCESO REPRODUCTOR.

En los teleósteos, como en el resto de especies animales, se han seleccionado a lo largo de la evolución aquellas estrategias reproductoras que resultan más favorables según las condiciones medioambientales en que se encuentre la especie. Pero en un grupo tan amplio, el más variado dentro de los vertebrados, con alrededor de 20000 especies, se da cabida a multitud de posibilidades que permiten llevar a término con éxito el ciclo reproductor. Sin embargo, a pesar de esta diversidad, todas las especies de teleósteos presentan un conjunto de mecanismos metabólicos comunes que intervienen en el proceso de reproducción y que lo controlan. Ello permite que todos los fenómenos con él relacionados se produzcan en el momento más adecuado, dependiendo de la información que el organismo reciba desde el medio externo (Dodd y Sumpter, 1984).

Los procesos reproductores se ven modulados por todo el conjunto de condiciones ambientales a que están sometidos los animales. Tanto las variaciones de presión debidas a las mareas, así como los ritmos lunares o fotoperiódicos, la temperatura, la salinidad, la disponibilidad de alimento o la calidad de ese alimento ejercen una influencia directa sobre todos los mecanismos relacionados con el proceso reproductor (Revisado por Ali *et al.*, 1992; Leatherland *et al.*, 1992). El control artificial de todos estos factores permite la optimización de los procesos reproductores en piscicultura. Así, por ejemplo, la variación de los ritmos fotoperiódicos ha permitido provocar retrasos o adelantos sustanciales del momento de las puestas (revisado por Zanuy y Carrillo, 1987; Carrillo *et al.*, 1989; Carrillo *et al.*, 1995; Bromage, 1995). Numerosos estudios también han puesto de manifiesto la necesidad de administrar a los reproductores bajo condiciones

de cultivo una alimentación adecuada para que el proceso reproductor se produzca con normalidad (revisado por Luquet y Watanabe, 1986).

El presente trabajo se va a centrar el estudio de la influencia de ciertos factores nutricionales en el proceso reproductor. Previamente se han realizado algunos experimentos acerca del efecto de la ración o del porcentaje de proteínas de las dietas administradas a los reproductores de lubina (Cerdá *et al.*, 1994 a, b; 1995) sobre la fecundidad y sobre los porcentajes de viabilidad y eclosión de los huevos. Sin embargo, hay una falta importante de conocimiento acerca del efecto de la composición lipídica de las dietas sobre el proceso reproductor en las especies de peces marinos (Revisado por Henderson y Sargent, 1987; Sargent, 1989). Este va a ser el objeto de estudio de la presente memoria.

El efecto de los factores ambientales, incluidas las condiciones de alimentación, sobre la reproducción puede ejercerse a diferentes niveles y en distintos momentos. Pueden afectar, por ejemplo, a todos los procesos hormonales que regulan el desarrollo gonadal, o bien ejercer una influencia directa sobre el mismo desarrollo gonadal, o incluso, a posteriori, sobre el desarrollo de huevos y larvas. Debido a ello resulta adecuado comenzar la presentación de este estudio dando una descripción generalizada del desarrollo del proceso reproductor en peces, de todo el conjunto de mecanismos hormonales que lo controlan y de los factores nutricionales que ejercen una influencia directa sobre él.

El fenómeno de la reproducción se inicia en las especies de animales superiores con la formación y desarrollo de los gametos en el interior de las gónadas. Como se ha

dicho anteriormente, existen multitud de posibilidades distintas según la especie a la que se haga referencia. Sin embargo, en los teleósteos, el desarrollo gonadal, tiene una serie de características propias, comunes a la mayoría de las especies. El estudio del desarrollo gonadal es una pieza clave para la comprensión del proceso reproductor. Además hay que tener en cuenta que la gónada es la diana de todos los factores hormonales que regulan la reproducción y que su desarrollo está fuertemente influido por el tipo de nutrición recibido por los reproductores. Debido a todo ello se considera fundamental realizar una presentación detallada acerca de todos los procesos que tienen lugar en la gónada durante su desarrollo.

1.1.- Desarrollo ovárico.

En los peces el ovario va a crecer a lo largo del ciclo reproductivo y en él se van a formar y desarrollar los gametos femeninos u oocitos. Un conocimiento detallado de cómo actúan todos los mecanismos implicados en este proceso es básico para entender cómo influyen sobre él los factores ambientales, y, en concreto, la nutrición de los reproductores.

En el desarrollo ovárico de los teleósteos se pueden establecer una serie de fases que permiten esquematizarlo para facilitar su estudio y comprensión. El primer fenómeno que tiene lugar es el de la proliferación oogonial, por medio de divisiones mitóticas. Con ello se eleva el número de células que pueden llegar a transformarse en gametos. A continuación se produce la oogénesis, que consiste en la transformación de las oogonias en oocitos primarios a través de un proceso de meiosis. Estos oocitos primarios sufren un enorme aumento de tamaño debido a la acumulación de reservas en su interior, que después serán utilizadas durante el desarrollo embrionario y el inicio del

crecimiento de la larva. Durante este crecimiento oocitario, hay que distinguir una primera fase en la que las sustancias de reserva son sintetizadas por el propio oocito y se acumulan en su interior. Se habla, en este caso, del estado de alveolos corticales (Selman y Wallace, 1989). En otra fase posterior, que en realidad se solapa y puede ocurrir simultáneamente con la anterior, las sustancias de reserva que se han sintetizado en el hígado, principalmente vitelogenina y otras lipoproteínas, llegan hasta el ovario a través de la sangre y aquí son internalizadas en los oocitos depositándose en ellos (Selman y Wallace, 1989). Esta fase es la de vitelogénesis propiamente dicha.

A continuación se va a dar una descripción pormenorizada de los diferentes estados del desarrollo ovárico.

Primeras Fases del Desarrollo Ovárico.

Las oogonias aparecen como pequeñas células redondas imbuidas en el epitelio germinal del ovario (Mayer *et al.*, 1988). En la mayor parte de los teleósteos con un ciclo reproductivo anual, el período de máxima profusión en las divisiones mitóticas de las oogonias suele ser el inmediatamente posterior a la finalización de las puestas (Tokarz, 1978), aunque estas divisiones también tienen lugar en las primeras fases del desarrollo ovárico, previamente al inicio del período de puesta (Mayer *et al.*, 1988).

Continuando esta ola de mitosis oogonial y solapándose a ella tiene lugar la oogénesis, iniciándose la meiosis de las oogonias, que se detiene en el diploteno de la primera profase y da lugar a la formación de los oocitos (Selman y Wallace, 1989; Wallace y Selman, 1990). Estos oocitos, en todos los vertebrados, se hallan rodeados por una capa acelular, externa a la membrana plasmática, que se denomina corion o envoltura vitelina

(Oppen-Berntsen *et al.*, 1992 a). En esta envoltura, a su vez, se puede distinguir, en el interior, la zona radiata, que constituye la mayor parte de la envoltura y , en el exterior, la zona pelúcida, que es, cuantitativamente, mucho menos importante (Oppen-Berntsen *et al.*, 1992 b). En los vertebrados superiores las envolturas del huevo son estructuras mucho más finas y se denominan, en conjunto, zona pelúcida. La zona radiata está formada por una serie de proteínas que se sintetizan en el hígado bajo la estimulación del 17 β -estradiol y se transportan por el torrente circulatorio hasta que se depositan en el ovario (Oppen-Berntsen *et al.*, 1990; 1992 a, b; 1994). Durante su desarrollo los oocitos se asocian a células prefoliculares que los rodean y acaban por formar la envoltura folicular o folículo. En él se pueden distinguir una capa interna de células, que se denomina granulosa y otra externa que es la teca (Bromage y Cumaranatunga, 1988; Guraya, 1986).

En un primer estadio los oocitos primarios aumentan de tamaño debido al crecimiento citoplasmático que se produce por una síntesis interna de reservas. Hacia el final de esta primera fase de crecimiento aparecen en el citoplasma vesículas, inicialmente en la periferia de la célula, para ir después, gradualmente, formándose cada vez más cerca del núcleo (Bromage y Cumaranatunga, 1988). Estas vesículas contienen carbohidratos y lípidos sintetizados por el propio oocito que los acumula como reserva. Aunque estas vesículas han sido denominadas vitelinas no tienen relación con el auténtico vitelo que se forma a partir de una serie de proteínas precursoras sintetizadas en el exterior del oocito y que, después, son incorporadas a su interior. Debido a ello se ha propuesto la denominación de alveolos corticales para referirse a ellas (Selman y Wallace, 1989).

La fecundidad (número de huevos producidos, ver sección 2 de este capítulo) queda ya determinada en estas primeras fases de desarrollo ovárico. Las restricciones

cuantitativas de la dieta o deficiencias en la calidad del alimento suministrado a los reproductores pueden afectar al número de células germinales que quedan disponibles para ser reclutadas y continuar su desarrollo hasta gametos, reduciéndose de este modo considerablemente la fecundidad (Bromage *et al.*, 1992).

Vitelogénesis

El término vitelogénesis hace referencia a la inducción y síntesis de proteínas precursoras del vitelo a nivel del hígado así como a su captación desde el torrente circulatorio y su internalización en el oocito (Tyler, 1991). Este es el fenómeno responsable de la mayor parte del crecimiento oocitario.

En los peces, como en todos los vertebrados ovíparos, la vitelogenina (Vg) es sintetizada en el hígado en respuesta a la estimulación por esteroides. En la trucha arco iris se encontró que el estrógeno más potente en la inducción de la síntesis de vitelogenina era el 17β -estradiol (E2) (Van Bohemen *et al.*, 1982). Desde entonces el E2 ha sido utilizado normalmente en la inducción de la síntesis de Vg en muchas especies de peces (Mommsen y Walsh, 1988). La Vg llega hasta los oocitos en desarrollo a través de la circulación y es internalizada por medio receptores específicos en un proceso de endocitosis.

El E2 se produce en las células foliculares al ser éstas estimuladas por la gonadotropina (GtH). La capacidad de síntesis de E2 aumenta durante el crecimiento del oocito, pero disminuye rápidamente cuando se produce la maduración (Kagawa *et al.*, 1983). En los salmónidos se ha propuesto la intervención de dos tipos celulares en la producción de E2, siguiendo un modelo similar al de dos células-dos gonadotropinas

establecido para la esteroideogénesis folicular en mamíferos. Según este modelo, la hormona luteinizante (LH) actuaría sobre las células tecaes para producir el sustrato androgénico que es aromatizado a estradiol dentro de las células de la granulosa bajo influencia de la hormona foliculo estimulante (FSH; Gore-Langton y Armstrong, 1988). En el caso de los teleósteos esta diferenciación tan clara de funciones entre los dos tipos de hormonas gonadotropas no se ha establecido hasta el momento. Lo que se propone, concretamente en salmónidos, es que las células de la teca, bajo la influencia de la GtH, secretan un sustrato androgénico (probablemente testosterona, T) que difunde hacia las células de la granulosa, que son las únicas en presentar actividad aromatasas, produciéndose en ellas el E2 (revisado por Nagahama, 1993). Este modelo, sin embargo, no parece ser válido para especies como el *Fundulus heteroclitus* o el medaka, *Oryzias latipes*, en las que todo el proceso de síntesis de esteroides puede tener lugar en las células de la granulosa (Petrino *et al.*, 1989; Onitake y Iwamatsu, 1986).

El papel de estimulante de la síntesis de Vg no queda restringido al E2 siendo también otras hormonas esteroides las que pueden llevarlo a cabo. Así por ejemplo, en la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, junto al E2 se detecta en plasma estrona, la cual juega también un papel estimulador de la síntesis de Vg. En esta misma especie el estriol es un inductor incluso más potente que el E2 de la secreción de Vg, pero este esteroide no aparece de un modo natural en la trucha (Bromage y Cumaranatunga, 1988). También los andrógenos son capaces de inducir la síntesis hepática de Vg, probablemente debido a su conversión a estrógenos por aromatasas hepáticas (Peyon *et al.*, 1992).

En la lubina, la función estimuladora del E2 en la síntesis de Vg se mostró por medio de inyecciones intraperitoneales de E2 a diferentes dosis las cuales produjeron, en

todos los casos, una elevación en el contenido de proteínas totales en plasma y la aparición masiva de Vg (Mañanós *et al.*, 1994 a).

En los últimos años se han aislado y caracterizado las moléculas de Vg de multitud de especies de teleósteos, incluida la lubina, *Dicentrarchus labrax*, (Mañanós *et al.*, 1994 a, b). La Vg es una glicolipofosfoproteína que contiene aproximadamente un 20% de lípidos (Frémont *et al.*, 1984), principalmente fosfolípidos (FL; Norberg y Haux, 1985). Hasta el momento la fracción de carbohidratos no ha sido caracterizada. En cuanto a la fracción peptídica, los análisis de aminoácidos han mostrado que las Vgs de los teleósteos presentan una composición similar a la de los otros vertebrados ovíparos, excepto en el contenido de serina, que generalmente es más bajo en teleósteos (Tyler, 1991). Además, las diferencias observadas entre especies son debidas, en buena parte, a los procesos de translocación que sufre la molécula (Ding *et al.*, 1989). Una vez que llega a la circulación la Vg se acompleja con diferentes iones, principalmente calcio que puede llegar a representar el 0.5-0.6% de su peso (Bjornsson y Haux, 1985).

El peso molecular de la Vg oscila entre 200 KDa (Wallace y Selman, 1990) a unos 440 a 600 KDa en salmónidos (Tyler 1991). En la lubina el peso molecular de la Vg, determinado por cromatografía de gel filtración, resultó ser de aproximadamente 445 KDa, mientras que por electroforesis en gel de poliacrilamida la Vg se situó en una banda que correspondía a aproximadamente 510 KDa (Mañanós *et al.*, 1994 a).

Los estudios ultraestructurales de folículos procedentes de peces inyectados con Vg marcada con peroxidasa, mostraron que esta glicolipofosfoproteína pasa a través de los espacios intercelulares de la teca y la granulosa, atraviesa los canales del corion y

llega a las vesículas de endocitosis que aparecen en el ooplasma periférico (Wallace y Selman, 1990). Se ha demostrado que la incorporación de Vg a los oocitos se produce por un mecanismo de endocitosis mediado por la unión específica de Vg a receptores de membrana (Tyler, 1991). En diferentes especies de teleósteos como la carpa o el pez rojo (Stifany *et al.*, 1990; Le Menn y Nuñez Rodríguez, 1991) se han aislado y caracterizado los receptores de Vg que resultaron ser de baja afinidad y alta capacidad. También en lubina se ha demostrado la existencia de receptores específicos de Vg en las membranas de los oocitos, poseyendo estas moléculas unas características muy similares a las demostradas para los receptores de Vg de otras especies de teleósteos (Mañanós *et al.*, 1997 b). La captación de Vg por el oocito sólo se produce cuando éste ha alcanzado un cierto tamaño. Ello puede ser debido bien a la ausencia de receptores de Vg durante el desarrollo temprano del oocito o bien a que los receptores de Vg, aunque presentes, no sean activos (Tyler 1991).

El conocimiento actual sobre las hormonas implicadas en el control de la incorporación de Vg a los oocitos es muy limitado. Parece ser que las gonadotrofinas juegan un papel fundamental en la modulación de estas funciones. En muchas especies de peces se han identificado dos tipos de gonadotrofinas: la GtHI y la GtHII, que serían equivalentes a las hormonas FSH y LH de tetrápodos, respectivamente (ver sección 1.3 de esta misma Introducción). En la trucha arco iris la GtHI, pero no la GtHII estimuló la incorporación de Vg en folículos aislados de trucha en vitelogénesis temprana o media. Sin embargo fue inefectiva en folículos vitelogénicos. La GtHI podría actuar a dos niveles: regulando el número y la velocidad de renovación de los receptores de Vg y/o afectando a la capacidad de acceso de la Vg a través del tejido folicular hasta los oocitos (Tyler *et al.*, 1991). Sin embargo, parece ser que la GtHI ejerce su papel sobre las células foliculares

ya que ni la GtHI ni la GtHII tuvieron ningún efecto sobre oocitos de trucha defoliculados (Shibata *et al.*, 1993). En ciprínidos la situación debe de ser diferente ya que tanto la GtHI como la GtHII fueron capaces de estimular la incorporación de Vg en oocitos de pez rojo (Nuñez Rodríguez *et al.*, 1992) a los que se había despojado de la envoltura folicular.

Una vez secuestrada por los oocitos la vitelogenina es degradada proteolíticamente y da lugar a otras proteínas de menor tamaño (revisado por Ng e Idler, 1983; Wallace, 1985; Mommsen y Walsh, 1988; Selman y Wallace, 1989). Este proceso está muy bien documentado en especies de anfibios y de aves (Wallace 1985). En el caso de un anfibio, el *Xenopus*, en el que la vitelogenina aparece en la sangre como un dímero formado por dos polipéptidos exactamente iguales, tras el proceso de degradación se producen dos tipos mayoritarios de proteínas del vitelo, la lipovitelina y la fosvitina. La Lipovitelina es una lipoproteína de un elevado peso molecular que aparece como un dímero. La fosvitina es un proteína, altamente fosforilada, que contiene alrededor de un 10% de fósforo como ortofosfato esterificado.

Los estudios estructurales sobre la vitelogenina y las proteínas del vitelo en los teleósteos han estado limitados a las especies de salmónidos. Del mismo modo que en los anfibios y las aves, en los salmónidos la Vg da lugar, mayoritariamente a lipovitelina y a fosvitina (Wiegand, 1982; Ng e Idler, 1983). Sin embargo, en los huevos de estas especies también apareció un componente nuevo en las proteínas del vitelo. Esta nueva molécula fue denominada componente β (Campbell e Idler, 1980) o bien componente E2 (Hara e Hirai, 1978). En el año 1993, Hara y sus colaboradores, demostraron que el componente β y el componente E2 eran, en realidad, una misma molécula. Recientemente se ha identificado, por primera vez, la presencia de este componente β junto a la

lipovitelina y la fosvitina en una especie de pez marino, el *Verasper moseri* (Matsubara y Sawano, 1995). Todas estas proteínas se almacenan en gránulos de vitelo que, a medida que la vitelogénesis progresa, aumentan en número y tamaño, fusionándose eventualmente entre ellos para dar lugar a una masa continua de vitelo (Tyler, 1991).

Puesto que la Vg es una glicolipofosfoproteína la composición en ácidos grasos de su fracción lipídica va a reflejar la composición en ácidos grasos de los alimentos administrados a los reproductores. Deficiencias nutricionales en algunos de estos ácidos grasos dieron lugar en trucha arco iris a alteraciones en la composición de la Vg (Frémont *et al.*, 1984). Tales alteraciones pueden afectar a la formación y desarrollo del oocito, influenciando directamente la fecundidad. Además la composición de la Vg también se verá reflejada en la composición de las reservas del huevo. De este modo se ejerce una influencia directa sobre la viabilidad del huevo, las tasas de eclosión y la supervivencia larvaria. Por otro lado ciertos componentes de la dieta pueden ejercer una influencia directa sobre los procesos hormonales que controlan el proceso de vitelogénesis. Así por ejemplo, es necesario un adecuado suministro de colesterol que sirva de precursor para la síntesis de esteroides (Nagahama, 1983). Del mismo modo el ácido araquidónico ha de encontrarse en la cantidad necesaria, y en adecuada proporción con otros ácidos grasos, para ejercer su función de modulador de la secreción de gonadotrofina (Eberhardt y Kiesel, 1992), hormona que, a su vez, tiene una función muy importante en el control de la secreción de E2.

Maduración oocitaria.

Una vez que la vitelogénesis se ha completado en el oocito tiene lugar la maduración oocitaria. En esta fase se produce una migración de la vesícula germinal ("Germinal Vesicle Migration", GVM) hacia el polo animal donde desaparece. Este paso señala la finalización de la primera profase meiótica. Los cromosomas entonces se condensan, se forma un huso y se produce la extrusión del primer corpúsculo polar, marcándose así el final de la primera división meiótica (Revisado por Nagahama, 1993).

La maduración oocitaria, en peces, es regulada principalmente por tres mediadores. La GtHII, que actúa a nivel de las células foliculares; una hormona inductora de la maduración ("Maturation Inducing Hormone", MIH), que interviene en la superficie del oocito; y un factor promotor de la maduración ("Maturation Promoting Factor", MPF), cuya acción se localiza a nivel del ooplasma.

La GtHII es el factor endocrino responsable de la inducción de la maduración oocitaria. Esta hormona estimula la formación de 17α -hidroxi-4-pregnen-3-ona (hidroxiprogesterona) a nivel de las células tecales y de 20β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (HSD) en las células de la granulosa. Esta enzima está involucrada en la conversión de la hidroxiprogesterona, que difunde desde las células tecales, a 17α - 20β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (dihidroxiprogesterona, $17, 20\beta$ P), que es considerada como el MIH en la mayor parte de las especies de peces (Nagahama, 1987). Este modelo, al igual que el de formación de E2, no puede aplicarse al caso de *Fundulus heteroclitus*, en el que todas estas funciones se realizan exclusivamente a nivel de las células de la granulosa (Petrino *et al.*, 1989).

Además de la 17, 20 β P otros esteroides también pueden actuar como MIH. Así en *Micropogonias undulatus* (Trant y Thomas, 1988) y en *Cynoscion nebulosus* (Trant y Thomas, 1989) este papel es asumido por la 17 α - 20 β - 21 trihidroxi-4- pregnen-3- ona. (trihidroxiprogesterona; 17, 20 β ,21 P)

Frente a la idea generalizada de que los esteroides poseen receptores únicamente a nivel citosólico o nuclear, nos encontramos con que los receptores para la 17, 20 β P se detectaron en la membrana oocitaria de la trucha arco iris (Yoshikuni *et al.*, 1993) y los de la 17, 20 β ,21 P en la de la *Cynoscion nebulosus* (Patiño y Thomas, 1990). La interacción del MIH con su receptor de membrana provoca la activación del MPF. El MPF presenta dos componentes: una subunidad catalítica, que es la proteína p34^{cdc2}, también denominada catalasa cdc2 y una subunidad reguladora o ciclina B. Mediante anticuerpos específicos contra estas proteínas se examinó su aparición durante el proceso de maduración oocitaria inducido in vitro mediante 17, 20 β P en pez rojo (revisado por Nagahama *et al.*, 1993). Se encontró que el contenido de proteína p34^{cdc2} no mostraba variaciones durante el proceso de maduración oocitaria. Sin embargo la ciclina B estaba ausente en extractos de oocitos inmaduros y apareció cuando en los oocitos se producía la migración de la vesícula germinal. La ciclina B que se formaba durante la maduración oocitaria aparecía marcada radiactivamente cuando los oocitos se incubaron con metionina (³⁵S). Este hecho indicaba que la ciclina B se estaba sintetizando durante el proceso de maduración oocitaria. Al introducirse la ciclina B en extractos de oocitos inmaduros se indujo la activación de la proteína p34^{cdc2}. Esta activación estaba asociada con un proceso de fosforilación de la treonina en la proteína p34^{cdc2} y de la serina en la ciclina B. Todos estos resultados sugieren que la 17, 20 β P induce en los oocitos la síntesis de ciclina B, que por su parte activa la proteína p34^{cdc2} allí presente a través de la fosforilación de la

treonina. Estos dos componentes del MPF están relacionados con procesos de meiosis y mitosis en multitud de organismos, desde levaduras a mamíferos (Yaron, 1995).

Cuando los oocitos ya han madurado sobreviene el fenómeno de ovulación. Los oocitos se liberan del folículo que los envuelve y son liberados al exterior en el momento de la puesta. Al ser fertilizados, el espacio perivitelino se llena de agua y, a partir de ese momento, el corion se vuelve impermeable a cualquier movimiento de agua o de otras sustancias.

En mamíferos se ha descrito que las restricciones en la dieta o el ayuno pueden ocasionar cambios en la secreción de gonadotrofina (Warnhoff *et al.*, 1983; Day *et al.*, 1986; Rutter y Manns, 1987). Esto, a su vez podría dar lugar a una disminución de la fecundidad o a la producción de huevos de mala calidad. Actualmente, en peces, no existen estudios que relacionen el tipo de dieta con modificaciones de la secreción de gonadotrofina. Sin embargo resultarían sumamente útiles para comprender mejor las deficiencias que se han observado repetidas veces en el proceso de reproducción y que se han atribuido a una dieta inadecuada.

Atresia.

La atresia es un fenómeno de degeneración del oocito. Este proceso permite que los oocitos que no llegan a madurar sean reabsorbidos por el tejido ovárico. La atresia puede presentarse en cualquier momento del desarrollo oocitario aunque lo más común es que aparezca en las fases de vitelogénesis y postovulatoria (Bromage y Cumaranatunga, 1988). De entre todos los procesos que tienen lugar en el ovario durante su desarrollo únicamente la atresia puede ocasionar las masivas reducciones en el número de oocitos

que tienen lugar entre el reclutamiento inicial de las oogonias y la ovulación. Así, por ejemplo, en trucha arco iris pueden existir hasta 15000 oocitos en previtelogénesis por 100 g de peso corporal. Este número se reduce progresivamente de modo que únicamente unos 200 oocitos por 100 g de peso corporal llegan a ser ovulados y liberados al exterior.

El primer signo de atresia es una deformación del folículo que puede conllevar una separación de las diferentes capas foliculares y del ooplasma. Posteriormente, la atresia se desarrolla de modo diferente según el estado de desarrollo en que se encuentren los oocitos. En los oocitos previtelogénicos y vitelogénicos las células de la granulosa se hipertrofian, rompen la zona radiata y comienzan a fagocitar el ooplasma y el vitelo si es que está presente. Al inicio de esta fase la membrana nuclear se rompe y el núcleo descarga su contenido en el ooplasma. La teca, por lo general, se mantiene inactiva y no interviene en este proceso invasivo. Como consecuencia de todos estos procesos gradualmente el vitelo se licua y vacuoliza. Esta masa de células va reabsorbiéndose por el tejido ovárico. En el caso de oocitos que ya han madurado u ovulado la zona radiata se mantiene intacta y las células hipertrofiadas de la granulosa no llegan a penetrar a través de ella. Posteriormente la zona radiata se separa claramente de la granulosa y del vitelo y en este último tienen lugar procesos de autólisis. Al final de todos estos procesos la masa de vitelo y la zona radiada acaban por desaparecer y los restos del folículo forman una masa compacta e irregular.

Cualquier alteración de los procesos implicados en el desarrollo ovárico produce atresia. Las deficiencias dietéticas que van a modificar el normal suministro de nutrientes a los oocitos en desarrollo y a alterar los procesos de vitelogénesis, maduración y ovulación están normalmente asociadas con una elevación de los niveles de atresia

(Bromage y Cumaranatunga, 1988; Bromage *et al.*, 1995). La atresia, a su vez, es la principal causa de la disminución de fecundidad y, por lo tanto, de la calidad de las puestas obtenidas.

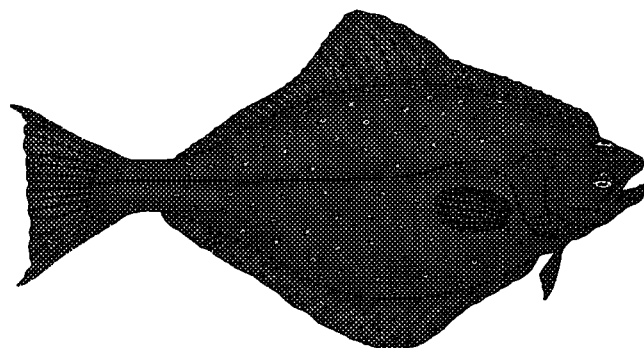
Modelos de desarrollo ovárico en teleósteos.

Marza (1938) estableció en los teleósteos tres tipos básicos de ovario, de acuerdo con el ritmo de desarrollo oocitario que presentaban. Esta clasificación fue después revisada por de Vlaming (1983). Los ovarios denominados sincronos son aquellos en los cuales todos los oocitos se desarrollan y ovulan al unísono. Las especies con este tipo de ovario, por ejemplo *Oncorhynchus masou*, (Yamamoto, 1959) producen una única puesta en su vida y después mueren. El segundo tipo es el de los ovarios sincronos por grupos, en los cuales aparecen al menos dos clases diferentes de oocitos: unos en las fases tempranas de desarrollo que no llegan a ovular y constituyen la reserva para ulteriores períodos de puesta y otros, normalmente los más numerosos, que entran en vitelogénesis y son liberados en el período de puesta inmediato. Este tipo de ovario es el más común entre los teleósteos apareciendo, por ejemplo, en el arenque, *Clupea arengus* (Bowers *et al.*, 1961) y en platija, *Liopsetta obscura* (Yamamoto, 1956). Finalmente, hay que considerar el ovario asíncrono en el que, en el momento de la puesta, pueden encontrarse oocitos en todos los estados de desarrollo. En este caso el período de freza es muy largo y, durante el mismo, se producen varias puestas. Especies con este tipo de ovario son el pez rojo, *Carassius auratus* (Yamamoto *et al.*, 1961), la cabrilla, *Paracentropristis cabrilla* (Zanuy y Carrillo, 1973) o la dorada (Zohar *et al.*, 1995).

En el caso concreto de la lubina se ha observado que, de entre todo el conjunto de oocitos en estados iniciales de desarrollo, solamente algunos grupos continúan

su desarrollo normalmente. Debido a ello los ovarios de esta especie se consideran como síncronos por grupos. Los grupos que inician su desarrollo pueden detenerse en la fase de postvitelogénesis antes de reiniciarlo de nuevo para alcanzar la maduración (Mayer, 1990). La estrategia reproductora de la lubina se caracteriza por la producción de varias puestas dentro del mismo ciclo, liberándose al medio varios grupos de huevos en rápida sucesión. Estos datos han sido confirmados en un reciente estudio en el que se indujo la puesta con LHRHa (Alvariño *et al.*, 1992).

En los estudios ha sido utilizado el ovario completo (Mayer *et al.*, 1990) o bien, una muestra obtenida por canulación (Alvariño *et al.*, 1992). Se plantea la duda de si todo el ovario se desarrolla de una manera homogénea o de si existe un gradiente en ese desarrollo desde la parte anterior a la posterior del ovario. Ello hace que sea importante plantear estudios que permitan aclarar si el desarrollo del ovario se produce de una manera homogénea para asegurar que las canulaciones permiten obtener biopsias que reflejan el estado general de desarrollo ovárico. Además, se ha observado que el tipo de dieta administrado a la lubina tiene un efecto claro sobre los resultados de puesta y fecundidad y, por lo tanto, ha de influir sobre los ritmos de desarrollo de los oocitos (Cerdá *et al.*, 1994, 1995) (Ver sección 3). Todos estos hechos hacen que resulte de sumo interés averiguar cual es el momento preciso en que el desarrollo oocitario se ve afectado por la dieta.



Fletán atlántico

1.2.- Espermatogénesis y Espermiogénesis.

En la mayor parte de los teleósteos los testículos aparecen formados por todo un conjunto de lóbulos en los que se encuentran las células denominadas de Sertoli. Los espacios intersticiales existentes entre los lóbulos contienen vasos sanguíneos y linfáticos, fibroblastos y células de Leydig, de origen somático, que secretan la mayor parte de los esteroides testiculares (Revisado por Yaron, 1995).

Las finas uniones existentes entre las células de Sertoli dan lugar a los compartimentos en los que las células germinales se desarrollan sincrónicamente en cistos. El proceso de formación de los espermatozoides a partir de estas células germinales es lo que se llama espermatogénesis. Las espermatogonias proliferan por medio de repetidas divisiones mitóticas y crecen para formar los espermatocitos primarios. Estos se transforman en espermatocitos secundarios tras la primera división meiótica. Al sufrir la segunda división meiótica aparecen las espermátidas, que, tras una serie de modificaciones, adquieren movilidad y se transforman en los gametos funcionales o espermatozoides (Hoar, 1969).

El proceso de espermatogénesis comienza al ser estimulada, en las células de Leydig, la secreción de 11KT por la gonadotropina. La 11KT actúa sobre las células de Sertoli que activan las espermatogonias iniciando las divisiones mitóticas y el proceso de diferenciación hasta espermátidas (Miura *et al.*, 1991). Estas espermátidas adquieren movilidad en su paso a través del conducto espermático. Este proceso es favorecido por la acción de una hormona producida en las mismas espermátidas, la 17, 20 β P. Este estrógeno provoca un incremento del pH y de la concentración espermática de cAMP, fenómenos que parecen ser causantes de la adquisición de movilidad (Miura, 1992).

1.3.- Control Endocrino del Proceso Reproductor.

Función de las hormonas metabólicas.

Durante el ciclo reproductor el proceso de gametogénesis va a influir profundamente en los requerimientos energéticos y nutricionales de los peces maduros (Dickhoff *et al.*, 1989). Sin embargo, aunque existe un conocimiento cada vez más detallado del papel jugado por las hormonas directamente implicadas en la reproducción, todavía no se tiene una idea clara de cómo actúan las hormonas metabólicas. Estas últimas han de regular las rutas anabólicas y catabólicas para garantizar que se almacena una cantidad de substratos y energía lo suficientemente grande durante la previtelogénesis y que, además, puedan ser movilizados en el momento más adecuado para que los gametos puedan desarrollarse normalmente. Por otro lado las hormonas metabólicas pueden afectar directamente a la gónada regulando las tasas de gametogénesis, bien actuando individualmente o de un modo sinérgico con las hormonas reproductoras (Dickhoff *et al.*, 1989).

Hay claras evidencias de que las hormonas metabólicas juegan un papel muy importante durante el proceso reproductor. Se ha demostrado, por ejemplo, que los niveles plasmáticos de cortisol en salmónidos alcanzan niveles elevados durante la maduración sexual (McBride *et al.* 1986), lo que es, indudablemente, muy importante para la movilización de las reservas energéticas. Igualmente los niveles de triiodotironina (T3) y tiroxina (T4) se elevan en el salmón coho, *Oncorhynchus kisutch* (Leatherland y Sonstegard, 1980) y en el salmón atlántico, *Salmo salar* (Dickhoff *et al.*, 1989) antes de la maduración oocitaria. Una elevación similar en los niveles de T4 apareció también en trucha, *Salmo trutta* (Pickering y Christie, 1981). Estudios realizados *in vitro* también

sugieren un efecto sinérgico de la T3 con la GtH en el momento de provocar la maduración final del oocito y la migración de la vesícula germinal en salmón (Dickhoff *et al.*, 1989).

En diversas especies de teleósteos como el pez escorpión, *Scorpaena spp* (Plisetskaya *et al.*, 1976), el salmón (Dickhoff *et al.*, 1989) y la lubina (Gutiérrez *et al.*, 1987) la insulina muestra una fuerte elevación en plasma antes del inicio de la maduración gonadal. Se ha sugerido que este incremento en insulina plasmática podría estar induciendo el almacenamiento de proteínas y lípidos, mientras que el descenso de sus niveles durante la maduración, de un modo acorde con el aumento en los niveles de hormonas tiroideas al que se ha hecho referencia, estaría promoviendo los procesos de lipólisis (Dickhoff *et al.*, 1989).

Control hipotalámico de la secreción de gonadotrofinas.

El número de factores cerebrales que actúan de una manera directa o indirecta en la modulación de la secreción de gonadotrofina está aumentando rápidamente a medida que la investigación avanza. Actualmente, entre estos factores se incluyen diversos neuropéptidos (hormona liberadora de las gonadotrofinas (GnRH), neuropéptido Y (NPY) y opioides), monoaminas (dopamina, norepinefrina, serotonina) y aminoácidos (ácido γ -aminobutírico (GABA), taurina, glutamato y aspartato) (Kah *et al.*, 1993; Peter *et al.*, 1991). Además, existen indicios de que las terminaciones colinérgicas podrían participar también en esta regulación (Mikolajczyk *et al.*, 1993). Los dos factores hipotalámicos que presentan un papel preponderante en la regulación de la secreción de GtH son la GnRH, con una función estimulante, y el GRIF ("Gonadotrophin Releasing Inhibition Factor") con la función de inhibir la liberación de gonadotrofina. Esta función inhibidora de la secreción

de la GtH es ejercida por la dopamina en ciprínidos, silúridos y, en menor grado, en salmónidos (Peter *et al.*, 1991).

Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH).

Al hablar de GnRH no se hace referencia a una única molécula sino a un grupo de decapeptidos que presentan hasta nueve formas diferentes (Revisado por Sherwood *et al.*, 1991; 1994). La GnRH de mamíferos (mGnRH) fue la primera que se describió y aparece en el cerebro de todos los mamíferos estudiados así como en el de los anfibios y en el de condrósteos. En el cerebro de pollo se han aislado dos formas de GnRH: cGnRH-I y cGnRH-II (chicken GnRH I y II). La cGnRH-II se encuentra en todos los vertebrados examinados excepto en los Agnatos y en mamíferos placentarios. En los teleósteos la primera GnRH aislada se obtuvo a partir del cerebro del salmón (sGnRH) y, posteriormente, se ha visto que está ampliamente distribuida en todas las especies de teleósteos. Algunas formas específicas de GnRH se encontraron en el pez gato ("cat fish", cfGnRH), en el tiburón ("dogfish", dfGnRH) y en la lamprea (lGnRH-I y lGnRH-II). (Revisado por Sherwood *et al.*, 1994 y por Gothilf *et al.*, 1996) Recientemente se ha aislado y caracterizado una nueva forma de GnRH a partir del cerebro de dorada y se la ha denominado sbGnRH ("sea bream" GnRH) (Zohar *et al.*, 1995; Gothilf *et al.*, 1995). La estructura de todas estas formas de GnRH se muestran en la tabla I.1.

Tabla I.1. Secuencia de aminoácidos de las nueve formas conocidas de GnRH. Se utiliza la nomenclatura convencionalmente aceptada. En general, las formas de GnRH se nombran con un prefijo que corresponde a la especie en la que se aislaron por primera vez ("m: mammalian; c: chicken; sb: seabream; cf: catfish; s: salmon; df: dogfish; l: lamprey"). Las diferentes formas aparecen según su orden de similitud con respecto a la mGnRH. (Modificado de Gothilf et al., 1996).

mGnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly - NH ₂
cGnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly - NH ₂
sbGnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly - NH ₂
cfGnRH	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Asn	Pro	Gly - NH ₂
sGnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly - NH ₂
cGnRH-II	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Tyr	Pro	Gly - NH ₂
dfGnRH	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly - NH ₂
lGnRH-III	pGlu	His	Trp	Ser	His	Asp	Trp	Lys	Pro	Gly - NH ₂
lGnRH-I	pGlu	His	Tyr	Ser	Leu	Glu	Trp	Lys	Pro	Gly - NH ₂

Aunque en ciprínidos la GnRH está implicada en la secreción de la hormona del crecimiento (Lin et al., 1995), sin embargo, la función generalizada de la GnRH consiste en la estimulación de la secreción de GtH (Revisado por Peter *et al.*, 1991). Las variaciones de los niveles de esta hormona en el cerebro e hipófisis de diversas especies de peces son acordes con esta función. Así, en la trucha (Breton *et al.*, 1986), en el *Rutilus rutilus* (Breton *et al.*, 1987) y en el pez rojo (Yu *et al.*, 1987) se ha observado un aumento del contenido de GnRH en el cerebro e hipófisis durante la vitelogénesis y hasta la maduración-ovulación. En la hipófisis se produce una disminución en el contenido de GnRH en el momento de la maduración que probablemente esté relacionada con la

estimulación de la liberación de GtH. En la lubina se ha observado una caída similar en el contenido de GnRH en la hipófisis mediante la utilización de un ELISA específico para sGnRH (Kah *et al.*, 1994).

La función de un neuropéptido está fuertemente relacionada con con su localización anatómica en el cerebro. La situación de las neuronas en las que se expresan las diferentes formas de GnRH y su presencia en las terminaciones nerviosas que llegan hasta la pituitaria puede ser utilizada como una indicativo de su importancia en la regulación de la liberación de GtH. En general se acepta que los peces presentan al menos dos formas de GnRH que pueden presentar una distribución anatómica diferente. En términos generales parece ser que en todas las especies de teleósteos, así como en el esturión (*Acipenser baeri*) la forma de GnRH predominante en el cerebro posterior es la cGnRH-II. En el cerebro anterior (sistema olfativo, telencéfalo ventral, región preóptica y unión pituitaria-cerebro) de especies como el pez rojo, la trucha arco iris o el salmon masu (*O. masou*) y diversos perciformes marinos predomina la sGnR mientras que en el cerebro anterior de la anguila europea o del esturión aparece la mGnRH (Revisado por Kah *et al.*, 1993). La mayor relación de la mGnRH y de la sGnRH con el sistema hipotálamo-hipófisis indican un papel preponderante de estas formas en el control de la secreción de GtH.

En el cerebro de lubina americana (Gothilf *et al.*, 1995) y de dorada (Gothilf *et al.*, 1995; Zohar *et al.*, 1995) coexisten tres formas diferentes de GnRH: sbGnRH, cGnRH-II y sGnRH. Cuando estas tres formas de GnRH se inyectaron a hembras de dorada (Gothilf *et al.*, 1995; Zohar *et al.*, 1995) y de lubina americana (Gothilf *et al.*, 1995) se observó que las tres formas tenían diferente potencia en la liberación de GtH

siendo la cGnRH-II la más potente seguida por la sGnRH y por la sbGnRH. Este hecho no es único de estas especies ya que la mayor bioactividad de la cGnRH también se ha observado en pez gato (*Clarias gariepinus*) (Schulz *et al.*, 1993) y en pez rojo (Chang *et al.*, 1991). También se estudió la distribución en el cerebro de la lubina americana (Gothilf *et al.*, 1995) y en el de la dorada (Gothilf *et al.*, 1995, 1996) de estas tres formas de GnRH. Se observó que la sbGnRH se produce en la región preóptica, un área que controla la secreción de GtH, y aparece en elevadas concentraciones en la pituitaria de hembras maduras, lo que sugiere que en estas especies la sbGnRH es la forma con mayor relevancia en el control de la secreción de GtH. Por su parte la cGnRH-II aparece en el cerebro medio-posterior y la sGnRH se sintetiza en el telencéfalo anterior y se encuentra en baja concentración en la pituitaria. Dada la proximidad filogenética existente entre la lubina americana y la europea, es muy posible que en el cerebro de la especie que nos ocupa aparezcan las mismas formas de GnRH que en la lubina americana y con la misma distribución y funciones.

En la pituitaria de pez rojo se han identificado y caracterizado los receptores de GnRH (Habibi *et al.*, 1987) observándose la presencia de dos tipos diferentes: uno de alta afinidad-baja capacidad, y otro de baja afinidad-alta capacidad. Todas las formas de GnRH son capaces de ligarse a estos receptores, los cuales, además, presentan una variación estacional en número siendo más abundantes en la fase tardía de la recrudescencia gonadal (Habibi *et al.*, 1989).

Dopamina.

La dopamina ejerce una acción inhibitoria de la secreción de GtH en peces siguiendo dos caminos diferentes: a través de un efecto directo sobre las células

gonadotropas, o bien, actuando a nivel de la liberación de GnRH (Peter *et al.*, 1991). No obstante el grado de inhibición observado varía enormemente de unas especies a otras (revisado por Yaron, 1995), siendo, por ejemplo, muy neto y claro en el pez rojo (Peter *et al.*, 1986; Chang *et al.*, 1990) mientras que en salmónidos (Van der Kraak *et al.*, 1986) y tilapia (Gissis *et al.*, 1991) no es tan pronunciado; en el pez gato (*Heteropneustes fossilis*, Alok *et al.*, 1993) es mucho menor y está completamente ausente en *Micropogonias undulatus* (Copeland y Thomas, 1989). En la lubina la inhibición dopaminérgica resulta ser extremadamente débil (Carrillo *et al.*, 1995).

En estudios llevados a cabo usando células dispersas de pituitaria de pez rojo, en los que se utilizaron agonistas y antagonistas específicos de la dopamina, se llegó a la conclusión de que la inhibición dopaminérgica de la secreción de GtH se establece a través de receptores específicos de dopamina del tipo 2 (Chang *et al.*, 1990). Estudios inmunocitoquímicos en pez rojo mostraron, además, que existe una inervación dopaminérgica directa sobre las células gonadotropas (Kah *et al.*, 1986).

Gonadotrofinas.

La hormona luteinizante (LH), la foliculo estimulante (FSH) y la tirotropina (TSH) constituyen una familia de hormonas hipofisarias con estructura glicoproteica y con una enorme similitud estructural. Todas ellas poseen dos subunidades denominadas α y β , unidas por enlaces no covalentes. En los mamíferos la subunidad α es común a las tres hormonas dentro de una misma especie y su estructura posee un alto grado de conservación inter específico. La subunidad β , por el contrario, es específica para cada hormona (Kawauchi *et al.*, 1989). En la mayor parte de las especies de tetrápodos, si no

en todas, existen dos gonadotrofinas (GtHs) que son homólogas a la LH y a la FSH de mamíferos (Licht *et al.*, 1977).

Al iniciarse las investigaciones sobre las gonadotrofinas en peces únicamente fue aislada una forma hormonal de la hipófisis de carpa común (*Cyprinus carpio*) (Burzawa-Gerard, 1982), observándose que se trataba de una glicoproteína compuesta de dos subunidades α y β . Esta hormona por lo tanto tenía una estructura similar a la de las hormonas LH y FSH de mamíferos. En aquel momento se pensó que esta única gonadotrofina podría regular todos los aspectos de la reproducción de teleósteos.

El concepto de la dualidad de las gonadotrofinas en peces fue postulado, por primera vez, por Idler (Revisado por Idler y Ng, 1983). Este autor utilizó la cromatografía de afinidad sobre sefarosa con Concanavalina A en su trabajo. Observó que a partir de los extractos de la pituitaria de peces se obtenía una primera fracción que no se adsorbía a la concanavalina y que se denominó fracción Con A-I. Una segunda fracción quedaba adsorbida a la Concanavalina y se llamó Con A-II. La fracción Con A-I consistía en una molécula pobre en hidratos de carbono que mostraba una clara actividad en la regulación del desarrollo prematuracional del ovario. La fracción Con A-II inducía el proceso de maduración y ovulación de los oocitos. Sin embargo, la fracción Con A-I, con efecto vitelogénico, no parecía ser homóloga a la LH y FSH de mamíferos, ya que no se observó la existencia de dos subunidades ni presentó el carácter glicoproteico propio de las gonadotrofinas de mamíferos (Goos, 1991).

Suzuki *et al.*, (1988 a) extrajeron las glicoproteínas de la pituitaria de una especie de salmón del pacífico, *Oncorhynchus keta*, y las caracterizaron de forma

detallada. Se establecieron dos grupos diferentes de estas moléculas, de acuerdo con su peso molecular, punto isoelectrico, composición aminoacídica y residuo N-terminal (Suzuki *et al.*, 1988a). La actividad gonadotropa de estos dos grupos de glicoproteínas se demostró en vivo por su efecto sobre el crecimiento gonadal en juveniles de trucha arco iris (Suzuki *et al.*, 1988 b). Estas glicoproteínas se designaron GtHI y GtHII. Estas dos gonadotrofinas, de modo similar a las gonadotrofina de mamíferos, presentan dos subunidades (Suzuki *et al.*, 1988 b), la subunidad α y la subunidad β . En la GtHI se pueden encontrar dos formas de la subunidad α y una única subunidad β . Por su parte, la GtHII solo presenta una forma de la subunidad α , que es idéntica a la GtHI α 2, y dos variantes de la subunidad β , que son diferentes de la subunidad β de la GtHI.

Una dualidad similar se ha establecido también en el *Oncorhynchus kisutch*, (Kawauchi *et al.*, 1989; Swanson *et al.*, 1991), en el bonito, *Katsuwonus plelamis* (Kawauchi *et al.*, 1991), en el pargo japonés, *Pagrus major* (Tanaka *et al.*, 1993) y en el *Fundulus heteroclitus* (Lin *et al.*, 1992).

La existencia de dos gonadotrofinas diferentes en salmónidos no sólo viene sugerida por el hecho de que se puedan detectar dos glicoproteínas con estructura y características físico químicas diferentes. Estudios inmunocitoquímicos usando anticuerpos específicos de cada una de las subunidades β por separado, revelaron, además, que en la pituitaria de *O. keta*, trucha arco iris y salmón atlántico (*Salmo salar*) cada GtH es producida por un tipo de célula distinta (Nozaki *et al.*, 1990 a; Naito *et al.*, 1993). En trucha arco iris se observó que las células inmunorreactivas de GtHI aparecen con el inicio de la vitelogénesis y la espermatogénesis (Nozaki *et al.*, 1990 b). En el momento de la

maduración final ambos tipos celulares estaban presentes pero las células inmunorreactivas de GtHII dominaban.

Aunque existen ciertos matices que diferencian las funciones desempeñadas por estas hormonas en distintas especies se acepta, en general, que la GtHI actúa primordialmente durante el proceso de vitelogénesis estimulando la producción de esteroides sexuales y la incorporación de vitelogenina al interior del folículo (Tyler *et al.*, 1991). La GtHII por su parte, regula el proceso final de maduración y la puesta (revisado por Swanson, 1991). Utilizando RIAs para cada una de las GtHs ha sido posible observar, en salmónidos, que la GtHI predomina durante los procesos de vitelogénesis y oogénesis en hembras y de espermatogénesis en machos, mientras que la GtHII aparece en ambos sexos únicamente cuando el momento de la maduración y la puesta se acercan (Swanson *et al.*, 1991; Sumpter y Scott, 1989). Teniendo en cuenta esta diferenciación funcional la GtHI sería una hormona equivalente a la FSH de mamíferos y la GtHII a la LH.

En la lubina americana, *Morone saxatilis* (Hassin *et al.*, 1995), y en la dorada, *Sparus aurata* (Elizur *et al.*, 1996), se han clonado y caracterizado las secuencias de DNA que codifican las diferentes subunidades de la GtHI y de la GtHII. Además se ha aislado y caracterizado la GtHII de la lubina americana y se han desarrollado anticuerpos dirigidos contra la subunidad β de esta glicoproteína (Mañanós *et al.*, 1997 c). Estos anticuerpos han permitido la puesta a punto de un método inmunoenzimático para el análisis de GtHII en el plasma de lubina. Este mismo método de análisis puede ser utilizado en la lubina europea dada la estrecha relación filogenética que existe entre ambas especies.

En mamíferos se ha observado repetidamente que el ayuno o simplemente una disminución de la ración que se ofrece a los animales bajo experimentación afecta a la liberación pulsátil de LH (Warnhoff *et al.*, 1983; Day *et al.*, 1986; Rutter y Manns, 1987). La disminución de los niveles de LH y FSH observada en el plasma y pituitaria de ratas mantenidas en ayuno durante un corto período de tiempo estuvo asociada a una alteración del proceso de traducción, ya que la disminución de los niveles de RNA mensajero (mRNA) se observó más tardíamente (Bergendahl *et al.*, 1989). Además del efecto directo del ayuno sobre la translación del mRNA y transcripción de las gonadotropinas la disminución de su concentración probablemente también está asociada con alteraciones en la secreción de GnRH, puesto que el ayuno reduce claramente la expresión del gen de la hormona liberadora de LH (LHRH) en la rata (Gruenewald y Matsumoto, 1993). En los peces los estudios sobre el efecto de la dieta en la secreción de las hormonas gonadotropas son prácticamente inexistentes. Únicamente Kah *et al.* (1994) informaron de que en lubina alimentada con una dieta pobre en proteínas la liberación de GnRH se veía afectada en el momento de la puesta. Actualmente se hace necesario el diseño de nuevas experiencias que permitan alcanzar un conocimiento más profundo de esta materia.

Niveles plasmáticos de esteroides sexuales a lo largo del ciclo reproductor.

Una buena parte de los estudios relacionados con la endocrinología de la reproducción de peces se ha centrado en los cambios sufridos por los niveles plasmáticos de esteroides gonadales (revisado por Pankhurst y Carragher, 1991; Borg, 1994). No obstante en la mayor parte de los casos se han utilizado como modelo peces de agua dulce, principalmente salmónidos, siendo muy escasa la literatura referente a peces marinos.

Los niveles plasmáticos de los esteroides gonadales presentan un enorme rango de variación: desde menos de 1ng/ml hasta más de 100 ng/ml, pero muy frecuentemente las concentraciones que aparecen se acercan al límite inferior de ese intervalo (Pankhurst y Carragher, 1991).

Los niveles de E2 y testosterona (T), en las hembras, y de T, en los machos, aumentan paralelamente al incremento en peso gonadal y suelen presentar un pico que coincide con el inicio del período de puesta. En algunas ocasiones, como en el caso del *Ictalurus nebulosus* (Burke *et al.*, 1984) el pico de T precede al de E2, evidenciando el papel de la T como precursor del E2 en las hembras de teleósteos. También se ha observado un patrón bimodal en los niveles de estos esteroides, apareciendo un segundo pico al final de la época de puesta en algunas especies como, por ejemplo, la lubina (Prat *et al.*, 1990), la dorada, *Sparus aurata* (Kadmon *et al.*, 1985), gobio, *Gobius niger* (Bonnin, 1979) o *I. nebulosus* (Burke *et al.*, 1984). Pero el significado fisiológico de esta aparente bimodalidad no resulta claro. En la lubina pueden aparecer uno o dos picos de E2 dependiendo de las condiciones ambientales (Zanuy *et al.*, 1995) o de alimentación (Cerdá *et al.*, 1994, 1995).

Por lo general la T y la 11-ketotestosterona (KT) han sido los únicos andrógenos considerados en la mayor parte de los estudios llevados a cabo. La 11KT se ha considerado como una hormona típicamente masculina y, de hecho, sus niveles suelen ser más altos en machos que en hembras de teleósteos (Revisado por Borg, 1994). Ahora bien, es posible detectar este andrógeno en el plasma de las hembras de numerosas especies y, además en algunos casos, se ha encontrado que las hembras presentan valores tan altos como los machos, por ejemplo en *I. nebulosus* (Burke 1984). Los niveles de

andrógenos circulantes suelen señalar cambios estacionales relacionados con el ciclo reproductor. Generalmente los valores de T y 11KT alcanzan su máximo en la época de prepuesta (Borg, 1994) aunque siempre existen excepciones como en el espinoso, *Gasterosteus aculeatus*, (Mayer *et al.*, 1990b) en el que la 11KT presenta una clara elevación de su concentración plasmática en el período de puesta. Cuando diferentes andrógenos son estudiados simultáneamente suelen presentar un patrón similar de incremento y descenso de sus niveles plasmáticos (Borg, 1994). No obstante en salmónidos se ha encontrado frecuentemente que la T alcanzaba los valores máximos aproximadamente un mes antes que la 11KT (Scott y Sumpter, 1989), en concordancia con su papel como precursor de esta última.

En la lubina las variaciones de los niveles de esteroides en el ciclo reproductor han sido descritas detalladamente (Prat *et al.*, 1990) observándose una elevación de la concentración de E2 y de T a lo largo del proceso de vitelogénesis. El retraso de la época de puesta provocado por el uso de un fotoperíodo largo constante también dio lugar a una elevación más tardía de los niveles plasmáticos de E2 (Zanuy *et al.*, 1995). Por otra parte también se ha observado que la disminución de la ración (Cerdá *et al.*, 1994) con que se administró una dieta natural a los reproductores provocó una disminución de los niveles plasmáticos de E2. Del mismo modo, la calidad de las dietas administradas a los reproductores provocaron alteraciones en los niveles plasmáticos de esteroides (Cerdá *et al.*, 1995). Sin embargo, no apareció ningún patrón constante en la modificación de esos niveles ni tampoco llegaron a establecerse los mecanismos por los cuales los factores nutricionales podían llegar a alterar el proceso reproductor. Estos precedentes han evidenciado la necesidad de profundizar en el estudio de aquellos factores nutricionales que están afectando el funcionamiento normal del ovario en la secreción de esteroides.

2.- FECUNDIDAD Y CALIDAD DE LA PROGENIE.

2.1.- Fecundidad.

Con el término fecundidad se hace referencia simplemente al número de huevos producido por los reproductores. Puede expresarse como la cantidad de huevos que pone cada hembra, y entonces se habla de fecundidad total, o bien referirla a una unidad de peso, tratándose en este caso de la fecundidad relativa.

En salmónidos la fecundidad ha de estimarse tras la realización del masaje abdominal destinado a la obtención de los huevos (Kjorsvik *et al.*, 1990). Se hace necesario, por lo tanto, que en la hembra los oocitos hayan madurado y ovulado completamente o, de lo contrario, se estará subestimando la fecundidad. Este problema no se plantea en otras especies en las que es posible recoger los huevos por medio de colectores, directamente de los tanques en que se encuentran los reproductores, como es el caso de la presente investigación.

El cálculo de la fecundidad puede hacerse utilizando dos métodos diferentes (Bromage *et al.*, 1992). El denominado método volumétrico se basa en el trabajo de Von Bayer (1950) y consiste en calcular el número total de huevos presentes en el volumen recogido teniendo en cuenta cual es el volumen medio de los huevos de esa puesta, el cual se calcula a partir del diámetro medio observado. El método gravimétrico, en cambio, utiliza el peso medio de un huevo para calcular el número total de huevos presentes en el peso total recogido. Ambos métodos proveen estimaciones altamente correlacionadas con el contaje real de los huevos.

También se han realizado frecuentemente estimaciones de la fecundidad usando ovarios de peces que no llegaron a poner. En este caso se hace necesaria la digestión del tejido ovárico mediante un fijador que basa su acción en la presencia de óxido de mercurio (líquido de Gilson), así como la realización de cortes histológicos en oocitos de diferentes tamaños para conocer el estado de desarrollo que les corresponde. El conteo de huevos se realiza en una muestra de volumen o peso conocido para extrapolar los resultados al volumen o peso total del ovario. En el ovario de la platija, *Pleuronectes platessa*, por ejemplo, se realizó un conteo exacto del número de oocitos presentes mediante el uso de un contador automático de partículas (Witthames y Greer Walker, 1987). Utilizando una metodología diferente, Emerson y sus colaboradores (1990) realizaron estimaciones de fecundidad mediante el uso de cortes histológicos y basándose en el principio de que el volumen correspondiente a un determinado componente en el tejido es proporcional al área observada al ser seccionado. Por supuesto esta metodología asume el hecho de que los distintos componentes del tejido se disponen aleatoriamente en él. Sin embargo en todos estos métodos se está sobreestimando la fecundidad real puesto que no todos los oocitos observados, incluso los que ya hayan madurado, llegan a ovular y a ser liberados al exterior (Bromage *et al.*, 1992).

Factores que afectan a la fecundidad.

El tamaño de los reproductores influye profundamente en el número y tamaño de los huevos producidos (Bromage, 1995). Generalmente, a medida que el tamaño del pez aumenta se produce un incremento paralelo de la fecundidad y del diámetro de los huevos, lo cual se observa particularmente bien en salmónidos. Existen, no obstante, algunas excepciones, como la trucha arco iris (Bromage, 1995) o la lubina (Carrillo *et al.*, 1995), especies en las que parece haber una cierta tendencia a que la fecundidad relativa

se mantenga o incluso disminuya cuando el tamaño del animal aumenta. La edad de los reproductores parece ejercer también una cierta influencia sobre la fecundidad. Sin embargo hay que tener en cuenta que, probablemente, las variaciones de tamaño que se producen con la edad son en parte las responsables del incremento de fecundidad (Bromage y Cumaranatunga, 1988).

Por otro lado dentro de cada grupo de reproductores hay un componente genético que determina, en gran medida, los valores observados de fecundidad (Bromage, 1995). Este es un factor que hay que tener en cuenta cuando se realizan comparaciones entre los resultados obtenidos en experimentos en los que se usan grupos de animales con una procedencia completamente distinta.

En último término, la fecundidad viene determinada por la tasa de reclutamiento de oocitos previtelogénicos que pasan a estados de desarrollo más avanzados. Las oogonias, como se explicó anteriormente, experimentan las mitosis principalmente al finalizar la época de puesta lo que hace que, probablemente, la fecundidad se determine tempranamente en el ciclo reproductivo. Ahora bien, el número de oocitos que se desarrollan y, por lo tanto la fecundidad, normalmente va a estar modificado por la proporción de atresia que se presente (Springate *et al.*, 1995) y ésta, a su vez, está influida por las condiciones ambientales en que se desarrollen los reproductores. Así, por ejemplo, el ayuno puede llegar a provocar un 100% de atresia entre los reproductores y, por lo tanto, una caída drástica de la fecundidad.

2.2.-Calidad del huevo.

La rentabilidad económica de las explotaciones piscícolas depende, en buena medida, de un aporte adecuado de huevos de buena calidad, es decir, capaces de producir una descendencia viable, que llegue al estado adulto en las mejores condiciones para su comercialización (Kjorsvik *et al.*, 1984). Entre los factores que determinan la calidad del huevo hay siempre un componente genético, característico de los reproductores. Por otra parte, el tipo de nutrición que reciben los reproductores ejerce una influencia drástica en la composición bioquímica del huevo y, también, en su calidad. De este punto concreto se trata en profundidad en la próxima sección (sección 3.1 de la Introducción) dado que es uno de los objetivos de la presente investigación.

En salmónidos la calidad del huevo está profundamente influida por el momento en que se realiza el masaje abdominal (Springate *et al.*, 1984). Bajo condiciones de cría artificial los huevos de los salmónidos son ovulados, pero no llegan a ser liberados al exterior. Durante el período de retención en la cavidad corporal los huevos sufren un proceso de maduración de modo que es necesario esperar al momento más adecuado para hacer el masaje. Una elección inadecuada de este tiempo podría generar huevos inmaduros si el masaje se hace prematuramente o bien huevos sobremadurados cuando se realiza tardíamente. En ambos casos la viabilidad de los huevos disminuye drásticamente. En el caso de la trucha arco iris, por ejemplo, las mayores tasas de fertilización se obtienen cuando el masaje se lleva a cabo entre 4 y 10 días después de la ovulación.

Los parámetros utilizados como indicadores de la calidad de los huevos son muy variados. En las especies de huevos pelágicos la calidad de éstos está íntimamente ligada a su flotabilidad (McEvoy, 1984) de modo que una valoración de la calidad de una

puesta puede realizarse mediante el cálculo del porcentaje de huevos flotantes respecto al total. Este criterio ha sido regularmente usado en especies como el pargo japonés (Watanabe *et al.*, 1984a, b), en lubina (Carrillo *et al.*, 1989), la dorada (Fernández-Palacios *et al.*, 1995) o el rodaballo, *Scophthalmus maximus* (McEvoy, 1984). No obstante en algunos casos, como en el de la dorada, los huevos que no han sido fertilizados flotan durante varias horas después de la puesta, de modo que se hace necesario la utilización simultánea de varios criterios de calidad (Fernández-Palacios *et al.*, 1995).

Un carácter que puede señalar tempranamente la calidad de los huevos de una puesta es la simetría de las primeras divisiones celulares (Kjorsvik, 1990). En rodaballo también ha sido utilizado como indicativo de calidad la transparencia que los huevos presentaban a simple vista (McEvoy, 1984). El trabajo recientemente llevado a cabo en nuestro departamento ha evidenciado que ciertas variables que se ha sugerido podrían ser indicativos de la calidad del huevo como peso seco de los huevos, número de gotas de grasa y volumen de las gotas de grasa no resultan fiables en el caso de la lubina (Carrillo *et al.*, 1996).

El tamaño de los huevos es otra propiedad que se ha tomado repetidamente en consideración. Sin embargo es bien conocido que este parámetro muestra una considerable variación intra específica ya que está determinado básicamente por el genotipo de la generación parental. No obstante también se ve afectado por otros factores, como la edad y el tamaño de los reproductores (Springate y Bromage, 1985; Zastrow *et al.*, 1990; Monteleone *et al.*, 1990). No existe, sin embargo, un acuerdo claro sobre si el tamaño de los huevos influye en su tasa de eclosión, pues, incluso dentro de una misma

especie, como la trucha arco iris, han aparecido resultados contradictorios (Revisado por Bromage *et al.*, 1992). Lo que sí parece un hecho generalizado es que los huevos más grandes producen larvas a su vez mayores, estas son capaces de nadar con más fuerza, de evitar los depredadores más fácilmente y de capturar más y mayores presas. Por lo tanto la supervivencia final de estas larvas debería de ser, con mucha probabilidad, mayor que la de las provenientes de huevos más pequeños. Sin embargo, en trucha al menos, se da un fenómeno de crecimiento compensado que hace que las diferencias iniciales desaparezcan cuando el período de observación se alarga lo suficiente, es decir hasta más de cien días (Revisado por Bromage, 1992). En la lubina europea se ha podido establecer que el tamaño de los huevos determina el tamaño de las larvas, pero éstas diferencias, que resultaron significativas a los 10 días de vida de las larvas, dejaron de serlo a los 40 días de edad (Cerdá *et al.*, 1994a; Carrillo *et al.*, 1995c) En la lubina americana, *Morone saxátilis* (Monteleone *et al.*, 1990) no se vio este crecimiento compensado, pero probablemente ello fue debido a que el período de observación se redujo únicamente a 25 días. Las diferencias iniciales de tamaño en las larvas podrían suponer, por lo tanto, una influencia en las tasas de supervivencia en condiciones naturales, pero bajo las suaves condiciones de cultivo artificial no dan lugar a ninguna ventaja o desventaja.

Es evidente que la composición bioquímica de los huevos ha de ejercer una influencia directa sobre su calidad, ya que el normal desarrollo larvario depende de una adecuada concentración de reservas. Sin embargo parece que las variaciones observadas en componentes nutricionales básicos, como son las proteínas e hidratos de carbono no están relacionados de una manera clara con su calidad (Cerdá *et al.*, 1994; Washburn *et al.*, 1994). En cuanto al contenido lipídico se ha encontrado que en algunas especies marinas como el rodaballo, la platija o la lubina un elevado contenido total de lípidos en

los huevos se corresponde, generalmente, con una baja viabilidad (Devauchelle *et al.*, 1982). Este mismo efecto también se encontró en la lubina en un trabajo anterior realizado en nuestro laboratorio (Serrano, 1990). Del mismo modo, en el *Coregonus albula*, una especie de agua dulce, una concentración alta de lípidos en los huevos fue indicativa de su mala calidad (Kamler *et al.*, 1982. Tomado a partir de Kjorsvik *et al.*, 1990). Sin embargo las cantidades de ciertos micronutrientes como vitaminas o minerales y, en particular, la composición en ácidos grasos de los lípidos de los huevos ejercen una enorme influencia sobre su viabilidad y sobre la de las larvas que se produzcan (Kjorsvik *et al.*, 1990). Más adelante (sección 3.3) se trata de un modo extenso el tema de las necesidades de los animales adultos en estos nutrientes para que el proceso reproductor pueda llevarse a cabo con normalidad y el desarrollo del embrión tenga lugar de manera óptima.

Conviene indicar aquí que, en el presente trabajo, las dos variables utilizadas para para obtener una referencia de la calidad de los huevos han sido los porcentajes de viabilidad y de eclosión observados.

3.- INFLUENCIA DE FACTORES NUTRICIONALES EN EL PROCESO REPRODUCTOR

3.1.- Nivel de ingesta.

Dentro de todo el conjunto de procesos metabólicos que normalmente entran en funcionamiento dentro de un organismo ha de darse un equilibrio compensado entre el gasto energético destinado al crecimiento somático y el debido al proceso reproductivo. Es decir, la energía y el tiempo utilizados en uno de estos procesos no puede ser dirigida hacia el otro. Debido a ello, las restricciones en la dieta que no puedan compensarse con las propias reservas energéticas del organismo van a ocasionar algún tipo de alteración en el desarrollo del fenómeno de la reproducción.

La reducción de la cantidad de alimento administrada a los reproductores en condiciones experimentales provocó una disminución paralela de la fecundidad en la trucha arco iris (Bromage *et al.*, 1992), el espinoso (Wooton, 1979), o el *Melanogrammus aeglefinus* (Hislop *et al.*, 1978). Por otro lado, el nivel de ingesta también afecta al tamaño de los peces y, como se ha indicado en la sección anterior, la fecundidad depende en gran medida del tamaño del progenitor. Debido a ello, cuando en los estudios de restricción de la dieta se ve afectado tanto el crecimiento de los reproductores como los valores de fecundidad obtenidos es necesario realizar análisis de covarianza para separar el efecto de la dieta sobre la fecundidad del efecto debido a la reducción del tamaño de los reproductores (Bromage *et al.*, 1992). En una de las experiencias realizadas en el presente trabajo se estudió el efecto de la restricción de la ración sobre los resultados de puesta, sin embargo no aparecieron diferencias significativas en peso o longitud entre las hembras

alimentadas a ración o completa o a ración reducida, por lo que no se consideró necesaria la utilización de un análisis de la covarianza.

No hay que perder de vista la idea de que los peces no poseen los mismos requerimientos nutricionales a lo largo del ciclo reproductor. Cuando se llevaron a cabo experiencias de restricción de la dieta en trucha arco iris en diferentes períodos de tiempo a lo largo del año se observó que la fecundidad se establece muy tempranamente en el ciclo anual. Los cambios en fecundidad pueden deberse a modificaciones en la tasa de reclutamiento de las oogonias o bien de los oocitos previtelogénicos. Debido a ello son las restricciones en la dieta producidas durante los meses de prepuesta las que tienen un efecto claro sobre la fecundidad (Bromage, 1992)

Si la disminución de la cantidad de alimento no es lo suficientemente fuerte la fecundidad puede no verse afectada, pero aparecen otros efectos como un retraso y alargamiento de la época de puesta (Observado en lubina por Cerdá *et al.*, 1994) o una disminución del número de puestas (Bromage *et al.*, 1992).

En peces son prácticamente inexistentes los estudios acerca de la influencia de la restricción de la dieta sobre la regulación hormonal del proceso reproductor. Solamente Cerdá *et al.* (1994) observaron alteraciones en los niveles de E2 de hembras de lubina que habían recibido una dieta restringida, sin que los niveles de Vg se vieran afectados. En mamíferos se ha mostrado frecuentemente que el ayuno o la disminución de la dieta es capaz de afectar la secreción de GnRH y LH (Warnhoff *et al.*, 1983; Day *et al.*, 1986)

3.2. Requerimiento proteico y energético en peces.

La proteína es, en materia seca, el principal componente de los peces (65%-70%) depositándose mayoritariamente a nivel del músculo esquelético.

La proteína es para los peces la fuente de energía más importante. Los peces carnívoros presentan una fuerte dependencia de una dieta con un elevado componente proteico debido a su capacidad para metabolizar proteínas y su limitación para digerir y metabolizar carbohidratos (Cowey, 1979).

En muchos de los estudios hechos acerca del efecto de la cantidad de proteína presente en las dietas sobre la fecundidad y la calidad de los huevos no se ha tomado en consideración el origen y la calidad de la proteína administrada. Ello daba lugar a variaciones importantes de los resultados de unos experimentos a otros, siendo difícil establecer conclusiones definitivas (Luquet y Watanabe, 1986). Así, por ejemplo en la trucha, se ha observado que la cantidad de proteína de la dieta puede oscilar entre un 30 y un 50% aproximadamente (Takeuchi *et al.*, 1981b; Watanabe *et al.*, 1984a, b), siempre que la reducción en la cantidad de proteína se vea compensada por una elevación del contenido energético. Sin embargo, Washburn *et al.*, (1990) observaron que únicamente dietas con un contenido bajo (30%) o medio (45%) en proteínas daban resultados aceptables, mejorando considerablemente aquellos que se obtenían con piensos con un contenido alto (60%) de proteínas.

En el pargo japonés se ha visto, además, que el origen de las proteínas ejerce una enorme influencia sobre los resultados de puesta. Así, cuando se utilizó harina de sepia los porcentajes de viabilidad y de eclosión fueron más elevados que cuando se usó harina

de pescado (Watanabe *et al.*, 1984b, c). Probablemente la superioridad de la harina de sepia es debida al contenido en ácidos grasos de la fracción lipídica, pero también al de algunos micronutrientes presentes en la fracción no lipídica (Luquet y Watanabe, 1989).

En la lubina la utilización de dietas comerciales o formuladas con elevado contenido proteico dio lugar siempre a puestas con baja viabilidad y tasa de eclosión (Cerdá *et al.*, 1994, 1995) si se comparan con aquellas obtenidas de los reproductores alimentados con una dieta natural consistente en pescado triturado. Se ha sugerido que, probablemente, tales diferencias no sean debidas al contenido proteico de las dietas, sino más bien a la composición en ácidos grasos de la fuente de proteínas utilizada (Cerdá *et al.*, 1995).

A pesar de los numerosos experimentos realizados para establecer las necesidades proteicas en la dieta se sabe muy poco acerca de los requerimientos de los reproductores en aminoácidos. Se ha evidenciado que la sustitución de proteína de origen animal por otras de origen vegetal, en las dietas de los peces, reduce el crecimiento en una relación linear con respecto al grado de reemplazamiento (Viola y Arieli, 1982, 1983). Este efecto podría ser debido a deficiencias en ciertos aminoácidos esenciales de las proteínas de origen vegetal respecto a las de origen animal. De hecho Viola *et al.*, (1981) estudiaron durante varios años las condiciones que debían darse para llegar a reemplazar las proteínas animales por otras de origen vegetal. Estos autores llegaron a la conclusión de que, en la carpa, la harina de pescado utilizada como fuente de proteína podría ser parcial o completamente reemplazada por proteínas vegetales si éstas últimas eran enriquecidas con lisina, metionina y aceite. Este hecho evidencia las necesidades de ciertos aminoácidos esenciales en la dieta, así como el hecho de que la fracción liposoluble de

la fuente proteica juega un papel fundamental en la consecución de dietas de buena calidad.

3.3.- Requerimientos de ácidos grasos para el éxito reproductivo.

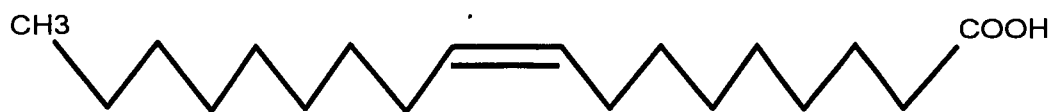
En la figura 1.1 se explica de forma esquemática la nomenclatura utilizada así como la estructura de los ácidos grasos a los que se va a hacer referencia con más frecuencia en este trabajo.

La importancia de los ácidos grasos en el mantenimiento de la estabilidad de la membrana plasmáticas salió a la luz a principios de este siglo al observarse que ratas alimentadas con dietas deficientes en ácidos linoleico (18:2 n-6), linolénico (18:3 n-3) y araquidónico (20:4 n-6) presentaban todo un conjunto de disfunciones metabólicas (Burr y Burr, 1929, 1930). La más evidente era que las ratas bebían copiosas cantidades de agua que resultaban ser mucho mayores que los volúmenes excretados. Se dedujo que una deficiencia en ácidos grasos esenciales (EFA, "Essential Fatty Acids") podría dar lugar a una alteración de la permeabilidad de la membrana de un modo tal que se estaba produciendo bien una considerable acumulación de agua en los tejidos, bien una enorme pérdida de agua a través de la superficie corporal (Revisado por March, 1992).

En los inicios de la preparación de dietas artificiales para peces, en concreto para trucha, se utilizó indistintamente aceite de semillas vegetales o aceite de pescado. Sin embargo, de un modo inmediato se observó que el uso del aceite de semillas estaba asociado con un lento crecimiento de los alevines en los que, además, aparecían todo un conjunto de patologías: aletas erosionadas, miopatías cardíacas, hígados pálidos. Todas ellas se hallaban relacionadas con la carencia de ácidos grasos de la serie n-3 que

presentaba el aceite de semillas (Lee *et al.*, 1967; Castell *et al.*, 1972a, b; revisión de March, 1992).

El huevo de los peces, como el de otros animales ovíparos, debe contener todos los nutrientes que el embrión necesita para su normal desarrollo hasta el momento de la eclosión y, además, para permitir el crecimiento de la larva mientras esta depende de las reservas del saco vitelino. Los lípidos presentes en el huevo son sintetizados, durante las primeras fases del desarrollo oocitario, en el mismo tejido ovárico (Ver sección 1.1) (Wiegand e Idler, 1982) pero durante el proceso de vitelogénesis exógena se incorporan al oocito por medio de la vitelogenina y de otras lipoproteínas. Puesto que la composición de los lípidos presentes en la dieta de los reproductores va a influir enormemente en la composición de sus tejidos y de la propia vitelogenina (Frémont *et al.*, 1984), también modularán la composición de los lípidos presentes en el huevo. Ahora bien, las necesidades reales de ácidos grasos para la formación de los oocitos en el ovario y para el posterior desarrollo de los huevos y larvas dependerá de cuales son los mecanismos de síntesis y de conversión de ácidos grasos que operan en estos animales. Resulta, por ello, interesante hacer un breve repaso del metabolismo general de los lípidos.



Acido oleico. 18: 1 (n-9)



Acido linolenico. 18: 3 (n-3)



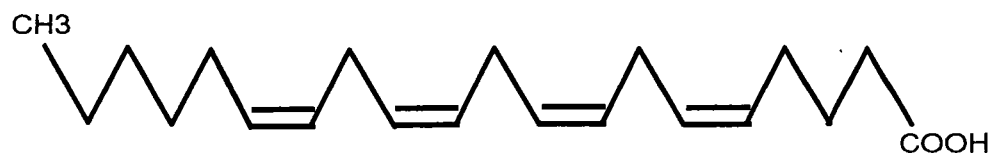
Acido eicosapentaenoico. 20: 5 (n-3)



Acido docosahexaenoico. 22: 6 (n-3)



Acido linoleico. 18: 2 (n-6)



Acido araquidonico. 20: 4 (n-6)

Figura I.1. Estructura de algunos de los ácidos grasos citados en el presente trabajo. En la nomenclatura elegida el primer número indica el número total de átomos de carbono de la molécula, el segundo número la cantidad total de dobles enlaces y, entre paréntesis se señala la distancia del primer doble enlace al extremo metilo terminal.

Mecanismos de síntesis de ácidos grasos.

El valor nutritivo de los lípidos se halla determinado, básicamente, por su contenido en ácidos grasos. Ciertos ácidos grasos se obtienen por biosíntesis a partir de los productos carbonados más simples del metabolismo energético: anhídrido carbónico (CO_2 , bajo la forma de bicarbonato) y ácido acético (bajo la forma de acetil-coenzima A, Ac-CoA). Esta biosíntesis, que tiene lugar en el citosol, conlleva el encadenamiento de átomos de carbono de dos en dos, y los principales ácidos grasos que se obtienen de este modo son los ácidos mirístico (C_{14}) y palmítico (C_{16}) (Mellinger, 1995).

Para conseguir toda la gama de ácidos grasos necesarios para la vida de las células de los diferentes tejidos otros sistemas enzimáticos proceden al alargamiento de las cadenas hidrocarbonadas hasta llegar a C_{18} , C_{20} y C_{22} , e incluso a unidades más largas, así como a la inserción de dobles enlaces en las cadenas, proceso, este último, denominado desaturación. Estos dos tipos de reacciones tienen una localización preferencial: las reacciones de elongación se producen en las mitocondrias y las reacciones de desaturación en las membranas del retículo endoplasmático. Los ácidos grasos obtenidos aparecen incorporados a los fosfolípidos (FL) de membrana y, bajo esta forma, son redistribuidos a todo el sistema de membranas de la célula.

En el sistema de elongación mitocondrial, los grupos acilo son transportados por el CoA, mientras que en el citoplasma es una proteína especial, la ACP ("Acil Carrier Protein") la que los transporta. El alargamiento de la cadena se realiza por el extremo -COOH terminal, que contiene el átomo de carbono nº1. Las desaturaciones tienen lugar en puntos precisos de la cadena y, normalmente, dan lugar a una isomería *cis*, que desvía la cadena 30° en cada uno de los dobles enlaces. Las enzimas que provocan estas

desaturaciones se llaman desaturasas y son denominadas con la letra griega Δ (delta) seguida de una cifra que indica el número de orden del átomo de carbono, contado a partir del extremo -COOH terminal, en el que se está produciendo el doble enlace.

Las desaturasas vegetales pueden operar entre el primer doble enlace y los grupos metilo o carboxilo terminal. El primer doble enlace aparece entre los átomos de carbono 9° y 10°: la enzima responsable es una desaturasa $\Delta 9$ y el principal producto de esta reacción es el ácido oleico (18:1 n-9). También puede aparecer, como consecuencia de esta reacción el ácido palmítico (16:1 n-7). Los dobles enlaces siguientes aparecen por la acción de otras desaturasas. A diferencia de los vegetales, en los tejidos animales sólo se producen desaturaciones a partir del extremo de la cadena correspondiente al grupo carboxilo terminal. Debido a ello sus ácidos grasos forman series distintas (n-9, n-6, n-3) entre las cuales no hay ninguna conversión posible. En la figura I.2 se muestran los ácidos grasos obtenidos tras las diferentes reacciones de alargamiento y desaturación.

Tal y como puede observarse en la figura I.2 las desaturasas $\Delta 6, \Delta 5$, y $\Delta 4$ están directamente relacionadas con la formación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, "Polyunsaturated Fatty Acids", ácidos grasos con tres o más dobles enlaces) de 20 y 22 átomos de carbono a partir de los ácidos grasos 18:3 n-3 (linolénico) y 18:2 n-6 (linoleico). Los ácidos grasos de la serie n-3 tienen una mayor afinidad por la desaturasa $\Delta 6$ y, probablemente también, por la desaturasa $\Delta 5$ que sus homólogos de la serie n-6 (Sargent *et al.*, 1995). Debido a la competición que se establece entre los ácidos grasos de las series n-3 y n-6 por los mismos enzimas es necesario que exista un balance correcto entre los ácidos 18:2 n-6 y 18:3 n-3, puesto que un exceso de 18:2 n-6 puede ralentizar la desaturación y alargamiento del 18:3 n-3 y viceversa.

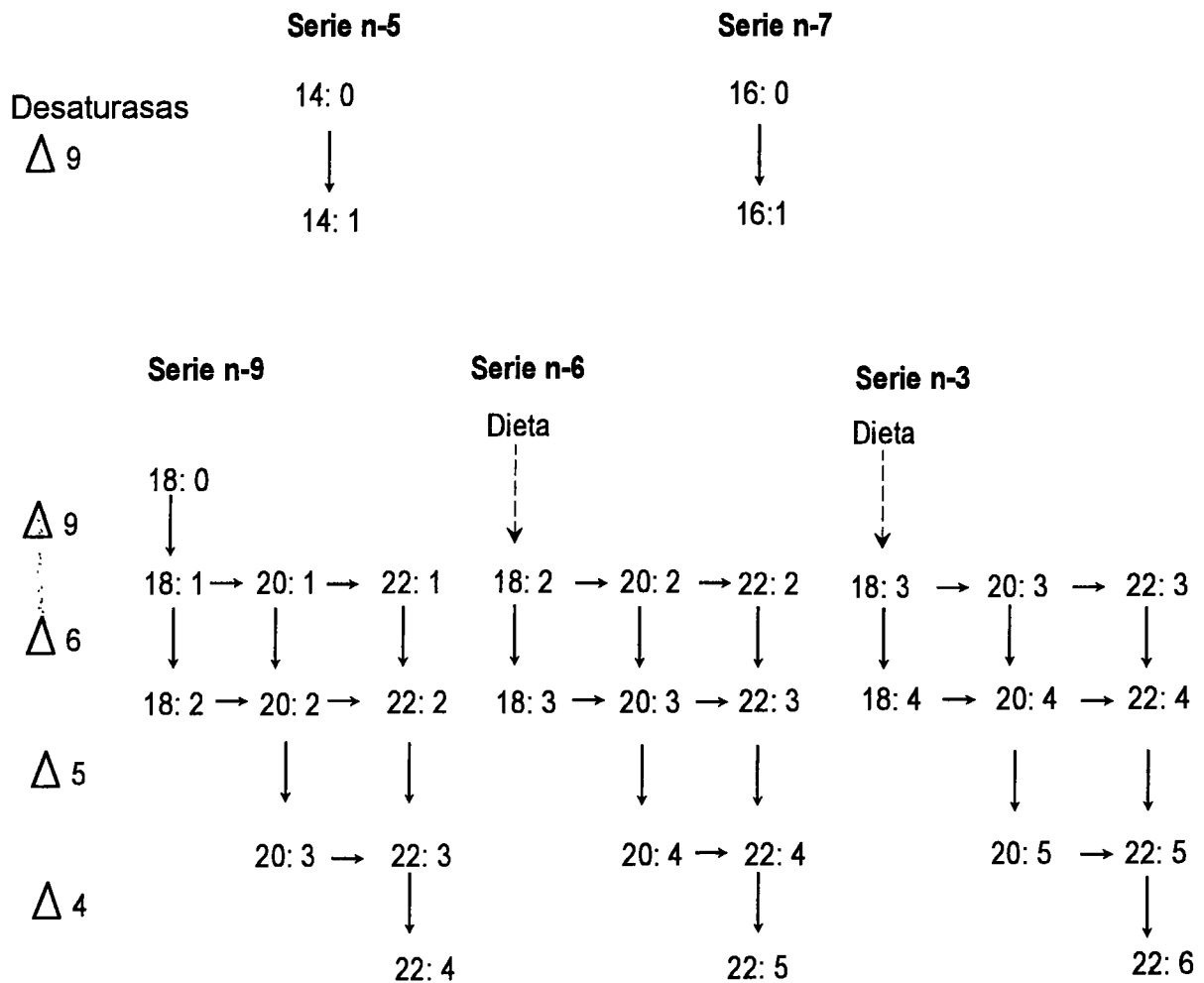
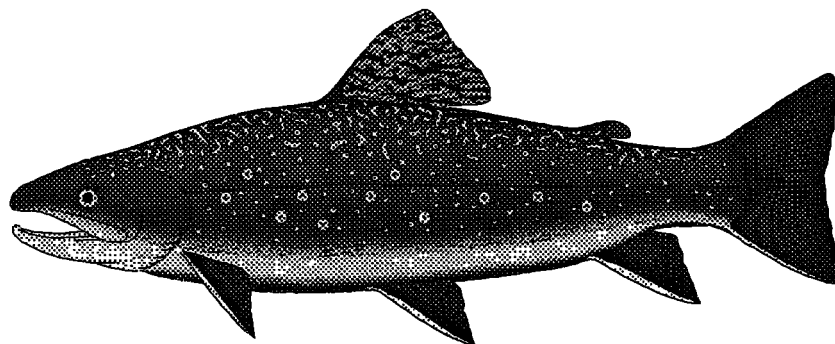


Figura I.2. Ácidos grasos obtenidos tras las reacciones de alargamiento y desaturación. Las líneas separan los ácidos grasos que aparecen por acción de las desaturasas. Dentro de cada casilla se señalan los ácidos grasos que aparecen por las reacciones de elongación. A partir de Mellinger (1995).

Por otro lado, no hay una evidencia directa de la existencia de una $\Delta 4$ desaturasa que lleve a cabo los últimos pasos representados en la figura (Sargent *et al.*, 1995). Se ha demostrado que, en realidad, la reacción llevada a cabo por la desaturasa $\Delta 4$ consiste en una serie de reacciones en las que se halla envuelta la desaturasa $\Delta 6$ (Voss *et al.*, 1991; Sprecher, 1993). En el nuevo esquema (figura I.3) el ácido 20:5 n-3 se alarga primero hasta 22:5 n-3 y, después, hasta 24:5 n-3. La $\Delta 6$ desaturasa convierte entonces el 24:5 n-3 en 24:6 n-3 que es entonces acortado hasta 22:6 n-3. Todas estas reacciones tienen lugar en los microsomas, excepto la conversión de 24:6 n-3 hasta 22:6 n-3 que tiene lugar en los peroxisomas.

Después de estos procesos se producen a nivel de los fosfolípidos, de forma incesante y en todo el conjunto de las membranas celulares, reacciones de acilación y desacilación que permiten incorporar estos ácidos grasos a los lípidos neutros. Además, los extremos polares de los fosfolípidos pueden intercambiarse de unos a otros lo que permite la interconversión entre fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas y fosfatidilserinas.



Trucha común

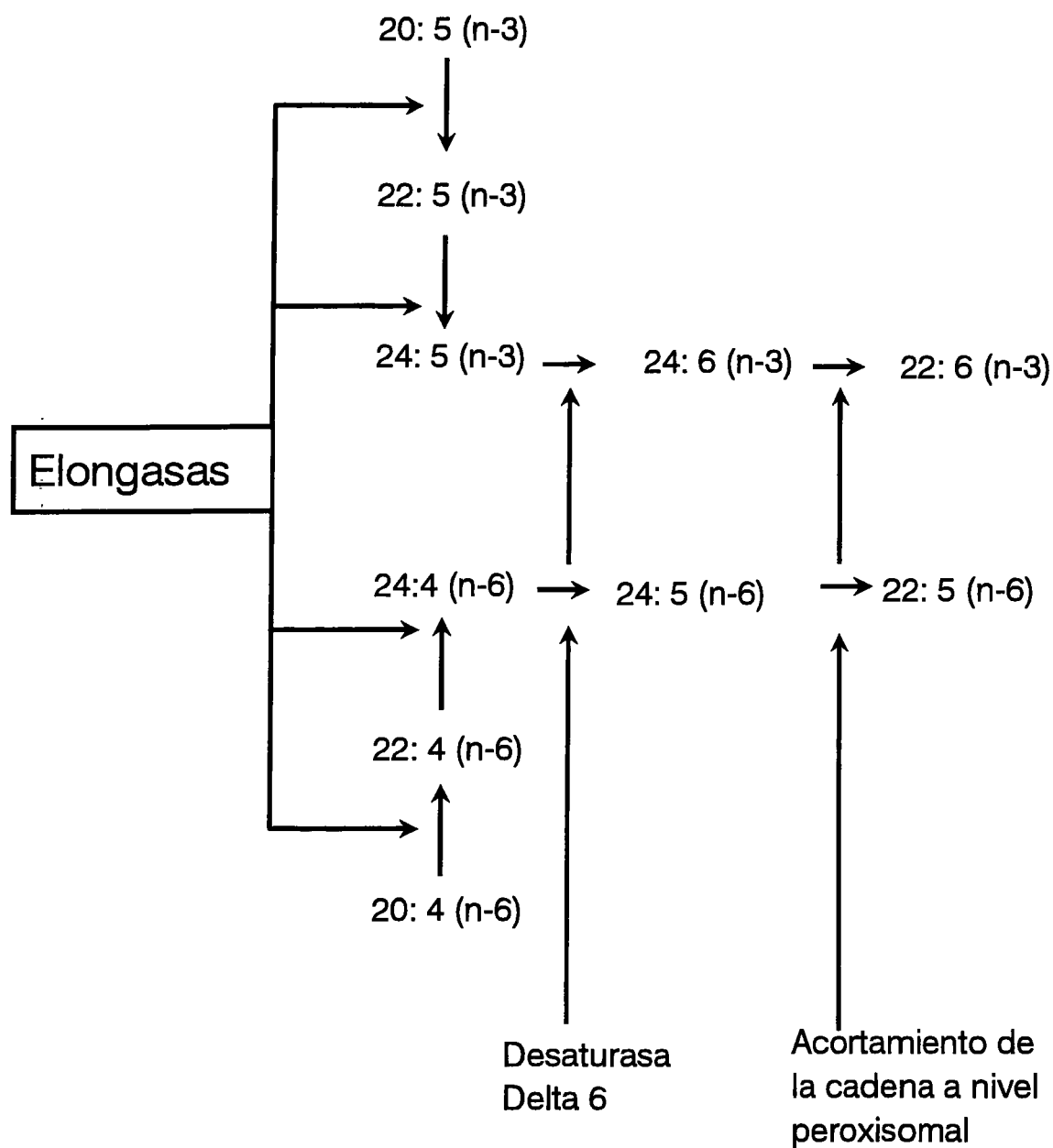


Figura I.3. Posible mecanismo alternativo para la desaturación de tipo $\Delta 4$, que implica a una desaturasa $\Delta 6$. Este mecanismo de alargamiento de los ácidos grasos que actuaría a nivel de los peroxisomas. (Modificado de Sargent *et al.*, 1995)

Necesidades de ácidos grasos en la dieta.

Los peces, como todo el resto de los animales no poseen las desaturasas $\Delta 12$ y $\Delta 13$ necesarias para la formación de los ácidos grasos linoleico (18:2 n-6) y linolénico (18:3 n-3) a partir del ácido graso 18:1 n-9. En consecuencia, todos los PUFA de las series n-3 y n-6 presentes en los lípidos de los peces provienen de los PUFA de las series n-3 y n-6 que se han formado en las plantas (Sargent *et al.*, 1989). A partir de los ácidos linoleico y linolénico se pueden producir reacciones de elongación y desaturación que permiten la formación de los ácidos grasos de las series n-3 y n-6 con mayor número de átomos de carbono. (Sargent *et al.*, 1989). Ahora bien, la capacidad para llevar a cabo estas reacciones varía de unas especies a otras. Así, las especies marinas, en general, carecen de las enzimas necesarias para alargar y desaturar los ácido linoleico y linolénico y, como consecuencia, han de poseer en la dieta una fuente de ácidos grasos de 20 y 22 átomos de carbono de las serie n-3 y n-6 (Bell *et al.*, 1985). Para confirmar estas cuestiones se realizaron experimentos en rodaballo (Linares y Henderson, 1991), dorada (Mourente y Tocher, 1993a) y *Liza aurata* (Mourente y Tocher, 1993b) consistentes en la inyección intraperitoneal de ácidos grasos C_{18} y C_{20} de las series n-3 y n-6 marcados radiactivamente con ^{14}C y en el estudio posterior de los ácidos grasos que aparecían marcados radiactivamente en diversos tejidos. Estos estudios han confirmado la limitada capacidad de las especies marinas para sintetizar los ácidos grasos altamente insaturados (HUFA, "Highly Unsaturated Fatty Acids") de C_{20} y C_{22} de la serie n-3, ácidos eicosapentaenoico (EPA "Eicosapentaenoic Acid", 20:5 n-3) y docosahexaenoico (DHA, "Docosahexaenoic Acid", 22:6 n-3) y el ácido graso C_{20} de la serie n-6, ácido araquidónico (AA, 20:4 n-6). Como resultado estos ácidos grasos han de ser administrados a través de la dieta y resultan ser ácidos grasos esenciales, EFA, para el normal desarrollo de los individuos (Watanabe, 1993).

En numerosos experimentos se ha relacionado la composición lipídica de las dietas con los resultados de puesta y la calidad de los huevos. En distintas especies, como dorada (Mourente y Odriozola, 1990a, b; Fernández-Palacios *et al.*, 1995), pargo japonés y trucha arco iris (Watanabe *et al.*, 1984b), dietas con un bajo contenido en EFA produjeron huevos y larvas de peor calidad que los obtenidos de reproductores alimentados con dietas mejor compensadas. Se ha puesto así en evidencia la necesidad de un aporte adecuado de EFA en la dieta, especialmente de DHA y EPA (Watanabe, 1993). Sin embargo los requerimientos nutricionales de ácidos grasos en cualquier especie animal, incluido el hombre, no se conocen con exactitud. En el caso de los peces, debido a la variedad de especies y al amplio rango de hábitats y dietas resulta imposible establecer unos criterios concretos. Este tema se complica todavía mucho más si se tiene en cuenta que la disponibilidad metabólica, y por lo tanto los requerimientos de EFA, está influenciada por la proporción existente entre ácidos grasos de las series n-3 y n-6 (March, 1992).

En la lubina Cerdá *et al.*, (1995) observaron una clara relación entre la composición de lípidos en la dieta y los resultados de puesta, encontrando que si los reproductores ingerían unos niveles bajos de PUFA de la serie n-3 se producía una dramática reducción de la fecundidad y de la viabilidad de los huevos con respecto a animales alimentados con dietas más equilibradas.

3.4. Vitaminas, minerales y oligoelementos.

El estudio de las necesidades por parte de los reproductores de algunas sustancias como vitaminas o minerales ha recibido especial atención en los estudios de nutrición ya que su deficiencia en la dieta afecta drásticamente a la composición y viabilidad de los huevos.

Existe una clara evidencia del efecto positivo de diversas vitaminas sobre las tasas de eclosión de los huevos (Takeuchi *et al.*, 1981a; Watanabe *et al.*, 1985). En concreto la deficiencia de ácido ascórbico (vitamina C) afecta al normal desarrollo de diversas funciones metabólicas como la hematopoyesis, las reacciones de detoxificación o los procesos inmunológicos (Sandness 1991). Sin embargo el hecho de que se encuentre directamente implicada en la hidroxilación de ciertos aminoácidos que intervienen en la formación del colágeno hace que los niveles de esta vitamina hayan de alcanzar valores normales para que el embrión se pueda desarrollar normalmente y el huevo llegue a la eclosión.

Lo que se conoce como vitamina E son todo un grupo de compuestos liposolubles, tocoferoles y tocotrienoles, que actúan como antioxidantes, protegiendo al organismo de la oxidación lipídica. De entre ellos el D- α tocoferol es el que presenta una mayor actividad como vitamina E dentro de los animales (Hamre y Lie, 1995). Deficiencias de esta vitamina provocan tanto en "ayu" (*Plecoglossus altivelis*, Takeuchi *et al.*, 1981a), como en carpa (Watanabe y Takashima, 1977) y en pargo japonés (Watanabe *et al.*, 1985) una disminución en la tasa de huevos viables y de eclosión de las puestas. El contenido adecuado de α tocoferol en las dietas es de aproximadamente 10 mg/100 g de dieta (Tokuda *et al.*, 1995).

Los trabajos acerca del requerimiento de vitaminas A y D en los reproductores son muy escasos (Luquet y Watanabe, 1986). Cuando se incrementa la ingesta de estas vitaminas también se observa una clara transferencia hacia los huevos, sin embargo sus efectos sobre la fecundidad y calidad de los huevos no han sido evaluados.

Es un fenómeno ampliamente conocido que los carotenoides contenidos en la dieta se acumulan a nivel de distintos órganos y en el músculo de salmónidos dan lugar a un apetecible color rosado que resulta comercialmente muy importante (Harris 1984). Ahora bien los estudios que relacionan el contenido en carotenoides con la fecundidad y la viabilidad de los huevos son muy escasos. En pargo japonés estos pigmentos ejercieron un efecto positivo sobre el porcentaje de huevos viables, y también se dio una disminución de las anomalías observadas en huevos y larvas (Watanabe *et al.*, 1984 a). Sin embargo, en el resto de las especies los experimentos realizados no arrojaron a la luz resultados definitivos acerca de las necesidades de estos pigmentos para el normal desarrollo del proceso reproductivo (Luquet y Watanabe, 1986).

II

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ESPECIE ESTUDIADA: LUBINA, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758).

La especie elegida como modelo experimental para el presente trabajo de investigación ha sido la lubina, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). La razón básica que ha empujado a una profundización en el estudio de esta especie es la del papel fundamental que juega dentro de la piscicultura marina de los países del Mediterráneo.

La lubina se ha considerado siempre como un pescado de elevada calidad y ha sido normalmente consumida por los pueblos ribereños del Mediterráneo. Ello hace que el cultivo de este pez en las costas mediterráneas goce de una arraigada tradición. Las lubinas salvajes capturadas llegan a alcanzar un tamaño de 12 Kg, pero la industria piscícola concentra sus esfuerzos en la producción de peces de unos 500 g, que es el tamaño adecuado para el consumo individual.

La puesta a punto de las técnicas de reproducción controlada, en la década de los 80, ha permitido que la producción de lubina haya experimentado un considerable incremento en los últimos años (Carrillo *et al.*, 1993; Calderer y Cardona, 1993). De acuerdo con los datos recogidos por Helga Josupeit (1995), a nivel mundial, la producción de lubina ha pasado de 320 Tm en 1984 a 14075 en 1995. Se espera que en 1998 aproximadamente 21000 Tm de este pescado procedan de las piscifactorías.

La lubina se produce principalmente en los países ribereños del Mediterráneo concentrándose su producción en los países pertenecientes a la Unión Europea. No obstante, en los últimos años se ha observado un fuerte incremento en la producción de

lubina en países como Turquía, Egipto y Túnez. Grecia es el mayor productor de lubina cultivada con una producción de 9000 Tm en 1995. Italia es el segundo país productor de lubina, con 2200 Tm en 1995. En el caso de España la producción ha pasado de unas 11 Tm en 1985 a 460 Tm en la actualidad.

La explotación acuícola de la lubina presenta, aún en la actualidad, serios problemas de muy diversa índole. Por una parte, aquellos que son comunes a los cultivos de cualquier especie de pez y que se derivan, principalmente, de la dificultad que entraña el manejo adecuado de los reproductores para obtener puestas de buena calidad y para extender esas puestas a cualquier período del año. Por otro lado, en cautividad, la lubina presenta algunos problemas particulares como, por ejemplo, una elevada proporción de machos frente a la de hembras (Blázquez *et al.*, 1996), lo que origina serias dificultades a la hora de elegir un número adecuado de hembras que den una cantidad suficiente de larvas que permitan mantener los grupos en cultivo. Por otra parte, las hembras ponen varias veces a lo largo de un mismo período reproductor y, como resultado, dentro de un grupo de reproductores se pueden recoger varias puestas. A este hecho hay que añadir que una misma muestra de reproductores, sometidos a condiciones ambientales y de alimentación idénticas, puede originar puestas con enormes variaciones en su calidad. Como resultado se hace necesario tratar cada una de estas puestas por separado sin posibilidad de juntar y dispensar cuidados comunes a todos los huevos procedentes del mismo grupo de animales. La calidad de las puestas se ve también enormemente influida por otro problema común a todas las explotaciones piscícolas, el de la endogamia. Debido a la falta de renovación de los animales de una determinada piscifactoría la reproducción se realiza siempre entre animales que, de un modo u otro, se encuentran emparentados y, como resultado, no se produce un intercambio genético en la medida necesaria para

mantener saludable una población. De hecho la erosión genética en poblaciones cultivadas se ha detectado en algunas piscifactorías españolas (Martínez *et al.*, 1990). Debido a todo lo planteado los estudios acerca del proceso reproductor en la lubina y todos los mecanismos que lo modulan son básicos para intentar controlar ese proceso reproductor y obtener el máximo rendimiento posible de los animales que se mantengan en cultivo.

La lubina es un pez teleósteo que pertenece al orden de los Perciformes. Normalmente se ha encuadrado a esta especie dentro de la familia Serranidae. Sin embargo en una clasificación establecida por Tortonese (1986a, b), la lubina se incluye en la familia Moronidae. Junto a la lubina, género *Dicentrarchus*, aparecen las especies pertenecientes al género *Morone*, entre las que se incluye la lubina americana, *Morone saxatilis*.

El género *Dicentrarchus* comprende dos especies: *Dicentrarchus labrax* (Linné, 1758) y *Dicentrarchus punctatus* (Bloch, 1792). El signo distintivo más notable entre ambas especies es la presencia, sobre el dorso y los flancos de *D. punctatus*, de una puntuación oscura permanente de la que carecen los adultos de *D. labrax*.

D. labrax se extiende por el Atlántico Norte, desde el mar de Irlanda y el Báltico hasta las costas de Marruecos. En el Mediterráneo esta especie es común en todas las costas y llega a aparecer, raramente, en el mar Negro (Barnabé, 1980). Es una especie euriterma y eurihalina. Se encuentra frecuentemente en la desembocadura de los ríos que, incluso, llega a remontar varios kilómetros y puede soportar desde 5°C hasta unos 28°C de temperatura.

La lubina es una especie gonocorista. Aunque no hay una diferenciación morfológica ligada al sexo, los machos suelen ser más pequeños que las hembras y, éstas últimas, presentan una cabeza más larga y puntiaguda y una mayor altura corporal (Calderer y Cardona, 1993).

La madurez sexual en la lubina se alcanza a una determinada talla y edad que suelen ser menores en los animales provenientes de las aguas templadas del Mediterráneo que en los del Atlántico. Los machos siempre son más precoces que las hembras. En cualquier caso, parece que la madurez sexual es más dependiente de la talla que de la edad. (Barnabé, 1980; Blázquez, 1996).

La reproducción es estacional y en la costa mediterránea tiene lugar en los meses de invierno, desplazándose hasta finales de la primavera en latitudes más frías. La fecundación es externa. Durante la freza dos o tres machos, de un tamaño inferior al de la hembra, que suele aparecer extremadamente hidratada, se colocan cerca de ella y la acompañan en sus lentos desplazamientos.

En los individuos inmaduros las gónadas se hallan reducidas a dos delgados cordones que se reúnen a nivel del orificio genital. En los machos maduros los testículos son blancos y presentan una sección triangular. Los ovarios, de color naranja tienen una forma cilíndrica y poseen un corto oviducto.

El proceso de desarrollo gonadal ha sido ampliamente estudiado y descrito por varios autores (Zohar, 1984; Barnabé, 1980; Carrillo *et al.*, 1989; Prat *et al.*, 1990a, b). En un primer estado las gónadas se presentan como inmaduras. En las latitudes

mediterráneas esto ocurre entre junio y septiembre. A partir de octubre comienza la vitelogénesis en las hembras (fenómeno ya descrito en la Introducción, sección 1.1) que se extienden hasta diciembre y en enero y febrero se solapan con la época de puesta. La puesta se inicia a finales de diciembre y suele acabar en marzo o abril. La presencia de machos espermiantes se observa desde la fase de vitelogénesis hasta la finalización de las puestas. Después de la puesta quedan oocitos no ovulados en el interior del ovario que sufren el fenómeno de atresia. Para finalizar el proceso reproductor tiene lugar la regresión gonadal, disminuyendo paulatinamente el volumen de la gónada.

En condiciones de cautividad es posible obtener puestas adelantadas, a partir de octubre, o bien retrasadas, hasta abril, mediante la modificación de la temperatura y el fotoperíodo (Zanuy *et al.*, 1986, 1989; Carrillo *et al.*, 1989; Mañanós *et al.*, 1996). También se pueden sincronizar las puestas fácilmente por inyección hormonal en hembras ya maduras. Para provocar la ovulación hace algunos años se utilizaban extractos hipofisarios de peces maduros o gonadotropina coriónica humana (GCH) (Zanuy y Carrillo, 1984). La técnica más eficaz es el uso de los análogos de la hormona liberadora de la hormona luteinizante de mamíferos (LHRH) (Zanuy *et al.*, 1986; Alvaríño *et al.*, 1992). Una técnica novedosa ha sido recientemente ensayada con éxito en nuestro laboratorio: consiste en la implantación intramuscular, bien de unos pequeños tubos de paredes poliméricas que contienen en su interior la preparación de GnRH, bien de microesferas de GnRH (Sorbera *et al.*, 1996). Este método permite que se produzca una liberación lenta y gradual de la hormona en el interior del cuerpo, mostrándose como una técnica eficiente para conseguir una prolongación del período de puesta.

Al contacto con el agua de mar los huevos adquieren su talla y forma esférica definitivas. Los huevos son pelágicos. En cuanto a su coloración, son transparentes, pero la gota de grasa les da un color amarillento. Los huevos de buena calidad, viables, son menos densos que el agua para salinidades superiores a 34,4 ppt (Calderer y Cardona, 1993; Carrillo *et al.*, 1989; Cerdá *et al.*, 1994a, b, 1995) y pueden separarse de los huevos inviables, que quedan sumergidos, por decantación.

Los huevos fecundados eclosionan de 3 a 5 días después de las puestas dependiendo de la temperatura de incubación. Cuando la larva sale al exterior presenta una bolsa con las reservas vitelinas. Esta es la fase denominada prelarvaria, que dura 5 ó 6 días después de la eclosión. Durante esta fase el vitelo se reabsorbe y, finalmente, se abre la boca (Barnabé, 1980). A partir de este momento el animal es apto para alimentarse del medio natural. Éste es un periodo crítico, con una mortalidad muy elevada.

2.- DISEÑO EXPERIMENTAL.

El presente trabajo de investigación se planteó a consecuencia, y como una continuación, de las experiencias sobre la influencia de los factores nutricionales en el fenómeno de la reproducción llevadas a cabo en el Departamento de Fisiología de la Reproducción de Teleósteos del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal. En uno de los experimentos realizados, previamente al inicio de este trabajo, se estudió el efecto de la reducción de la dieta sobre el proceso reproductor en la lubina. Utilizando una alimentación natural, consistente en boga (*Boops boops*) troceada, se observó que la disminución de la ración desde un 1% de la biomasa a un 0.5% no provocaba la aparición

de diferencias significativas en la calidad de las puestas (Cerdá *et al.*, 1994a). Estos resultados plantearon la necesidad de realizar nuevos experimentos en los que la restricción de la dieta fuera más estricta, con el fin de profundizar en el efecto que la falta de una cantidad adecuada de alimento pudiera ejercer sobre el proceso reproductor.

Otras dos experiencias (Cerdá *et al.*, 1994b, 1995) se centraron en el estudio del efecto de las cantidades de proteína presentes en las dietas artificiales sobre los resultados de puesta. Se observó que la elevación del porcentaje de proteínas de los piensos hasta un 50% provocaba una mejora sustancial en los porcentajes de viabilidad de los huevos y de eclosión. Sin embargo la calidad de las puestas obtenidas con las dietas artificiales fue menor que la que se obtenía con una dieta natural en la que el porcentaje de proteínas era mucho menor (Cerdá *et al.*, 1995). Este hecho llevó a sugerir que debían de existir otros factores diferentes del contenido proteico de la dieta que estaban influyendo profundamente en el desarrollo del proceso reproductor.

En el trabajo aquí presentado se pretende observar cual es la influencia del contenido lipídico de las dietas en el proceso reproductor. Se realizó una primera experiencia con el fin de determinar si la cantidad total de lípidos ingerida por los reproductores tenía algún efecto sobre los resultados de puesta. Para ello se varió el contenido total de lípidos que tomaban los animales bien modificando el contenido lipídico de la dieta, bien variando la ración. Los resultados obtenidos en las puestas y los análisis de ácidos grasos de los huevos indicaron que los ácidos grasos de los lípidos de la dieta tenían un efecto muy importante sobre la reproducción. Para profundizar en esta cuestión se realizó un nuevo experimento en el que no sólo se alteró el contenido lipídico de las dietas sino también su composición en ácidos grasos. Los resultados obtenidos

corroboraron las hipótesis planteadas en la experiencia anterior y permitieron delimitar de manera más clara la influencia de ciertos ácidos grasos sobre el proceso reproductor y sobre su regulación endocrina. Se puso en evidencia el importante papel estructural de algunos ácidos grasos que, en vez de ser utilizados en procesos catabólicos, pasan formar parte de los tejidos de los peces y, después, a los huevos. Estos hechos condujeron a la idea de que puede existir una variación a lo largo del ciclo reproductor en las necesidades de ácidos grasos de los peces. Se planteó, por ello, una tercera experiencia que permitiera establecer la necesidad de una adecuación estacional en la administración de los ácidos grasos a través de la dieta.

Los capítulos posteriores tratarán detalladamente todos los pormenores referentes al diseño y a las particularidades de cada experimento, sin embargo es conveniente dar aquí unas notas generales que expliquen en que consistió cada uno de ellos.

Experiencia 1.

En una primera experiencia se pretendió obtener una idea general de cual era el efecto de la cantidad y calidad de los lípidos administrados a través de la dieta sobre el proceso reproductor. Las modificaciones de la cantidad de lípidos en los diferentes tipos de alimento utilizado, así como de la ración a la que se administró ese alimento, permitieron observar el efecto de la ingesta de distintas cantidades de lípidos sobre la composición lipídica y la calidad de los huevos obtenidos. Por otra parte, el uso de una dieta natural, con un perfil de ácidos grasos muy diferente del de las dietas artificiales, indicó el profundo efecto que el contenido en ácidos grasos de la fracción lipídica de la dieta ejerce sobre el desarrollo del proceso reproductor y sobre la composición y viabilidad

de los huevos. Se establecieron cinco grupos experimentales y cada uno recibió un tipo de alimentación concreto: dos piensos comerciales, cada uno con una concentración diferente de lípidos (9% y 15%), bien a ración restringida o bien a ración completa, o una dieta natural a ración completa.

Esquemáticamente los grupos utilizados fueron los siguientes:

- Grupo A.** Recibió una dieta comercial con un 9% de lípidos y a una ración que era 1/4 de la ración normal.
- Grupo B.** Recibió la misma dieta comercial que el grupo anterior pero a ración completa.
- Grupo C.** La dieta administrada a este grupo poseía un 15% de lípidos y se le suministró a una ración de 1/4 de la ración normal.
- Grupo D.** Recibió el pienso con un 15% de lípidos y a ración completa.
- Grupo Control.** Se le administró un alimento natural, consistente en boga, *Boops boops*, triturada y a una ración normal.

Experiencia 2.

En la experiencia anterior se observó que las diferencias existentes en la composición en ácidos grasos entre la dieta natural y las dietas artificiales se reflejaban en la composición en ácidos grasos de los lípidos de los huevos. Estas diferencias tenían, además, una estrecha relación con la calidad de los huevos. Por otra parte, las dietas artificiales, a pesar de las variaciones en la cantidad de lípidos debidas al contenido lipídico del pienso o a las alteraciones de la ración, no provocaron diferencias significativas en el contenido en ácidos grasos de los huevos ni en los resultados de puesta. Los resultados

obtenidos parecían indicar que ciertos ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), que resultan esenciales para los peces, así como unas proporciones adecuadas entre ellos, tenían una importancia básica para el normal desarrollo del proceso reproductor así como para la determinación de la calidad de los huevos. Con el fin de corroborar esta idea se llevó a cabo una segunda experiencia en la que se intentó observar si dietas ricas en lípidos y, por lo tanto, con elevadas cantidades de ácidos grasos esenciales (EFA), o dietas ricas en ciertos ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3, tienen un efecto positivo sobre el desarrollo del proceso reproductor.

El grupo control utilizado fue el mismo que en la experiencia anterior. Los animales de los otros cuatro grupos de la experiencia 1 se redistribuyeron en tres grupos que fueron alimentados con dietas artificiales. Uno de ellos recibió el pienso con un 9% de lípidos, que en la experiencia anterior dio malos resultados de puesta, y fue considerado como control negativo. La calidad de esta dieta base se intentó mejorar de dos modos diferentes: incrementando específicamente la proporción de PUFA, especialmente de la serie n-3, a la vez que se aumentaba la proporción de lípidos de la dieta, o bien elevando de una manera importante e inespecífica la cantidad total de lípidos. Sin embargo no existen piensos comerciales con un elevado contenido en PUFA o con un elevado porcentaje de lípidos. Debido a ello los piensos fueron preparados especialmente para este experimento.

El pienso rico en PUFA se consiguió sumergiendo los granos del 9% de lípidos en un aceite de pescado rico en esos PUFA. De este modo el contenido lipídico del pienso se elevaba hasta un 22% consiguiendo, paralelamente, incrementar su contenido de PUFA. Por inmersión en un aceite el porcentaje máximo de lípidos que alcanzaban los

gránulos de pienso era del 22%. Como consecuencia para elevar la cantidad de lípidos totales del pienso por encima de este porcentaje es necesario incluir los lípidos a las materias primas que se utilizan durante la fabricación del pienso. Para conseguir un pienso con un elevado porcentaje de lípidos se añadió un aceite de pescado a las materias utilizadas para fabricar la dieta base, de modo que se produjo un pienso con un 30% de lípidos.

Se establecieron cuatro grupos experimentales:

Grupo A. Fue alimentado con una dieta que poseía un 9% de lípidos.

Grupo B. Recibió el pienso utilizado para alimentar al grupo anterior pero cuyo contenido en lípidos se había elevado hasta un 22% tras sumergirlo en un aceite comercial rica en PUFA, especialmente de la serie n-3.

Grupo C. Se le administró un pienso formulado en el que la cantidad de lípidos se había elevado hasta un 30%.

Grupo Control. Fue alimentado con boga triturada.

Experiencia 3.

La experiencia anterior confirmó la idea de que el perfil de ácidos grasos de la dieta, así como las proporciones relativas existentes entre ellos, ejercen un efecto claro sobre la calidad de los huevos al afectar su composición, con independencia de la cantidad total de lípidos que se administraran en la dieta. Algunos de estos ácidos grasos cumplen con funciones estructurales muy importantes de modo que, probablemente, son utilizados con preferencia en la formación de las reservas vitelinas del huevo, en vez de ser metabolizados. Puesto que en el ciclo reproductor se producen variaciones muy

importantes de las funciones metabólicas para permitir el desarrollo de los oocitos es muy probable que los requerimientos de estos ácidos grasos, tan importantes desde el punto de vista estructural, varíen entre la época de vitelogénesis, la de puesta y la de postpuesta-previtelogénesis. Todo esto llevó a plantear la hipótesis de la existencia de una variación estacional de las necesidades de ácidos grasos para que el proceso reproductor se desarrolle normalmente.

Para corroborar esa hipótesis se realizó una tercera experiencia. Se establecieron cuatro grupos experimentales, cada uno de los cuales recibió una dieta rica en EFA durante un determinado período y el resto del año se le administró una dieta pobre en esos ácidos grasos esenciales.

Para conseguir los dos tipos de dieta mencionados se partió de un pienso con un 9% de lípidos. Este pienso fue sumergido en aceite de pescado, rico en EFA o bien en aceite de maíz, pobre en EFA, hasta alcanzar un contenido en lípidos de un 22%, obteniéndose así bien una dieta rica o pobre en EFA, respectivamente.

Los grupos establecidos fueron:

Grupo Sep-Feb. Recibió la dieta rica en EFA entre el 15 de septiembre y el 15 de febrero. Esta es la época de vitelogénesis.

Grupo Feb-Abr. Recibió la dieta rica en EFA entre el 15 de febrero y el 15 de abril, durante el período de puesta, cuando este ya se había iniciado.

Grupo Abr-Sep. Recibió la dieta rica en EFA entre el 15 de abril y el 15 de septiembre. Este período se corresponde con la fase de previtelogénesis.

Grupo Ene-Dic. Recibió la dieta rica en EFA a lo largo de todo el año.

3.- MANTENIMIENTO DE LOS REPRODUCTORES Y RECOGIDA DE MUESTRAS.

En este apartado se explican las condiciones en que se mantuvieron los animales a lo largo de todo el trabajo de investigación. El diseño y ciertas particularidades de cada experimento, se detallarán en los capítulos correspondientes.

3.1.- Tanques para el mantenimiento de los reproductores.

Los experimentos se llevaron a cabo en tanques situados en las instalaciones del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal. Estos tanques tenían forma rectangular y una capacidad de 8000 l. El agua marina era captada del mar por medio de una boca situada a 500 m de la playa y a una profundidad de 8 m y trasladada hasta el Instituto por medio de un sistema de bombeo. La salinidad del agua en los tanques fue de aproximadamente 38 g/l y el pH de 8.3. Las variaciones más relevantes a que estuvieron sometidos los reproductores fueron las correspondientes a las temperaturas del agua que oscilaron entre los 11°C en invierno y los 26°C en verano.

El circuito de agua en los tanques era abierto, con entrada por la parte inferior y un sistema de desagüe consistente en cuatro bocas superficiales que recogían el agua y la dirigían hacia la salida, situada en la parte inferior del tanque. En la época de puesta el agua de salida era desviada por medio de un tubo que la llevaba hasta los contenedores en los que se recogían los huevos. El aire se repartió por el tanque por medio de un tubo de PVC agujereado que recorría por el fondo todo el perímetro del tanque. Ello permitió que el nivel de oxígeno fuera el adecuado (aproximadamente 5 ppm) y que el agua se

mantuviera en movimiento para evitar la sedimentación de los huevos en la época de puestas y acelerar su salida.

Los tanques se limpiaron una vez cada quince días cepillando las paredes y el fondo y pasando a continuación agua dulce. Una vez limpio el tanque se añadió al agua Furazolidona (N-5-Nitro-2-furfurilidene-3-amino-2oxazolidona, Maymo, España), sustancia utilizada como desinfectante.

3.2.- Muestreos.

Las experiencias llevadas a cabo tuvieron una duración de dos o tres años. La realización de muestreos mensuales a lo largo de un período de tiempo tan prolongado podría llevar a un estrés crónico que afectaría a la fisiología general del reproductor y a los resultados de puesta. Debido a ello los muestreos solo se llevaron a cabo durante el primer año experimental.

Los animales se anestesiaron por medio de MS-222 (Ácido 3-aminobenzoico-etil-ester, SIGMA). Tras ser pesados y medidos (precisión de 0.1 g y de 0.5 cm) se tomaron, cómo se explica más detalladamente en el siguiente apartado, muestras de sangre de todos los animales. La presencia de esperma en los machos se comprobó por masaje abdominal.

Los animales fueron seguidos individualmente a lo largo de los muestreos. Para ello se utilizaron dos tipos diferentes de marcaje. En un principio cada lubina se identificó por medio de marcas de plástico externas, con diferentes números y colores, que se insertaron bajo la piel del animal por medio de una pistola. Estas marcas permiten una

identificación visual rápida de los animales. Este método de marcaje adolece, sin embargo, de un serio problema: las marcas se hallan en contacto continuo con el medio externo por lo que, al cabo del tiempo, muchas de ellas se pierden, bien porque al cicatrizar la herida son expulsadas hacia el exterior o bien por el propio rozamiento con el agua o con las paredes del tanque. Como resultado en muestreos sucesivos resulta difícil reconocer a estos animales que han perdido las marcas. Además, al ser marcas externas se produce una herida que queda en contacto continuo con el medio externo y que, por lo tanto, supone un peligro continuo de infección. Debido a todo ello, a partir del segundo año de experimentación, se optó por ir sustituyendo paulatinamente las marcas externas por unas marcas internas electrónicas: PIT Tags, "Passive Integrated Transponder Tagging System". Estas marcas se introducen en la masa muscular del lomo de los peces usando unas jeringas con una aguja de un diámetro de aproximadamente 2 mm. Los PIT Tags se introducen en esta aguja la cual se clava en el lomo del animal y la marca es empujada entonces, hacia afuera, por medio del émbolo de la jeringa, de modo que la marca queda alojada intramuscularmente. Los PIT-Tags, al ser internos, no llegan a perderse por lo que el seguimiento de los animales a lo largo del período de experimentación no acarrea ningún tipo de problema. Además la herida externa cicatriza y no queda ninguna apertura permanente hacia el exterior, por lo que el peligro de infecciones se reduce, únicamente, al momento en que se coloca esta marca.

Muestras de plasma.

A cada lubina se le extrajo un mililitro de sangre por punción caudal utilizando jeringas heparinizadas. La sangre se llevó inmediatamente a tubos Eppendorf de 1.5 ml heparinizados y mantenidos sobre hielo. Además, para evitar la degradación enzimática de las proteínas, se añadieron a estos eppendorf 10 μ l de PMSF ("Phenylmethylsulfonyl

Fluoride", SIGMA), 100 mM, disuelto en isopropanol, para que quedará a una concentración final de 1 mM.

La sangre se centrifugó durante 20 minutos a 1500 g y a 4°C. El plasma se recogió usando pipetas automáticas, se repartió en dos alícuotas diferentes destinadas a realizar análisis de Vg y esteroides y se guardó a -20°C.

4.- RECOGIDA DE LAS PUESTAS.

Durante el período reproductor (de finales de diciembre a principios de abril, aproximadamente) las puestas se recogieron diariamente. Para ello se dispuso de un cedazo con forma cónica fabricado con una malla para plancton, de aproximadamente 160 µm. El agua de salida del tanque se llevó hasta el cedazo, en el que se recogían todos los huevos, por un desvío del desagüe. Hemos observado que las puestas se producen frecuentemente de madrugada, por lo que a primera hora de cada mañana se revisaron los cedazos y se recogieron todos los huevos llevándolos a una probeta de dos litros que se llenó de agua. Se esperó a que las dos fracciones de huevos, es decir la de los viables o flotantes y la de los inviables o sumergidos, se decantaran, y se midió el volumen de cada una de ellas. Al final de la época de puesta se determinó cual había sido la duración del período de puesta, en días, así como el punto medio del período de puesta. Para determinar el punto medio del período de puesta se calculó la media de los días transcurridos entre la primera puesta y todas las demás puestas. El número de días obtenidos, contados a partir del inicio de las puestas, se corresponde con la fecha en la que se sitúa el punto medio del período de puesta.

4.1.- Cálculo de la fecundidad.

Puesto que de una puesta a otra puede haber una cierta variación en el diámetro medio de los huevos y, por lo tanto, en el número de huevos presentes en un determinado volumen, para calcular el número total de huevos en una puesta se estableció una fórmula que relacionaba el número de huevos con el diámetro. Esta fórmula se corresponde con la de la recta de regresión obtenida al relacionar, en 25 puestas diferentes, el diámetro medio de 100 huevos con el número medio de huevos por mililitro después de contarlos en 3 mililitros.

La recta de regresión obtenida fue:

$$N = 2865.9 - 1796 D (r^2=0.94)$$

Siendo N el número total de huevos obtenidos por mililitro y D, el diámetro medio de 100 huevos.

En cada puesta se midieron 100 huevos viables y 100 inviables, se calculó el diámetro medio y, utilizando la fórmula anterior, se calculó el número total de huevos allí presentes.

Para calcular la fecundidad total, o número total de huevos puestos por cada hembra, al final de la época de puesta se sumaron todos los huevos que se obtuvieron en las diferentes puestas en cada tanque y el total se dividió por el número de hembras presentes en ese tanque. La fecundidad relativa, o número total de huevos por cada Kg de hembra, se calculó dividiendo el total de huevos por la biomasa total de hembras observada aproximadamente 15 días después de la última puesta.

4.2.- Cálculo de la tasa de eclosión.

En la fracción de huevos viables, inmediatamente después de que los huevos se decantaran y de anotar el volumen total, se tomaron 3 mililitros de huevos con una pipeta pasteur de plástico (que posee una entrada ancha y evita que los huevos sufran rozamientos o cambios bruscos de presión que los pudieran dañar al penetrar en la pipeta) y se depositaron por triplicado a razón de un mililitro por cada cubilete de incubación. Estos cubiletes están fabricados en PVC y tienen forma cilíndrica, un diámetro de unos 15 cm y una altura de aproximadamente 40 cm. La parte superior del cubilete está abierta y la inferior cerrada por una malla para plancton con un poro de 160 μm (similar a la utilizada en los cedazos para la recogida de puestas). En la parte superior llevan acoplada una pieza que permite su sujeción a los bordes del tanque. Cada cubilete tenía un aporte individual de agua y, además, se sumergieron hasta el borde superior, en tanques de 200 litros en los que el agua era mantenida a 16°C por medio de resistencias acopladas a termostatos. Este agua era previamente filtrada y esterilizada por medio de luz ultravioleta.

Bajo las condiciones de temperatura descritas los huevos, eclosionaron 72 horas después de la puesta. En este momento se sacó el cubilete del agua se contó el número de larvas presentes en la malla del fondo así como el número de huevos que no habían llegado a eclosionar.

La media del porcentaje de huevos que eclosionaron en los tres cubiletes correspondientes a una misma puesta se consideró como el porcentaje de eclosión con respecto al número de huevos viables. Si ese porcentaje se aplica al total de huevos, viables y no viables, calculados para esa puesta se obtiene el porcentaje de eclosión del

total de huevos. Al final de la época de puesta se calculó, para cada grupo, la media de los porcentajes obtenidos.

Tal y como se indicó en la Introducción (sección 2.2) las variables utilizadas en el presente trabajo como indicativos de la calidad de las puestas han sido los porcentajes de viabilidad y de eclosión de los huevos.

5.- ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS DE ESTADOS DE DESARROLLO OOCITARIO Y CÁLCULO DE LA FECUNDIDAD TOTAL.

En la tercera experiencia se realizó un análisis riguroso de la frecuencia de los diferentes tamaños y estados de desarrollo que presentaban los oocitos. Además, se calculó cual era la fecundidad total de las hembras de los diferentes grupos experimentales cuando los ovarios todavía se encontraban en desarrollo y no habían aparecido oocitos maduros u ovulados. Este dato de fecundidad (al que se va a hacer referencia con el nombre de fecundidad total real) es diferente del normalmente conocido como fecundidad total, que es el número de oocitos que completan el desarrollo y son liberados al exterior por cada una de las hembras.

Para obtener las muestras de ovario necesarias se sacrificaron cinco o seis hembras de cada uno de los grupos experimentales. Los sacrificios tuvieron lugar a mediados del mes de diciembre, aproximadamente diez días antes del inicio de las puestas. Las hembras fueron anestesiadas manteniéndolas en hielo y tras ser medidas y pesadas se

decapitaron. Los dos ovarios de cada hembra se extrajeron y pesaron. Se tomó una sección de entre uno y tres gramos de las partes anterior, media y posterior de uno de los ovarios. Cada una de estas secciones se pesó y se introdujo en viales de 20 ml a los que se añadieron unos 10 ml de reactivo de Gilson. La composición de este reactivo se señala más abajo. El reactivo de Gilson descompone el tejido de sostén existente entre los oocitos y estos quedan sueltos en el medio, permitiendo la realización de mediciones individuales.

El líquido de Gilson se preparó mezclando 60 ml de etanol puro, 920 ml de agua, 15 ml de ácido nítrico (NO_3H) al 80% y 18 ml de ácido acético (CH_3COOH). Una vez listos todos los líquidos se añadieron 20 g de cloruro mercuríco (Cl_2Hg) y se mantuvo en agitación aproximadamente una hora para permitir la disolución del Cl_2Hg . El Cl_2Hg es sensible a la luz, por lo que, durante su disolución el recipiente se cubrió con papel de aluminio y, una vez preparado, el reactivo se guardó en botella oscura.

El tejido ovárico se mantuvo en reactivo de Gilson durante unos seis meses en agitación continua. Al cabo de este tiempo, cuando los oocitos ya habían quedado totalmente sueltos cada una de las muestras se llevó hasta un volumen final de 200 ml. Manteniendo este volumen en constante agitación se captó una muestra de 2 ml. Todos los oocitos presentes en ella se contaron y se midieron por análisis de imagen. Este análisis de imagen se llevó a cabo en la Facultad de Biología de la Universidad de Brest, utilizando un programa de ordenador desarrollado allí mismo.

Para calcular la fecundidad total real de cada una de las hembras se tuvo en cuenta que la cantidad total de oocitos presentes en estos 2 ml era proporcional a la cantidad de oocitos de los 200 ml iniciales. Se calculó el número de oocitos presentes en

los 200 ml iniciales por una regla de tres sencilla. Este número de oocitos, presentes en una muestra de peso conocido es proporcional al número total de oocitos presentes en el ovario. Puesto que se conocía el peso total de cada uno de los ovarios, se pudo calcular el número total de oocitos presentes en los ovarios para determinar cual era la fecundidad total real de las hembras sacrificadas.

Por otra parte, las medidas de todos los oocitos presentes en esos 2 ml se agruparon según el estado de desarrollo en el que se encontraban los oocitos. Para establecer estos estados de desarrollo oocitario se tomaron muestras de oocitos de diferentes tamaños, por intervalos de 100 μm . Los oocitos de cada uno de estos intervalos se incluyeron en plástico, se realizaron cortes histológicos y fueron observados al microscopio óptico. Basándose en los trabajos de Mayer *et al.* (1990) y de Alvariño *et al.* (1992) se tomaron en consideración los estados de previtelogénesis, de vitelogénesis, de vitelogénesis avanzada y de postvitelogénesis (Figura III.1). Puesto que los sacrificios fueron llevados a cabo en diciembre, todavía una época muy temprana del período reproductivo, no aparecieron oocitos maduros u ovulados. Las características diferenciales de los oocitos en cada uno de los estados de desarrollo fueron los indicados a vuelta de página.

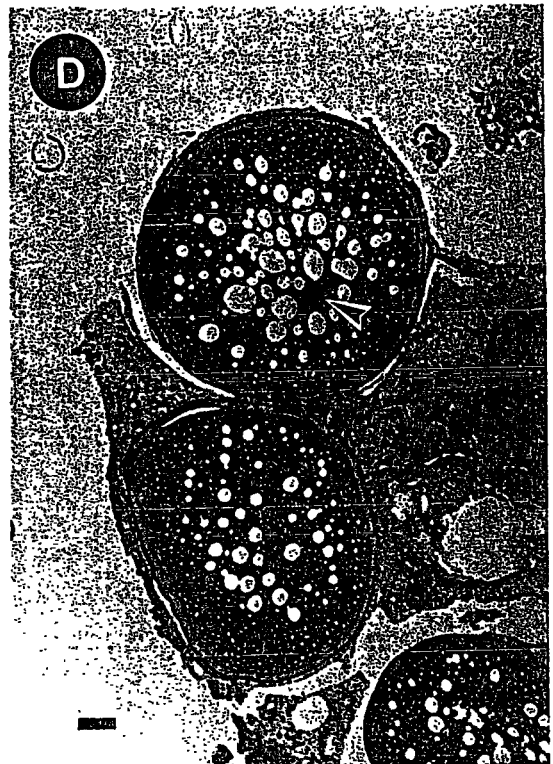
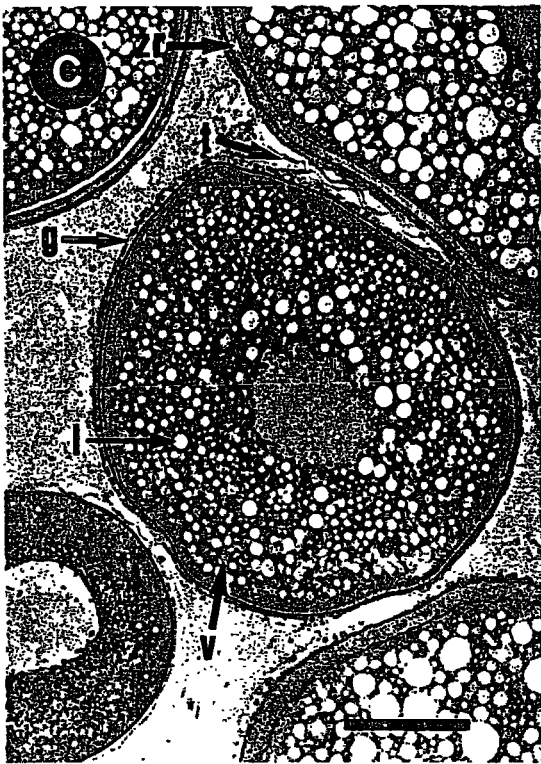
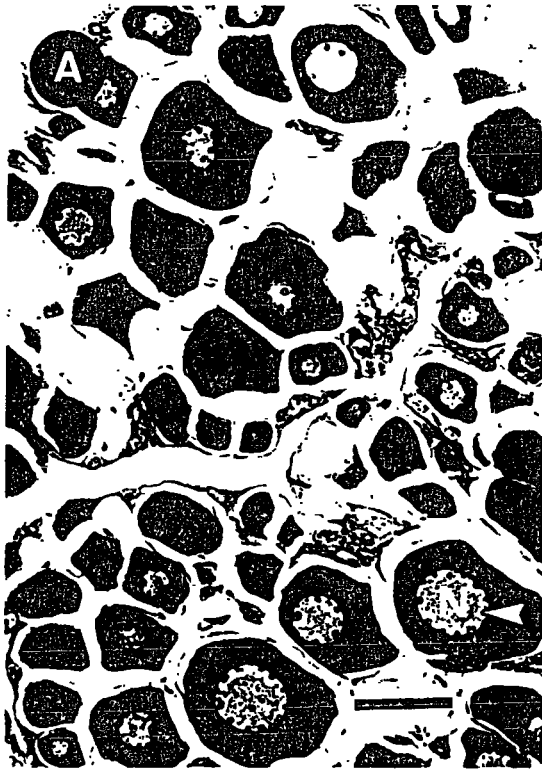
Oocitos previtelogénicos. Se caracterizan por poseer un núcleo central bastante grande en el que aparecen pequeños nucleolos. El diámetro de este núcleo puede suponer, en las fases tempranas de desarrollo el 80% del diámetro total del oocito, reduciéndose aproximadamente a 50% al final de este estado. En el citoplasma de los oocitos más pequeños no se observa ningún tipo de inclusión, si bien, en las fases más avanzadas puede aparecer pequeñas vesículas, en la zona periférica, que corresponden a lípidos insaturados. Dentro de esta clase se incluyen los oocitos de tamaño menor a 200 μm .

Inicio de vitelogénesis. En esta clase de oocitos se observan claramente los alveolos corticales. Las gotas lipídicas se hacen más numerosas y se agrupan en la zona media interna del citoplasma. En la parte externa comienzan a observarse pequeños gránulos de vitelo. También en esta fase se hace visible la zona radiata, como una fina membrana acelular que recubre la periferia del oocito. Los oocitos en este estado de desarrollo midieron entre 200 y 400 μm .

Vitelogénesis avanzada. Los gránulos de vitelo se multiplican y aumentan de tamaño, ocupando una amplia zona en el exterior del citoplasma. Por su parte las gotas lipídicas comienzan a fusionarse aumentando de tamaño y desplazándose hacia la zona interna del oocito. La zona radiata es perfectamente clara y visible en este tipo de oocitos, cuyo tamaño osciló entre los 400 y 600 μm .

Postvitelogénesis. Las gotas lipídicas continúan fusionándose y aumentando de tamaño en la zona interna del citoplasma. Los gránulos de vitelo aparecen ocupando toda la zona media-externa del citoplasma. La zona radiata es muy evidente y las células de la granulosa adquieren una clara forma cuboidal. El núcleo sigue siendo evidente y se le suele denominar, a partir de esta fase, como vesícula germinal. Se observó que los oocitos con más de 600 μm se podían encuadrar en esta fase de desarrollo.

Figura II.1. En la página opuesta se muestran los diferentes estados de desarrollo oocitario tomados en consideración en el presente trabajo. A.- Oocitos previtelogénicos. N: núcleo. La punta de flecha señala un nucleolo. $\times 250$; barra de escala = 50 μm . B.- Inicio de vitelogénesis. La punta de flecha señala un alveolo cortical. $\times 250$; barra de escala = 50 μm . C.- Vitelogénesis avanzada. g: granulosa; l: lípidos; t: teca; v: gránulo de vitelo; zr: zona radiata. $\times 160$; barra de escala = 100 μm . D.- Postvitelogénesis. La punta de flecha señala la vesícula germinal. $\times 64$; barra de escala = 100 μm .



6.- ANÁLISIS DE LÍPIDOS Y ÁCIDOS GRASOS

En los alimentos que se administraron a los reproductores y en los huevos recogidos en cada una de las puestas se analizaron las clases y cantidades presentes de lípidos así como de ácidos grasos. Se tomaron muestras de todos los piensos utilizados y de la boga con la que se alimentó al grupo y se mantuvieron congeladas, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta el momento de realizar los análisis. En todas las puestas se tomaron muestras, por duplicado, de 100 huevos que se introdujeron en una mezcla de cloroformo:metanol (2:1, volumen: volumen) con un 0.01 % de hidroxitolueno butilado (Butylated Hydroxytoluene, BHT, SIGMA). Estas muestras se guardaron en viales de vidrio de 2 ml (Chromacol LTD, USA), que poseían un tapón especialmente recubierto de teflón, para evitar que fuera afectado por los solventes orgánicos. Una vez preparadas, estas muestras se almacenaron a -70°C hasta que fueron analizadas.

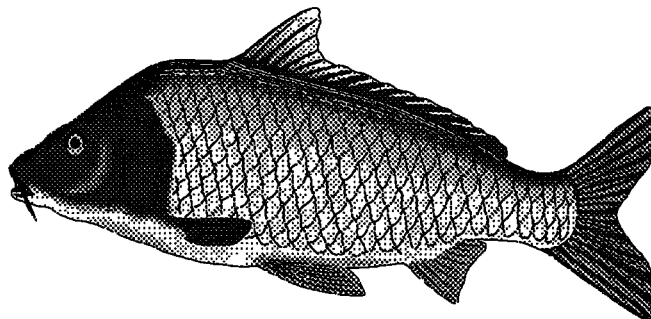
Los análisis de lípidos y de ácidos grasos se llevaron a cabo en la unidad del NERC de la Universidad de Stirling por el equipo de estudio de lípidos con el que se ha colaborado en los proyectos europeos FAR AQ 2 406 E UK y AIR 2 CT93 1005, en cuyo marco de actuación se ha realizado este trabajo.

Para comenzar con los análisis de lípidos las muestras se homogeneizaron en cloroformo:metanol (2:1, volumen:volumen). Los lípidos totales se extrajeron utilizando el método de Folch *et al.*, (1957) y su cantidad total se determinó por gravimetría utilizando una balanza de análisis Ohaus JA200B. Las clases de lípidos presentes se analizaron utilizando un método de doble revelado tras realizar una cromatografía de alta resolución en placa fina, tal y como describieron Olsen y Henderson (1989). Para ello se

utilizaron placas de gel de sílice de 10x10 cm (E. Merck, Darmstadt, Germany). Los lípidos polares (PL) se revelaron utilizando como sistema de solventes acetato de metilo: propano-2-ol: cloroformo: metanol: 0.25% ClK acuoso (25:25:25:10:9). Para revelar los lípidos neutros se utilizó hexano: dietil éter: ácido acético (90:10:1).

Tras realizar la cromatografía, las placas se pulverizaron con reactivo de acetato de cobre-ácido fosfórico (Fewster *et al.*, 1969) y fueron carbonizadas manteniéndolas en una estufa a 160°C durante 20 minutos. Las bandas obtenidas se analizaron utilizando un densitómetro que permitía realizar análisis cuantitativos (Shimadzu CS 9000).

Parte de los lípidos extraídos, aproximadamente 250 µg fueron esterificados con ácido sulfúrico, que había sido disuelto al 1% en una mezcla de metanol y tolueno (2:1 volumen:volumen). Para ello se mantuvieron en contacto con esta solución durante 16 horas a 50°C (Christie, 1982). De este modo se obtuvieron metil ésteres de ácidos grasos que fueron utilizados para el análisis de los ácidos grasos de los lípidos. Estos ácidos grasos se purificaron utilizando una cromatografía en placa fina (thin layer chromatography, TLC) y, después, se analizaron por medio de cromatografía de gases, usando un cromatógrafo Packard 436, tal y como fue detallado por Tocher *et al.* (1985).



Carpa

7.- ANÁLISIS HORMONALES Y DE VITELOGENINA.

7.1.- Análisis de GtHII.

Para determinar los niveles de GtHII en el plasma de las lubinas se utilizó un ELISA heterólogo desarrollado recientemente por Mañanós *et al.*, 1997b. Las muestras fueron analizadas por Mañanós en el centro de Biotecnología de Baltimore, USA. Este ELISA se basa en la competición, por los lugares de unión al anticuerpo, entre el antígeno unido a las paredes de los pocillos de las microplacas y el antígeno libre presente en las muestras o en los puntos de la curva patrón. El complejo antígeno-anticuerpo formado se detecta por el método de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP). El ensayo se realiza en microplacas de análisis de 96 pocillos (COSTAR, Massachusetts, USA). Se usó la subunidad β de la GtHII para formar el recubrimiento de antígeno que cubre las placas (coating) y la molécula de GtHII intacta para preparar la curva estándar. En la figura II.2, se muestra un esquema para facilitar la comprensión de la secuencia de reacciones que tuvo lugar en este ensayo.

La determinación de la cantidad de hormona presente en las muestras se realizó por interpolación de la absorbancia obtenida en los pocillos en los que se depositó esa muestra con las obtenidas en los diferentes puntos de concentraciones conocidas de una curva patrón. La unión máxima de anticuerpo y antígeno se determinó en los pocillos de máxima unión, B_0 , en los que únicamente se depositó anticuerpo y antígeno a una concentración conocida, sin que se estableciera ningún tipo de competencia. La posible unión inespecífica se estableció por medio de los pocillos NSB ("Non Specific Binding"). En estos pocillos se puso únicamente anticuerpo y el antígeno fue sustituido por otra

proteína, como la BSA. La coloración obtenida en estos pocillos NSB fue la debida a la unión inespecífica del anticuerpo a sustancias diferentes del antígeno. El color de fondo debido únicamente al sustrato que provoca la coloración, sin que haya ningún tipo de reacción, se determinó en un pocillo en el que únicamente se depositó ese sustrato, sin ningún otro reactivo, ni antígeno, ni anticuerpo. Este es el pocillo denominado blanco.

Protocolo del ELISA.

El protocolo seguido para la realización de este ensayo se describe a continuación:

1.- **“Coating”**. Este término inglés (que puede traducirse como césped) hace referencia a la película de antígeno o de anticuerpo que cubre las paredes de los pocillos. (A falta de una palabra comúnmente usada en castellano se va a utilizar la denominación inglesa de “coating”). En este ELISA se preparó un coating del antígeno, usando la subunidad β de la GtHII de lubina americana. Para ello se mantuvieron 100 μ l por pocillo de una dilución de este antígeno en tampón de coating (30 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 70 mM Na_2HPO_4 , pH 9.6), a una concentración de 5 ng/ml a lo largo de toda una noche a 4°C. En tres de los pocillos de cada placa se puso una dilución de albúmina de suero bovina (BSA, Sigma) a la misma concentración que el antígeno, con el fin de determinar la unión inespecífica (NSB). Uno de los pocillos quedó libre y se utilizó como un indicador del color que da la solución de sustrato, es decir, como blanco.

Lavado: a continuación se vació el contenido de los pocillos de la placa, simplemente girándola y sacudiéndola. Los pocillos se llenaron con tampón PBST

("phosphate buffer saline tween", que consiste en tampón fosfato 10 mM , pH 7.2, conteniendo 0.9% NaCl y Tween 20 al 0.05%) utilizando una botella flexible de lavado. Este tampón de lavado se mantuvo en la placa durante un minuto, al cabo del cual la placa se volvió a vaciar y la operación se repitió otras dos veces.

2.- Saturación. El antígeno (es decir la subunidad β de la GtHII) que recubre las paredes de la placa puede dejar espacios libres a los que se podría unir la GtHII de las muestras o el anticuerpo. Ello provocaría una elevación de la unión inespecífica del ensayo. Para evitar esto lo que se hace es saturar las paredes de los pocillos con BSA, de modo que esos espacios queden cubiertos, evitando la unión a ellos de antígeno o anticuerpo y disminuyendo la unión inespecífica. Lo que se hace es mantener 200 μ l por pocillo de tampón PBST con un 2% de BSA, durante 30 minutos a 37°C. Después de la saturación se realiza un nuevo lavado tal y como se ha descrito anteriormente.

3.- Incubación con el anticuerpo específico. Para aumentar la sensibilidad del ELISA la incubación se llevó a cabo siguiendo dos fases. Un primer paso consistió en la preincubación de las muestras y de los puntos de la curva estándar con los anticuerpos. La curva estándar se realizó partiendo de una concentración inicial de 10000 pg/ml y llegó a una concentración mínima de 156 pg/ml. Las diluciones de los diferentes puntos de la curva estándar se realizaron con tampón PBST que contenía un 2% de suero de cabra ("Normal Goat Serum", NGS, Sigma. El tampón se denominó PBST-NGS).

La solución del anticuerpo anti β -GtHII se preparó en PBST-NGS. La dilución final del Ac era de 1/80000. Puesto que este anticuerpo se mezcla a volumen igual con los

puntos de la curva estándar o con las muestras es necesario preparar una dilución inicial de la mitad de la dilución final, es decir a 1/40000. Cada uno de los puntos de la curva standard y cada muestra se preincubaron con la solución de anticuerpo. Para ello se mezclaron 150 μ l de la solución de anticuerpo con otros 150 μ l de cada muestra o de cada punto de la curva estándar y se mantuvieron durante toda la noche a 4°C. En otro tubo se reservó el volumen adecuado de Ac, llevado a una dilución final de 1/80000 con PBST-NGS, para rellenar los pocillos correspondientes NSB y otros cuatro pocillos de la placa en los que se había realizado el "coating" normalmente con la subunidad β de la GtHII. En estos cuatro pocillos no se establece competencia por la unión al anticuerpo, que dará su unión máxima con el antígeno pegado a las paredes del pocillo. Por lo tanto, estos pocillos son los que darán la unión máxima (Bo).

Después de la preincubación se realizó la incubación, propiamente dicha. En este paso, 100 μ l de cada tubo de la preincubación se llevaron por duplicado, a los pocillos de la microplaca (100 μ l / pocillo). Es en este paso en el que se establece la competencia por el anticuerpo entre el antígeno presente en los tubos de la preincubación y el antígeno del "coating" que cubre las paredes de los pocillos de la microplaca. Los pocillos reservados para determinar el Bo recibieron únicamente la solución de Ac a 1/80000. Esta misma solución se puso también en los pocillos NSB. En estos pocillos el Ac interacciona con otras sustancias diferentes a la GtHII y el color en ellos obtenido sirve para determinar cual es la unión inespecífica del Ac. El pocillo correspondiente al blanco no recibió nada. La placa se incubó durante 90 minutos a 37°C.

Después de pasado el tiempo de incubación se llevó a cabo un nuevo lavado de la placa. En este lavado se eliminaron los complejos antígeno-anticuerpo que se formaron con el antígeno proveniente de las muestras o de los puntos de la curva patrón. En los pocillos quedaron únicamente los complejos formados entre el anticuerpo y el antígeno que formaba el coating.

4.- Incubación con los anticuerpos secundarios. Los complejos antígeno-anticuerpo formados en el paso anterior que quedaron en las paredes del pocillo se detectaron por medio de la adición a cada pocillo de 100 µl de Inmunoglobulina G anti-anticuerpo de conejo conjugada a la peroxidasa de rábano (GAR-HRP, BioRad). La GAR-HRP se disolvió a una dilución de 1/10000 en tampón PBST conteniendo 1% NGS. La incubación se realizó durante 30 minutos a 37°C. Al final se realizó un lavado tal y como se ha descrito previamente.

5.- Revelado del color. La presencia de los complejos enzimáticos se detectó por la adición de 100 µl de una solución sustrato de TMB ("1,1'-trimethylen-bis (bromuro de 4-formilpiridinio) dioxime, Gibco BRL, USA) a cada pocillo. Este paso de revelado duró 30 minutos a temperatura ambiente y en total oscuridad. La reacción, que provocó la aparición de color se paró añadiendo 100 µl por pocillo de H₂SO₄ 1N. Después de 5 minutos de espera, para que la reacción se detuviera completamente y el color se estabilizara, la absorbancia se midió a 450 nm usando un lector automático de microplacas (Vmax Plate Reader, Molecular Devices, California, USA). La absorbancia leída en cada pocillo corresponde a una determinada unión de anticuerpo al antígeno del coating, y se representa por Bi.

La explicación de los cálculos matemáticos usados en la expresión de los resultados del ELISA de GtHII aparece después de los apartados dedicados al ELISA de Vg y al RIA de E2, ya que en los tres métodos el procedimiento utilizado es el mismo.

Características del ensayo.

Los errores intraensayo e interensayo indican, respectivamente, la variación que presenta una misma muestra dentro de un análisis o bien entre varios análisis. Se calculan como: $\text{Error} = \text{desviación estándar} / \text{media} * 100$.

La variación intraensayo fue de 7.7% (n=16). La variación interensayo fue de 8.7% (n=10). La sensibilidad del ensayo definida como el valor de la curva estándar en el que se obtiene un 85% de ligado, valor que se halla en el límite de confianza de la curva estándar, fue de 156 pg/ml.

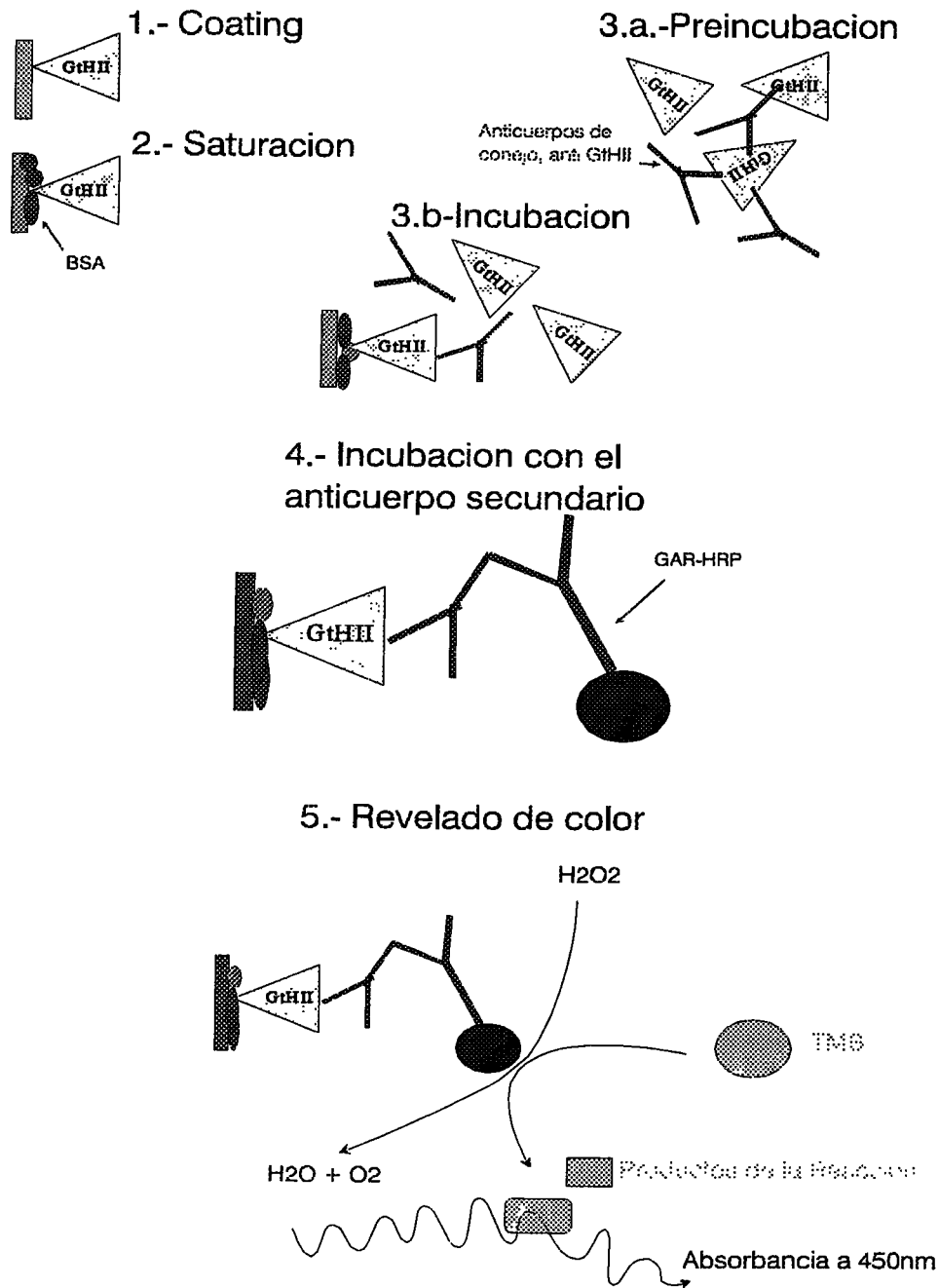


Figura II.2. Esquema de los pasos seguidos en el ELISA para determinar concentraciones de GtHII plasmática. BSA: seroalbúmina bovina. GAR-HRP: Ig G de macho cabrío anti-anticuerpo de conejo ligada a la peroxidasa de rábano. TMB: 3,3', 5, 5', tetrametilbencidina. Esta última sustancia es descompuesta por la acción de la peroxidasa, a la vez que el agua oxigenada se descompone en agua y oxígeno, apareciendo productos de color azul que absorben a 450 nm de longitud de onda. La explicación detallada aparece en el texto.

7.2.- Análisis de vitelogenina.

Para realizar los análisis de vitelogenina (Vg) plasmática se utilizó la técnica de ELISA puesta a punto por Mañanós *et al.*, (1993; 1994 b). Un esquema de los pasos seguidos aparece en la figura II.3. La diferencia básica con respecto al ELISA de GtHII es que al anticuerpo anti-vitelogenina se liga un anticuerpo secundario que sirve de puente para que se una un complejo peroxidasa-antiperoxidasa, mientras que en el ELISA de GtHII este complejo peroxidasa-antiperoxidasa aparecía directamente acoplado al anticuerpo anti-GtHII. Por otra parte, igual que en el ELISA de GtHII hay un pocillo que se utiliza como blanco, otros pocillos en los que se detecta la máxima unión del antígeno al anticuerpo, Bo, y otros que sirven para detectar la unión inespecífica, NSB.

En este método se establece una competición, por el anticuerpo, entre la Vg pegada a las paredes de los pocillos de las microplacas (NUNC MAXISORP microtitration plates) y la Vg de las muestras o de los puntos de la curva patrón. En principio se realiza una preincubación de la Vg de las muestras y de los puntos de la curva patrón con el anticuerpo. Para ello, las muestras de plasma se diluyen usando tampón PBST con un 2% de suero de cerdo (Tampón PBST-NPS, "PBST-Normal Pig Serum"). Las muestras de plasma en las que la concentración de Vg era alta, es decir las recogidas en los meses de vitelogénesis (noviembre a marzo) se diluyeron 1/100000. En los meses de inicio y finalización de la vitelogénesis (octubre y abril) la dilución de las muestras fue de 1/10000. En el resto de los meses la dilución de las muestras fue de 1/100. 150 µl de esta solución se unen a otros 150 µl de la dilución de anticuerpo en tubos de polipropileno. El anticuerpo se utilizó siempre a una dilución final de 1/100000. Las muestras se mantienen en preincubación durante 16 h a 4°C.

Simultáneamente a la preincubación se prepara el coating de Vg. Para ello, en cada pocillo de la microplaca, se mantienen 200 µl de una solución de 100 ng/ml de vitelogenina en tampón carbonato (Na_2CO_3 0.05 M, NaHCO_3 0.05 M, pH 9.6) durante 16 h a 4°C.

En el siguiente paso se realiza la saturación. Para ello, tras vaciar los pocillos de la placa y ser lavados tres veces, durante un minuto cada vez (proceso de lavado, similar al descrito para el ELISA de GtH II), con tampón PBST, se añade a cada uno de estos pocillos 200 µl de tampón PBST-NPS. Las proteínas presentes en el suero de cerdo (NPS, "normal pig serum") rellenan los espacios que pudieran quedar entre las moléculas de Vg adsorbidas a las paredes de los pocillos. De ese modo se evita la interacción de la Vg de las muestras o del Ac con la superficie de los pocillos, reduciéndose la unión inespecífica. La placa se mantiene durante 30 minutos a 37°C. Los tubos usados para la preincubación que se mantenían a 4°C pasan, ahora, a 37°C durante 30 minutos.

Acto seguido tiene lugar la incubación propiamente dicha. Se realiza un nuevo lavado de la placa y la solución de cada una de las muestras y de los estándares mantenida con el anticuerpo durante la preincubación se reparte en los pocillos correspondientes. La incubación dura 90 minutos a 37 °C.

Para detectar los complejos formados entre la Vg pegada a las paredes de los pocillos y el anticuerpo se utiliza el método de la peroxidasa-antiperoxidasa, como en el caso de la GtHIII pero con una ligera variación. Tras la incubación del antígeno con el anticuerpo se realiza un nuevo lavado para desechar las moléculas y complejos que no han quedado pegados a las paredes de los pocillos y, a continuación, se añade a los pocillos

200 µl de una solución de anticuerpo de cerdo anti-anticuerpo de conejo (Dakopatts, Dinamarca), diluido 1/20000 en tampón PBST-NPS. Este paso dura 45 minutos y se realiza a 37°C.

Tras un nuevo lavado se realiza la incubación con un complejo peroxidasa-antiperoxidasa (Dakopatts, Dinamarca), diluido 1/5000 en tampón PBST-NPS. Se añade a cada pocillo 200 µl de esta solución y se mantiene a 37°C durante 30 minutos, lavándose la placa nuevamente al final de este proceso.

Para finalizar y obtener la coloración correspondiente a cada pocillo se añaden 200 µl de una solución de OPD ("Ortho-phenilene-diamine", Sigma, USA) en tampón citrato fosfato (ácido cítrico, $C_6H_8O_7$ 0.1 M; Na_2HPO_4 0.2 M. pH 5). Para preparar esta solución se diluyen 10 µg de OPD en 20 ml de tampón citrato fosfato y se añaden 10 µl de agua oxigenada. El recipiente en el que se realice la solución ha de mantenerse recubierto con papel de aluminio ya que el OPD es lábil a la luz. Este paso dura 30 minutos y se realiza en total oscuridad. Al final la reacción se frena utilizando ácido sulfúrico 4 N. La lectura de la absorbancia de cada pocillo se realiza a una longitud de onda de 495 nm usando un lector automático de microplacas (Microplate Reader, Model 3550, BioRad).

Características del ensayo.

La variación intraensayo fue de 5.3% (n=5). La variación interensayo fue de 9.8% (n=9). La sensibilidad del ensayo fue de 1 ng/ml. Sin embargo hay que tener en cuenta que las muestras de plasma se diluyeron un mínimo de 100 veces. Por lo tanto, la sensibilidad real del ensayo sobre muestras de plasma fue de 100 ng/ml.

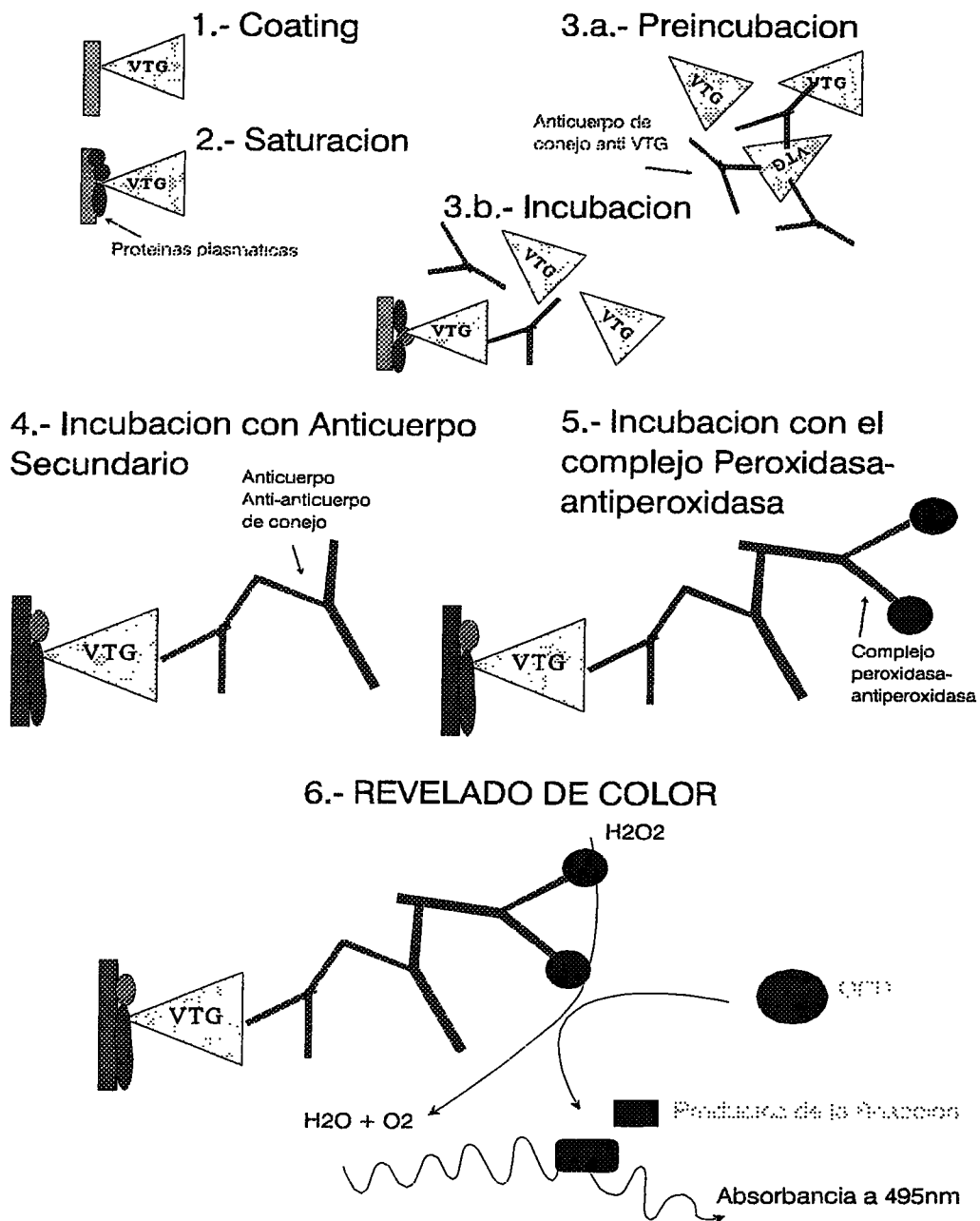


Figura II.3. Esquema del desarrollo de un ELISA de vitelogenina. Vg: vitelogenina. Los pasos de preincubación, incubación, coating y saturación son similares a los descritos en el ELISA de GtHII. Después de la saturación el anticuerpo anti-vitelogenina se hace reaccionar con un anticuerpo de cerdo anti-anticuerpo de conejo. Éste último también va a reaccionar con los complejos peroxidasa-antiperoxidasa. La peroxidasa descompone el OPD en una serie de compuestos de color amarillo y con un máximo de absorbancia a 495 nm. Para más detalles ver el texto.

7.3.- Análisis de 17 β - estradiol.

Los niveles de 17 β -estradiol (E2) se determinaron en plasma utilizando el método de RIA puesto a punto por Fostier *et al.*, (1978, 1982) y adaptado a la lubina por Prat *et al.*, (1986). Este método se basa en la competición que se establece por un mismo anticuerpo entre el antígeno sin marcar, E2, y el antígeno marcado por medio de tritio, E2*. El E2 y el E2* fueron adquiridos comercialmente (SIGMA). El anticuerpo antiE2 (AcE2) se obtuvo en nuestro laboratorio tal y como se detalla en el apartado siguiente.

Preparación del anticuerpo antiE2.

Para conseguir el AcE2 se utilizaron conejos de raza neocelandesa. Cada conejo fue inyectado mensualmente, hasta un total de cuatro veces, con una solución antigénica de E2 (1,3,5 (10)-estratrien-3,17, β - diol-6- one 6- CMO BSA, Steraloids) en solución salina al 9‰, mezclado a partes iguales con adyuvante de Freund. Al final del proceso de inmunización se sacrificó a los animales y el suero obtenido se alicuotó y se guardó a -20°C. Se calculó la titulación del anticuerpo (Prat, 1991) resultando que la dilución de trabajo del AcE2 fue de 1/40 000.

Desarrollo del ensayo.

El proceso, que se va a describir brevemente a continuación, puede dividirse en tres fases: extracción, incubación y centrifugación.

Extracción.

El primer paso del ensayo consiste en la extracción del E2 de las muestras de plasma, utilizando una mezcla de ciclohexano-etilacetato (1:1 V:V). La extracción se

realizó a partir de 100 µl de plasma, que se colocaron en un tubo de polipropileno de 10 ml. Para poder calcular, al final del proceso, cual era el porcentaje de hormona que había sido extraída se depositaron, junto a los 100 µl de muestra, otros 100 µl de E2* disuelto en tampón fosfato con gelatina (TPG, Tampón fosfato 10 mM, pH 7.4, con un 1% de gelatina. Para disolver la gelatina es necesario calentar el tampón fosfato). La cantidad total de esta radiactividad que se recuperó al final de la extracción indicó cual era el porcentaje de hormona marcada que había sido extraída. Este porcentaje de extracción se supuso que era similar en el caso de la hormona no marcada.

El E2* se utiliza a una concentración de unas 1000 a 1200 cpm / 100 µl. Para preparar la solución de E2* en primer lugar se calcula el volumen de la solución estándar de E2* que contiene el total de radiactividad que se necesite. Se toma ese volumen, se añade a un vaso de precipitados y se evapora por medio de un aireador. A continuación se añade el volumen que corresponda de TPG y se redisuelve en él el E2*.

Después de mezclar el E2* con las muestras de plasma toda la preparación se agitó durante 10 segundos para que se mezclara bien y se mantuvo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Acto seguido se añadieron 2 ml de la mezcla de ciclohexano-etilacetato, se agitaron durante 10 segundos, dos veces, y el tubo se introdujo en el congelador. Tanto el E2* como el E2 presente en las muestras, al ser solubles en solventes orgánicos pasan a la fase orgánica, correspondiente al ciclohexano-etilacetato. En el fondo del tubo queda la fase acuosa que, a una temperatura de -20°C, se congela y solidifica. Aproximadamente 45 minutos más tarde se sacaron los tubos del congelador y la fase orgánica se recogió en tubos similares. Se esperó a que la fase acuosa se hubiera licuado

de nuevo, se añadió otra vez la mezcla de ciclohexano-etilacetato y se repitieron las operaciones descritas, hasta repetir, por segunda vez, el proceso de extracción.

Una vez recogida, la fase orgánica se evaporó, utilizando un aireador y elevando su temperatura hasta 40°C introduciendo los tubos en un baño con agua a esta temperatura. Cuando la evaporación terminó el precipitado se redisolvió en 200 µl de etanol. Así preparadas, las muestras se guardaron en el congelador hasta el día siguiente.

Incubación.

El proceso de incubación se llevó a cabo en tubos de polipropileno de 3 ml. Siguiendo un esquema de trabajo similar al descrito previamente para los ELISAs de GtH y Vg se preparó una curva estándar de E2 (SIGMA, St. Louis, MO, USA), así como unos tubos que sirvieron para calcular el Bo y el NSB. El rango de la curva estándar fue de 5 pg/100 µl a 1000 pg/100 µl.

La curva estándar se preparó a partir de una solución estándar de E2 disuelto en etanol a una concentración de 100 µg/100 ml (solución estándar). Debido a las fuertes variaciones de volumen sufridas por el etanol con la temperatura esta concentración es la que aparece a 20°C. Para preparar la curva estándar, al tomar el volumen necesario de la solución estándar ésta ha de encontrarse a una temperatura de 20°C. Para hacer la curva estándar se prepararon tres matraces aforados de 100 ml en los que se realizaron tres soluciones distintas de E2:

Solución I. ml de la solución estándar enrasado a 100 ml con TPG.

Solución II. 1 ml de la solución I enrasado a 100 ml con TPG.

Solución III. 10 ml de la solución II enrasados a 100 ml con TPG.

Los puntos de la curva estándar fueron los que se indican a continuación. Para conseguir cada punto se tomó el volumen indicado de las soluciones III ó II y se llevó, en un tubo de vidrio, hasta un volumen final de 10 ml con TPG:

5 pg/ml	0.5 ml de la solución III
10 pg / ml	1 ml de la solución III
20 pg/ ml	2 ml de la solución III
30 pg/ ml	3 ml de la solución III
40 pg/ ml	4 ml de la solución III
50 pg/ ml	5 ml de la solución III
60 pg/ ml	6 ml de la solución III
70 pg/ ml	7 ml de la solución III
80 pg/ ml	8 ml de la solución III
100 pg/ ml	10 ml de la solución III
150 pg/ ml	1.5 ml de la solución II
200 pg/ ml	2 ml de la solución II
300 pg/ ml	3 ml de la solución II
400 pg/ ml	4 ml de la solución II
600 pg/ ml	6 ml de la solución II
800 pg/ ml	8 ml de la solución II
100 pg/ ml	10 ml de la solución II

El Ac se preparó, como se ha indicado antes, a una dilución de 1/40000 en TPG. El E2* utilizado en la incubación se encontraba a una concentración de unas 12000 cpm/100 μ l y se preparó de modo similar al E2* utilizado en la extracción. Los tubos Bo llevan únicamente E2* y Ac, de modo que no se establece competencia con el E2 de las muestras por el Ac e indicaron cual era el porcentaje máximo de unión del Ac al antígeno. Los tubos NSB recibieron únicamente E2*, de manera que la radiactividad que se detecta en ellos, al final del ensayo, corresponde a aquel E2* que se une de modo inespecífico a sustancias diferentes al Ac. Además, también se prepararon unos tubos en los que sólo se puso E2* y que sirvieron para conocer, al final del ensayo, la cantidad total de radiactividad utilizada en cada tubo. Se denominan tubos totales, t. Otros tubos no recibieron nada de E2* e indicaron cual es la cantidad de radiactividad que en el ensayo se detecta como ambiental.

Las muestras se prepararon del siguiente modo: se evaporó el etanol por medio de un aireador a la vez que se introducían los tubos en un baño a 40°C; se añadieron 350 µl de TPG; se agitaron durante 20 segundos y, finalmente, se mantuvieron durante 10 minutos en un baño a 40 °C. Una vez recuperadas las muestras se añadieron 100 µl de cada una de ellas a tres tubos. Uno de esos tubos se retiró y se guardó hasta el momento de las centrifugaciones, para determinar la cantidad de radiactividad en él presente y, tras los cálculos pertinentes, el porcentaje de recuperación tras la extracción. Cada uno de los puntos de la curva estándar se repartió en tres tubos, colocando 100 µl en cada uno de ellos. En cada tubo de muestra o de la curva estándar se pusieron, además, 100 µl de la solución de E2* y 100 µl de la solución de Ac. La incubación se realizó durante 3 h a 20°C.

Al final de la incubación, es necesario separar los complejos antígeno-anticuerpo formados de la hormona marcada que ha quedado libre. Para ello se utiliza una solución de polietilenglicol al 25% (MERCK) en TPG. Este polietilenglicol forma una malla que retiene la hormona marcada, pero que permite el paso de los complejos antígeno-anticuerpo, que resultan más pesados.

Todos los tubos, excepto los totales, recibieron 2 ml de la solución de polietilenglicol y se mantuvieron a 4°C durante toda una noche.

Centrifugación.

A continuación estos tubos se centrifugaron, de modo que los complejos antígeno-anticuerpo fueron arrastrados hasta el fondo del tubo mientras que las moléculas sencillas quedaron retenidas en el polietilenglicol. Una primera centrifugación se realizó a 3200 rpm durante 40 minutos, a 4°C.

El sobrenadante se eliminó. Se volvieron a añadir 2 ml de polietilenglicol y se centrifugó de nuevo a 3200 rpm durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se volvió a retirar. Para evitar los restos de PEG los tubos se dejaron boca abajo en papel de filtro durante 10 minutos y, a continuación, las gotas que pudieran quedar se aspiraron usando una trompa de vacío.

Lectura de la radioactividad.

Los complejos antígeno marcado-anticuerpo pueden detectarse, utilizando líquido de centelleo (Opti Scint, LKB), en un contador de radiactividad β . Se añadieron 2.8 ml de líquido de centelleo a los tubos. Se taparon y se agitaron vigorosamente. A continuación se colocaron en el contador y se realizó el contaje durante 10 minutos y a un máximo de 10000 cpm.

Características del ensayo.

La variación intraensayo e interensayo fueron, respectivamente, de 5.1% (n=3) y de 7.2% (n=10). La sensibilidad del ensayo fue 150 pg/ml.

7.4.- Expresión de los resultados.

Las absorbancias correspondientes a los distintos puntos de la curva patrón, B_i , suponen una determinada proporción de la unión total, B_o . La relación existente entre las absorbancias, B_i , correspondientes a los distintos puntos de la curva patrón o de las muestras y la absorbancia correspondiente a los pocillos de máxima unión, B_o , es lo que se podría denominar proporción de ligado, B_i/B_o . Este ligado puede representarse frente al logaritmo de la concentración de hormona del punto correspondiente en la curva patrón. Se obtiene, de este modo, una representación sigmoidea, que resulta muy útil para observar cual es la concentración de hormona que da el 50% de ligado y la zona de confianza de la curva, que es la del rango de concentraciones que corresponden a la zona de la curva que varía de modo lineal entre las asíntotas superior e inferior (normalmente es la zona situada entre el 80% y el 20% de ligado).

El cálculo de los resultados se realizó por medio de una transformación lineal de la curva patrón, la transformación logit, que se establece por la siguiente fórmula:

$$\text{logit } (B_i/B_o) = \ln (B_i - NSB / B_o - B_i)$$

Los datos de ligado así transformados se representan (en el eje de ordenadas) frente al \ln de las concentraciones de cada punto de la curva patrón. Al hacer el cálculo de la regresión correspondiente a los diferentes puntos representados en este sistema de coordenadas se obtiene la fórmula de una recta:

$$\text{logit } (B_i/B_o) = a + b \ln (\text{concentración})$$

Dónde a es la constante que representa el punto de corte de la recta con el eje Y , y b es la pendiente de la recta. A cada muestra le corresponde un valor de logit, a partir del cual se calcula la concentración correspondiente usando la fórmula anterior.

Al realizar todos estos cálculos hay que tomar en cuenta tres variables diferentes para estar seguro de que la fórmula obtenida para la curva patrón es correcta:

1.- El valor " r " de la correlación correspondiente a la recta de regresión calculada debe de ser cercano a 1. Normalmente se consideran como válidos valores de 0.97 o superiores.

2.- La pendiente de la recta obtenida ha de ser también cercana a 1. Sólo ese valor de la pendiente garantiza que la variación del logaritmo de la concentración es similar a la variación observada en el logit.

3.- El 50% de B_i/B_o ha de ser el mismo en todas las curvas patrón utilizadas para una misma tanda de análisis. Si esto no ocurre la curva patrón estaría desplazándose hacia abajo o hacia arriba en el sistema de coordenadas utilizado, lo que provocaría variaciones de unos ensayos a otros en los resultados obtenidos.

8.- MÉTODOS ESTADÍSTICOS.

Cuando se calculó la media de un grupo de datos correspondientes a una determinada variable esta se representó junto al error estándar de la media (SEM) como medida de la variabilidad de los datos.

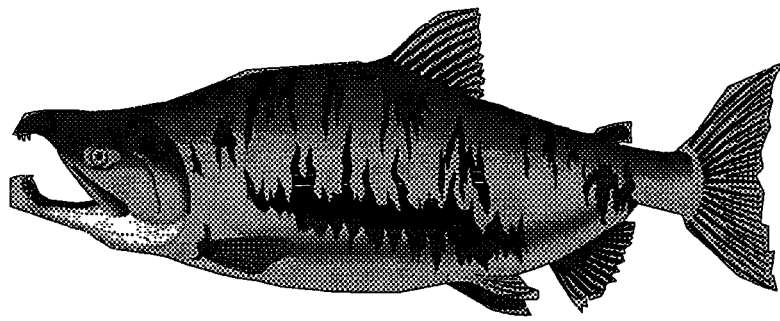
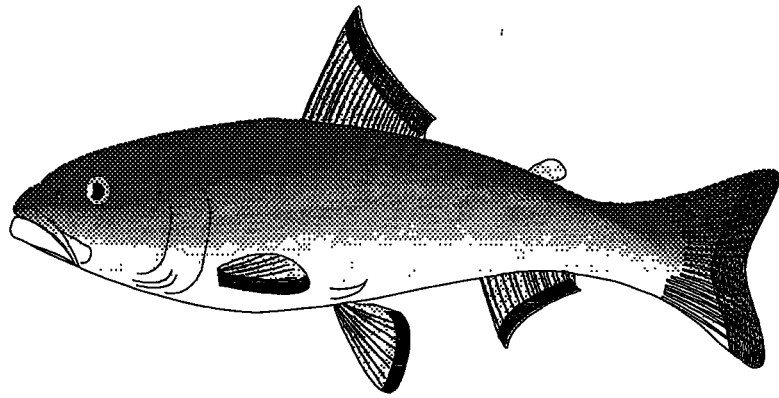
Los datos de peso y talla de las hembras, el peso en postpuesta de las hembras, los diámetros de los huevos y los de la gota de grasa, los porcentajes de viabilidad y de

eclosión de los huevos, las proporciones de los diferentes estados de desarrollo oocitario, así como los niveles de E2, Vg y GtHII en plasma y los de clases de lípidos y ácidos grasos en los alimentos y huevos, fueron comparados estadísticamente.

Para comprobar la parametricidad de los datos se estudió la normalidad de la distribución de frecuencias mediante el test de Kolmogorov-Smirnoff y la homoscedasticidad, homogeneidad de las varianzas, mediante el test de Bartlet. Resultaron ser paramétricos los datos de diámetro de los huevos y de la gota de grasa, así como los de frecuencia de distribución de estados de desarrollo oocitario. Los datos de los análisis hormonales y de vitelogenina fueron no paramétricos en todos los casos. Los porcentajes de ácidos grasos fueron paramétricos o no según el ácido graso considerado, y los de peso y talla de las hembras según el mes considerado, dependiendo de lo cual se siguieron los procedimientos que se indican a continuación.

Los datos paramétricos fueron comparados utilizando un análisis de la varianza ANOVA. Para establecer entre qué grupos existían diferencias, se usó el test de múltiple rango de Student-Newman-Keuls.

Los datos no paramétricos se compararon utilizando el test de Kruskal-Wallis seguido de un test de comparaciones múltiples establecido por Conover (1980). Las diferencias estadísticas fueron comprobadas para una $p < 0.05$.



Salmón chum

III

EFFECTO DE LA VARIACIÓN INESPECÍFICA DE LA CANTIDAD DE LÍPIDOS INGERIDA POR LOS REPRODUCTORES DE LUBINA, POR MEDIO DE LA MODIFICACIÓN DEL TIPO DE DIETA Y DE LA RACIÓN

1

2

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar si la calidad de las dietas o la cantidad total de lípidos ingerida por los reproductores puede afectar a los resultados de puesta debido a que causen alteraciones en la composición de ácidos grasos de los huevos o bien porque puedan llegar a afectar a la cascada de procesos hormonales que controlan el proceso de la reproducción, lo cual podría llegar a reflejarse en los niveles plasmáticos de 17β -estradiol (E2) o de vitelogenina (Vg). Se establecieron cinco grupos experimentales. El grupo utilizado como control se alimentó con boga troceada, dieta que, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio, produjo resultados óptimos de puesta. Los otros cuatro grupos recibieron dos dietas artificiales con distinto contenido en lípidos. Para acentuar aún más las diferencias entre grupos en la ingesta de lípidos, cada una de estas dietas se administró a diferente ración. Uno de los grupos, grupo A (también denominado 9% 1/4) recibió un pienso que poseía un 9% de lípidos y se le administró a 1/4 de la ración normal. El grupo B (9%) fue alimentado con el pienso con el 9% de lípidos a ración completa. A los grupos C (15% 1/4) y D (15%) se les administró un pienso con un 15% de lípidos a 1/4 de la ración normal y a ración completa, respectivamente. El experimento se alargó durante dos períodos reproductores consecutivos con el fin de corroborar, en el segundo año, las observaciones realizadas en el primero.

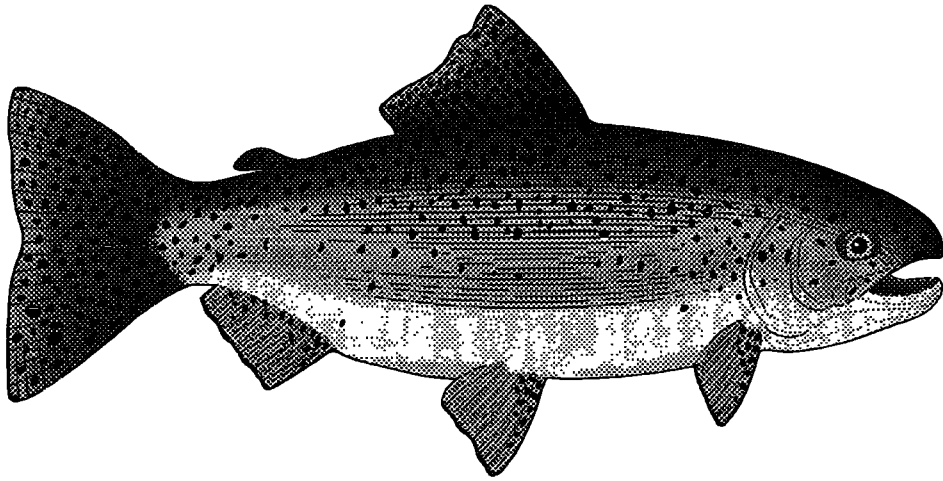
Al analizar los datos de peso y talla de las hembras no aparecieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ninguno de los grupos. Sin embargo, en los resultados de puesta el grupo control presentó unas fecundidades mayores que las de los otros grupos y unas tasas medias de viabilidad y de eclosión de los huevos que también fueron significativamente ($p < 0.05$) más altas que las observadas en los grupos alimentados con

dietas artificiales. Entre los grupos alimentados con distintos piensos o a diferente ración no aparecieron diferencias de fecundidad ni tampoco de calidad de los huevos.

Al realizar los análisis de ácidos grasos de la fracción lipídica de las dietas se encontró que el contenido en ácidos grasos de la dieta natural era muy diferente al de las dietas artificiales, debido, principalmente, a unos porcentajes mucho menores de ácidos monoenoicos que las dietas artificiales y a un menor porcentaje de ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) que fue acompañado por un alto contenido de ácido araquidónico (AA, 20:4 n-6) y de ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3). Como consecuencia, las relaciones DHA:EPA y AA:EPA fueron mucho mayores en la dieta natural que en las dietas artificiales. En la fracción lipídica de los huevos del grupo control las relaciones DHA:EPA y AA:EPA fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) que en el resto de los grupos. Dado el importante papel jugado por el DHA en el mantenimiento de la estabilidad y funcionalidad de la membrana plasmática y puesto que este ácido graso compite con el EPA a la hora de entrar a formar parte de los fosfolípidos, los datos obtenidos indican que la relación DHA:EPA va a ser un determinante fundamental de la calidad de los huevos de la lubina. Por su parte, el AA y el EPA actúan como precursores de los eicosanoides. Estas sustancias intervienen en un amplio espectro de funciones básicas para el organismo (inmunidad, reacciones inflamatorias, coagulación sanguínea, ovulación). Sin embargo los eicosanoides derivados del AA tienen una mayor actividad biológica que los derivados del EPA. Estos dos ácidos grasos compiten por los mismos enzimas encargados de la síntesis de los eicosanoides, de modo que es necesario un equilibrio adecuado entre ambos ácidos grasos para que los eicosanoides se formen con normalidad. Los datos obtenidos en este experimento indican que, junto a la relación

DHA:EPA, la proporción AA:EPA también juega un papel muy importante en el desarrollo embrionario.

Por otra parte, el grupo control presentó unos niveles de E2 más bajos que los de los observados en los grupos alimentados con pienso. Se sugiere que este efecto pudo ser debido al elevado contenido en ácidos monoenoicos de cadena larga de las dietas artificiales. Este hecho provocaría una situación fisiológica anormal que ocasionaría una proliferación peroxisomal a nivel de las células de la granulosa. Puesto que en estos peroxisomas aparecen los enzimas encargados de la transformación de testosterona en E2, el efecto final sería un aumento de la concentración de este esteroide. A la vez la concentración plasmática de Vg fue más elevada en el grupo control que en el resto de los grupos. La causa fue probablemente la proporción inadecuada de los ácidos grasos de la serie n-3, en particular DHA y EPA administrados a través de las dietas artificiales, ya que se ha observado que estos ácidos grasos constituyen una parte importante del contenido lipídico de la Vg y que los niveles plasmáticos de esta lipofosfoproteína dependen de un suministro adecuado de ácidos grasos de la serie n-3.



Trucha arcoiris

1.- INTRODUCCIÓN

En las poblaciones naturales de peces la disponibilidad de alimento es uno de los factores que limitan el éxito reproductivo (Bye, 1990). Por lo tanto, teóricamente, la ración administrada a los reproductores mantenidos bajo condiciones de cultivo debe ejercer una influencia directa sobre los resultados de puesta.

Al estudiar el efecto de la restricción de la dieta sobre el proceso reproductor en diversas especies de peces (Ver Introducción, sección 3.1.) se observó que la calidad de los huevos se veía raramente afectada, aunque, en general, apareció una reducción de la fecundidad con respecto a los reproductores alimentados a ración completa. Sin embargo, en un experimento llevado a cabo en la lubina (Cerdá *et al.*, 1994 a) la reducción de la ración administrada a los reproductores hasta la mitad de la ración normal no alteró los valores de fecundidad ni las tasas de viabilidad o de eclosión de los huevos. Este hecho llevó a plantear la necesidad de realizar nuevos experimentos bajo condiciones más severas de restricción de la dieta para obtener una idea exacta del efecto de las condiciones de alimentación sobre el desarrollo oocitario.

A diferencia de lo generalmente observado en las reducciones de la ración, un factor que sí que ejerce una profunda influencia sobre los resultados de puesta y sobre la viabilidad de huevos y larvas es la calidad de la dieta administrada a los reproductores (Revisado por Luquet y Watanabe, 1986; Kjorsvik *et al.*, 1990; Bromage *et al.*, 1992. Ver Introducción, secciones 3.2 y 3.3). En los primeros experimentos realizados acerca de esta cuestión se intentó determinar cual era el efecto del contenido proteico de las dietas sobre el proceso reproductor. Diversos experimentos realizados en trucha (Roley 1983;

Takeuchi *et al.*, 1981 b; Watanabe *et al.*, 1984) llevaron a la conclusión de que, en esta especie, la disminución del contenido proteico de la dieta no tiene ningún efecto negativo sobre los resultados de puesta si se suministra la suficiente cantidad de energía. En el caso de una especie marina, como el pargo japonés (Watanabe *et al.*, 1984 a), los mejores resultados de puesta se obtuvieron cuando el contenido proteico de la dieta fue del 45%. Sin embargo, la utilización de harina de sepia como fuente de proteínas mejoró considerablemente los resultados de puesta con respecto a la harina de pescado, utilizando el mismo porcentaje de los dos tipos de harina. Las diferencias observadas fueron atribuidas a la presencia de algún micronutriente, del que carecía la harina de pescado, en la harina de sepia y, en particular, a la composición de la fracción liposoluble de la harina de sepia. Los resultados obtenidos en estas experiencias fueron el primer indicio de la importancia de la fracción lipídica del alimento en la determinación de la calidad de las puestas.

Las experiencias realizadas en la trucha arco iris (Watanabe *et al.*, 1984 h), el pargo japonés (Watanabe *et al.*, 1984 b, c, d, e, g; 1991 a, b) y la dorada (Fernández-Palacios *et al.*, 1995; Zohar *et al.*, 1995) demostraron que el desarrollo ovárico y, posteriormente, el del embrión, están profundamente afectados por la composición en ácidos grasos de la dieta suministrada a los reproductores, observándose un claro efecto positivo del contenido en PUFA de la serie n-3 de las dietas sobre la calidad de huevos y larvas. Sin embargo existe una falta general de conocimiento acerca de la influencia de la composición en ácidos grasos de la dieta sobre la composición lipídica de los huevos y sobre la influencia que, de este modo, ejercen sobre su calidad.

En el caso concreto de la lubina varias experiencias realizadas en el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (Cerdá *et al.*, 1994 b; 1995) mostraron que un contenido proteico del 50% en las dietas artificiales es suficiente para que el proceso reproductor se desarrolle con normalidad. Sin embargo la fecundidad y la calidad de los huevos de reproductores alimentados con dietas artificiales fueron menores que las obtenidas cuando recibieron una dieta natural (Cerdá *et al.*, 1995). Ello llevó a sugerir que estas alteraciones en los resultados de puesta podrían ser provocadas por el distinto contenido en PUFA de la serie n-3 existente entre las dietas artificiales y la dieta natural. Igual que en otras especies de peces, en la lubina no se han realizado hasta el momento, estudios sistemáticos acerca del efecto de la composición en ácidos grasos de la dieta sobre los resultados de puesta.

Por otra parte, en la mayoría de los trabajos acerca de la interacción nutrición-reproducción, no se profundiza en el estudio de la influencia que el régimen alimenticio pueda ejercer sobre los mecanismos hormonales reguladores del proceso reproductor. Frémont *et al.*, 1984 observaron que la concentración plasmática de Vg en la trucha arco iris depende del contenido de las dietas en ácidos grasos de la serie n-3. Sin embargo, estos autores no relacionaron la reducción de la concentración plasmática de Vg, causada por la deficiencia dietética en ácidos grasos de la serie n-3, con los resultados de puesta. En nuestro laboratorio se han realizado una serie de experiencias en las que han aparecido claras alteraciones en los niveles plasmáticos de Vg y de esteroides (Cerdá *et al.*, 1994 a; 1995; Kah *et al.*, 1995) asociadas con variaciones de fecundidad y de calidad de los huevos provocadas por la dieta consumida por los reproductores. Sin embargo existe una gran falta de información acerca de los mecanismos por los cuales el contenido de las dietas puede llegar a afectar la secreción de hormonas reproductoras o de Vg.

El primer objetivo de la presente experiencia fue determinar el efecto de las alteraciones en la calidad de la dieta o en la cantidad total de lípidos ingeridos por los reproductores, sobre la composición lipídica de los huevos de lubina y sobre su calidad (estableciendo como determinantes de la calidad los porcentajes de viabilidad y de eclosión de los huevos). Para variar el contenido en ácidos grasos de las dietas se utilizó una dieta natural que poseía un perfil de ácidos grasos muy distinto al de las dietas artificiales también usadas en este mismo experimento. La cantidad total de lípidos ingeridos por los reproductores se varió mediante las alteraciones en el contenido de lípidos de la dieta y en la ración administrada. Otro objetivo fue detectar las posibles alteraciones ocasionadas por el régimen de alimentación en la regulación hormonal del proceso reproductor. Para ello se observaron las variaciones de los niveles plasmáticos de Vg y de E2 a lo largo del ciclo reproductor en todos los grupos experimentales.

2.- MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1.- Animales y tratamiento experimental.

Este primer experimento se inició en junio de 1991 y se prolongó durante dos años, de modo que llegara a abarcar dos períodos de puesta consecutivos, finalizando en mayo de 1993. Se utilizaron lubinas de dos años de edad con un peso y talla medios de $567.8 \text{ g} \pm 20.3$ y $35.7 \text{ cm} \pm 0.35$, respectivamente. Se formaron cinco grupos de unos veinticinco animales, con una proporción de machos respecto a hembras que osciló entre 2:1 y 1:1.

Cuatro de estos grupos experimentales fueron alimentados con dietas artificiales (BOCM Pauls, Renfrew, Escocia), consistentes en un pienso granulado con un diámetro de 9 mm. Estas dietas contenían un 9% o bien un 15% de lípidos. Las materias primas utilizadas en la fabricación de la dieta con un 9% de lípidos aparecen en la tabla III.1. La dieta con un 15% de lípidos recibió una mayor cantidad de aceites, de modo que el porcentaje del resto de los componentes disminuyó proporcionalmente, pero las materias primas utilizadas en su manufactura fueron las mismas que las de la dieta con un 9% de lípidos. La composición porcentual aproximada de las dietas fue cedida por la casa comercial y aparece detallada en la tabla III.2. El contenido en ácidos grasos de las dietas se muestra en la tabla III.3.

Cada una de estas dietas artificiales se administró bien a ración completa, o bien a 1/4 de esa ración completa. La ración administrada a los animales se modificó a lo largo del año, siendo, en los grupos alimentados a ración completa, de un 2.2% de la biomasa de cada tanque entre junio y octubre, y de un 1.2% en el resto de los meses del

año. En los grupos alimentados a 1/4 de la ración completa los porcentajes correspondientes fueron de 0.5% y de 0.3%.

Un quinto grupo recibió una dieta natural consistente en boga (*Boops boops*) troceada. Se supuso que esta dieta natural poseía todos los componentes necesarios para una alimentación correcta de los reproductores por lo que resultaría ideal para ser utilizada como referencia en el estudio del efecto de dietas artificiales. En una experiencia previa, realizada en el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, se observó que la reducción de la ración con la que se administraba esta dieta natural hasta un 0.5% de la biomasa no tenía ningún efecto sobre la calidad de las puestas obtenidas (Cerdá *et al.*, 1994 a). Debido a ello a este quinto grupo se le administró la dieta natural a ración completa y se consideró como un grupo control.

Quedaron así establecidos los cinco grupos experimentales que se han descrito previamente en el apartado general de Material y Métodos: **grupo Control**, alimentado con boga a ración completa; **grupo A (9%, 1/4)**, alimentado con la dieta de un 9% de lípidos a 1/4 de ración; **grupo B (9%)**, alimentado con la dieta 9% de lípidos a ración completa; **grupo C (15% 1/4)**, alimentado con los gránulos de un 15% de lípidos a 1/4 de ración y **grupo D (15%)**, alimentado con la dieta 15% de lípidos a ración completa .

2.2.- Muestreos.

Todos los tanques fueron muestreados mensualmente durante el primera año de experimentación. Tal y como se describió en el apartado general de Material y Métodos, sección 2.2, se pesó y midió a los animales, con el fin de determinar la biomasa

total presente en cada tanque y calcular la ración de alimento a administrar. Se tomaron muestras de sangre individuales en las que se analizó la Vg y el E2. Durante el segundo período experimental no se realizaron muestreos. De ese modo se evitó la situación de estrés que provoca la manipulación de los animales durante las elevadas temperaturas de los meses de verano así como las posibles influencias de tal manipulación sobre los resultados de puesta.

2.3.- Análisis hormonales.

En las muestras de plasma de las hembras de todos los grupos experimentales se determinaron los niveles plasmáticos de vitelogenina y de 17β -estradiol, mediante ELISA y RIA, respectivamente. Se obtuvieron datos de todos los meses del primer ciclo reproductor estudiado.

2.4.- Tratamiento estadístico.

Los tests estadísticos aplicados fueron los detallados en el apartado general de Material y Métodos, sección 7. Se comprobó la parametricidad de los datos utilizando el test de Kolmogorov-Smirnoff para estudiar la normalidad de la distribución y el test de Bartlett para la homogeneidad de las varianzas. Los diámetros de los huevos y de la gota de grasa fueron paramétricos y se compararon utilizando un ANOVA seguido del test de Student-Newman-Keuls. Los porcentajes de viabilidad y de eclosión, así como los datos de los niveles de vitelogenina y de E2 resultaron no paramétricos. Se compararon utilizando el test de Kruskal-Wallis seguido del test de Conover (1980). Los datos de peso y talla de las hembras fueron paramétricos o no según los meses considerados y los porcentajes de lípidos y ácidos grasos según el tipo de lípido o de ácido graso considerado. En cada caso se aplicó el test correspondiente.

Tabla III.1. Materias primas utilizadas en la manufactura del pienso con un 9% de lípidos. En el pienso con un 15% de lípidos se elevó la cantidad de aceite, por lo que los porcentajes de los otros componentes disminuyeron proporcionalmente, pero se utilizaron como base para su fabricación las mismas materias primas.

<u>Harina de pescado *</u>	
Noruega LT	
Chilena("horse mackerel")	
Islandesa ("Capelin")	66 %
Danesa ("sand eels")	
<u>Aceite de pescado</u>	8 %
<u>Proteínas vegetales</u>	15 %
<u>Cereal</u>	5 %
<u>Azúcares</u>	5 %
<u>Vitaminas y minerales</u>	1 %

* La harina de pescado utilizada es una mezcla de harinas de pescado de diferente procedencia geográfica y producidas a partir de distintas especies de las que los fabricantes sólo indicaron la denominación inglesa por ellos normalmente utilizada. Su traducción al español y la determinación de las especies a que corresponden se hizo siguiendo la obra de Vera (1992). Las harinas utilizadas fueron: harina de noruega; harina de Islandia, producida a partir jurel (los fabricantes indicaron el nombre de "horse mackerel" en el que se incluyen diversas especies de jureles y caballas: *Caranx spp.*, *Scomber trachurus*, *Trachurus spp.*); harina de Islandia, cuya base es el capelán (señalado por los fabricantes como "capelin" nombre con el que se designan diversas especies del género *Mallotus*) y harina danesa, hecha a partir de lanzón japonés ("sand eels", *Ammodytes personatus*).

Tabla III.2. Composición porcentual aproximada de la dieta natural y de los dos tipos de pienso con los que se alimentaron los diferentes grupos de animales en el presente experimento. ND: no detectado.

	Dieta natural	Dieta 9% lípidos	Dieta 15% lípidos
Proteínas	16 %	54.5 %	50 %
Lípidos	5 %	9 %	15 %
Carbohidratos	ND	16.5 %	15 %
Agua	77%	10 %	10 %
Cenizas	3%	10 %	10 %

Tabla III.3. Porcentajes de ácidos grasos presentes en la fracción lipídica de la dieta natural (boga troceada) y de las dos dietas artificiales utilizadas en el presente experimento. * Incluye más de un monoeno.

	Dieta natural (Control)	Dieta 9% lípidos	Dieta 15% lípidos
4:0	1.9	4.1	4.4
15:0	0.7	0.4	0.4
16:0	20.1	16.5	15.6
16:1 n-7	4.1	6.4	7.1
16:2 n-3	0.7	0.9	0.8
17:0	1.0	0.2	0.2
16:3 n-3	0.6	0.4	0.4
18:0	8.3	3.3	2.6
18:1 *	10.7	16.7	15.1
18:2 n-6	2.6	4.7	3.5
18:3 n-3	0.6	1.1	1.1
18:4 n-3	0.5	2.0	2.6
20:1 *	1.8	8.2	10.9
20:4 n-6 (AA)	4.6	0.9	0.6
20:4 n-3	0.2	0.6	0.6
20:5 n-3 (EPA)	6.7	9.0	9.0
22:1	0.6	8.6	11.0
22:5 n-6	1.2	0.1	nd
22:5 n-3	2.4	1.5	1.2
22:6 n-3 (DHA)	22.1	10.9	10.0
Saturados totales	32.0	24.5	23.2
Monoenos totales	17.2	39.9	44.1
Dienos totales	3.3	5.6	4.3
PUFA	42.2	32.1	29.8
Total n-3	33.8	26.4	25.7
Total n-6	8.4	5.7	4.1
Relación n-3:n-6	4.02	4.63	6.27
Relación AA:EPA	0.7	0.1	0.1
Relación DHA:EPA	3.3	1.21	1.11

3.- RESULTADOS.

3.1.- Variación de peso y talla de las hembras.

Los cambios en peso y talla de las hembras de los diferentes grupos experimentales a lo largo del primer año de experimentación se muestran en la figura III.1.

Todos los grupos mostraron un patrón similar de incremento en peso hasta el inicio de la época de puesta, que tuvo lugar a continuación del muestreo realizado en diciembre. A partir de este punto en todos los peces se observó un crecimiento muy moderado o, incluso, una ligera reducción del peso a lo largo de la época de puesta, de enero a abril. Aunque en el grupo A (9% 1/4) apareció, ya en abril, una cierta elevación del peso con respecto al mes de marzo, en el mes de mayo volvió a disminuir en este grupo. En mayo, con la época de puesta ya finalizada, se observó en todos los grupos una cierta recuperación del peso. El análisis estadístico de los datos no reveló ninguna diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos en el peso de las hembras en ninguno de los meses considerados.

La longitud de los animales varió de un modo sostenido en todos los grupos. Se elevó más rápidamente durante los primeros meses de experimentación, hasta el comienzo del período de puesta, y, a partir de este momento, el aumento fue más moderado. No aparecieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes grupos en ninguno de los meses.

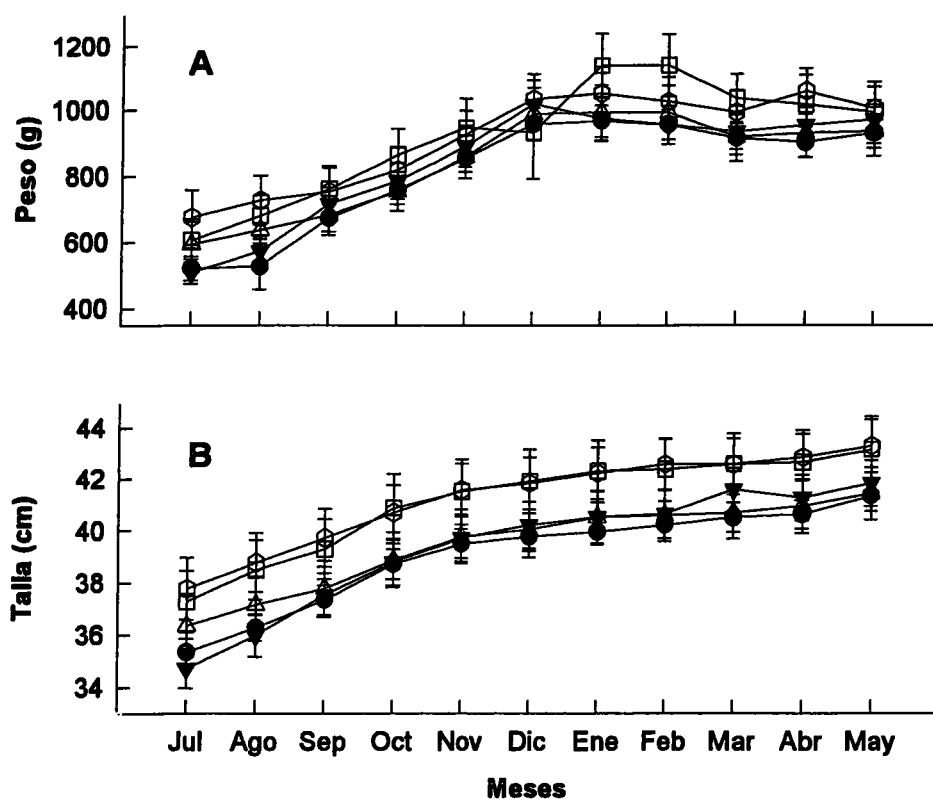


Figura III.1. Evolución del peso (A) y de la talla (B) de las hembras de los diferentes grupos experimentales desde el inicio del experimento hasta la finalización del primer período de puesta. Grupo A (9%, 1/4), círculos negros; grupo B (9%), círculos blancos; grupo C (15%, 1/4), triángulos negros; grupo D (15%), triángulos blancos; grupo control, cuadrados blancos. Cada punto representan la media \pm SEM de 6 a 14 animales. No se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos dentro de un mismo mes, ni en peso, ni en talla.

3.2.- Resultados de puestas y características de huevos.

Características de las puestas y valores de fecundidad.

Los datos correspondientes a las características de cada una de las épocas de puesta de los cinco grupos experimentales aparecen en la tabla III.4. Los valores de fecundidad observados se muestran en la tabla III.5.

En el primer ciclo reproductivo las puestas se iniciaron entre el 7 de enero en el grupo B (9%) y el 23 de enero en el grupo control. La duración del período de puesta osciló entre los 70 días del grupo D (15%) y los 96 días del grupo B (9%). En el segundo ciclo reproductivo las primeras puestas aparecieron en el grupo D el 16 de diciembre. El último grupo en iniciar las puestas fue el grupo control, el día 2 de enero. El período de puesta más corto fue el del grupo control, que duró 82 días, y el más largo el del grupo A (9% 1/4) que llegó a 110 días.

El punto medio del período de puesta fue similar en todos los grupos en el primer año estudiado y varió entre el 21 de febrero en los grupo A (9% 1/4) y C (15% 1/4) y el 26 de febrero en los grupos control y B (9%). En el segundo año, el punto medio de puesta mostró una variación mayor ya que se situó entre el 29 de enero en el grupo C (15% 1/4) y el 13 de febrero en el grupo control, indicando un avance de las puestas en el segundo año.

Variación inespecífica de la cantidad de lípidos

Tabla III.4. Características de las puestas obtenidas en los diferentes grupos experimentales en los períodos de puesta considerados. La duración del período de puesta aparece entre paréntesis junto a la fecha de inicio de las puestas. También se muestra la media \pm SEM del peso en postpuesta de todas las hembras de cada grupo experimental.

		Grupo Control	Grupo A (9% 1/4)	Grupo B (9%)	Grupo C (15% 1/4)	Grupo D (15%)
Fecha de inicio de las puestas y duración del período de puesta (días)	1992	23.01.92 (72)	11.01.92 (83)	07.01.92 (96)	22.01.92 (85)	08.01.92 (70)
	1993	02.01.93 (82)	17.12.92 (110)	30.12.92 (84)	17.12.92 (97)	16.12.92 (93)
Pto. medio del período de puesta	1992	26.02.92	21.02.92	26.02.92	21.02.92	24.02.92
	1993	13.02.93	09.02.93	10.02.93	29.01.93	03.02.93
Nº total de hembras	1992	7	9	9	14	14
	1993	6	9	9	11	14
Nº puestas por hembra	1992	1.9	3.0	2.0	1.9	2.7
	1993	2.5	2.6	4.2	2.9	2.5
Peso medio de las hembras en postpuesta (g)	1992	993 \pm 87	1004 \pm 63	931 \pm 43	935 \pm 70	970 \pm 56
	1993	1457 \pm 12	1457 \pm 99	1490 \pm 118	1451 \pm 100	1609 \pm 94

El número de puestas recogidas por cada hembra no mostró diferencias claras asociadas con el régimen nutricional. Su valor estuvo, en la primera época de puesta, entre el 1.9 del grupo control y C(15% 1/4) y el 3 del grupo A (9% 1/4). En la segunda época de puesta el menor número de puestas por hembra correspondió al grupo control, 2.5, mientras que el mayor valor registrado en esta variable fue el 4.2 del grupo B.

El peso medio de las hembras en postpuesta (aparece en la tabla III.4) fue similar en todos los grupos y no se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos en ninguna de las dos épocas de puesta .

La utilización de dietas artificiales dio lugar a una reducción de la FT y de la FR con respecto al grupo control, alimentado con una dieta natural. La única excepción observada fue el grupo C, que en la segunda época de puesta presentó una fecundidad muy elevada, superando, incluso, los valores registrados en el grupo control. La reducción de la dieta en los grupos A y C con respecto a los grupos B y D produjo una ligera disminución, tanto de la fecundidad total como de la fecundidad relativa, en la primera época de puesta. En el segundo período reproductor considerado apareció este mismo efecto en los grupos alimentados con la dieta con un 9% de lípidos, grupos A y B, pero no en los grupos alimentados con la dieta al 15% de lípidos, grupos C y D, debido a la elevación de fecundidad del grupo C.

La FT aumentó claramente en todos los grupos en la segunda época de puesta con respecto a la primera. La FR, sin embargo, no sólo no aumentó sino que disminuyó en la segunda época de puesta en todos los grupos, excepto en el grupo C, en el que se elevó de una manera muy clara.

Tabla III.5. Fecundidad total (n° de huevos por hembra) y relativa (n° de huevos por Kg de hembra) de los diferentes grupos experimentales en los dos períodos de puesta tomados en consideración.

		Grupo Control	Grupo A (9% 1/4)	Grupo B (9%)	Grupo C (15% 1/4)	Grupo D (15%)
Fecundidad Total (FT)	1992	685867	397760	622156	379270	404021
	1993	714299	522424	569171	869809	547633
Fecundidad Relativa (FR)	1992	690702	396131	668505	405469	420823
	1993	490365	352274	381994	599454	267411

Diámetro de los huevos y de las gotas de grasa.

Los valores correspondientes a las variables consideradas en este apartado, para los distintos grupos experimentales y en las dos épocas de puesta consideradas se encuentran en la tabla III.6.

En la primera época de puesta el diámetro de los huevos fue de 1.193 mm en los grupos control y D (15%), de 1.195 mm en los grupos B (9%) y C (15% 1/4) y de 1.205 en el grupo A (9% 1/4). En la segunda época de puesta el diámetro de los huevos osciló entre 1.201mm en el grupo A (9% 1/4) y 1.247 mm en el grupo B (9%). El diámetro de la gota de grasa osciló, en la primera época de puesta, entre los 372.9 μm del grupo control y los 388.2 μm del grupo D (15%). En la segunda época de puesta varió entre los 377 μm del grupo C (9% 1/4) y las 390 μm del grupo B (9%). El incremento de

lípidos en las dietas artificiales o las variaciones de la ración no provocaron la aparición de diferencias significativas ni en el diámetro de los huevos ni en el de la gota de grasa en ninguno de los grupos experimentales en ninguna de las dos épocas de puesta. Tampoco aparecieron diferencias significativas en estas dos variables en ninguno de los grupos alimentados con dietas artificiales con respecto al grupo control.

Tabla III.6.- Diámetro medio de los huevos y de la gota de grasa de cada grupo experimental en los dos años considerados. No aparecieron diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre grupos para estas dos variables, en ninguna de las dos épocas de puesta.

		Grupo Control	Grupo A (9% 1/4)	Grupo B (9%)	Grupo C (15% 1/4)	Grupo D (15%)
Diámetro medio del huevo (mm)	1992	1.193±0.01	1.205±0.01	1.195±0.01	1.195±0.01	1.193±0.01
	1993	1.202±0.01	1.201±0.01	1.247±0.05	1.208±0.00	1.228±0.01
Diámetro medio de la gota de grasa (µm)	1992	380.6±3.5	372.9±3.9	376.1±3.1	379.9±2.4	388.2±3.7
	1993	387.5±3.5	383.6±2.0	390.4±8.0	377.4±2.2	380.9±2.3



Porcentajes de viabilidad y de eclosión de los huevos.

Los porcentajes de viabilidad y eclosión de los huevos en los diferentes grupos experimentales en las dos épocas de puesta se muestran en la figura III.2. El grupo control presentó, en la primera época de puesta, el porcentaje más elevado de viabilidad de los huevos, 57%, que fue muy similar al del grupo C, 56%. Estos dos grupos mostraron unos porcentajes de viabilidad significativamente más altos ($p < 0.05$) que los restantes grupos experimentales. En los grupos A, B y D los valores para esta variable fueron mucho menores (de un 10% a un 25%) sin que se observaran entre ellos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). En la segunda época de puesta, tras un año y medio de tratamiento, las diferencias entre el grupo control y los restantes grupos experimentales se acentuaron. Todos los que recibieron dietas artificiales sufrieron una fuerte disminución de los porcentajes de viabilidad, reduciéndose a valores que oscilaron entre un 2%, grupo D, y un 16%, grupo A. El porcentaje de viabilidad del grupo control se mantuvo con respecto a las puestas del año anterior. Como resultado de estas variaciones, el porcentaje de huevos viables del grupo control fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que el registrado en los grupos B, C y D.

En la primera época de puesta considerada el grupo control mostró el porcentaje de eclosión más alto (4%), y fue significativamente distinto ($p < 0.05$) del observado en los grupos B, C y D. El porcentaje de eclosión en los grupos alimentados con dietas artificiales osciló entre 2.5%, en el grupo A y 0.02% en el grupo D. En la segunda época de puesta el porcentaje de eclosión del grupo alimentado con la dieta natural, 26%, fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que en los grupos que recibieron dietas artificiales, en los que los porcentajes de eclosión estuvieron entre un 3.4% en el grupo A y un 0% en el grupo D.

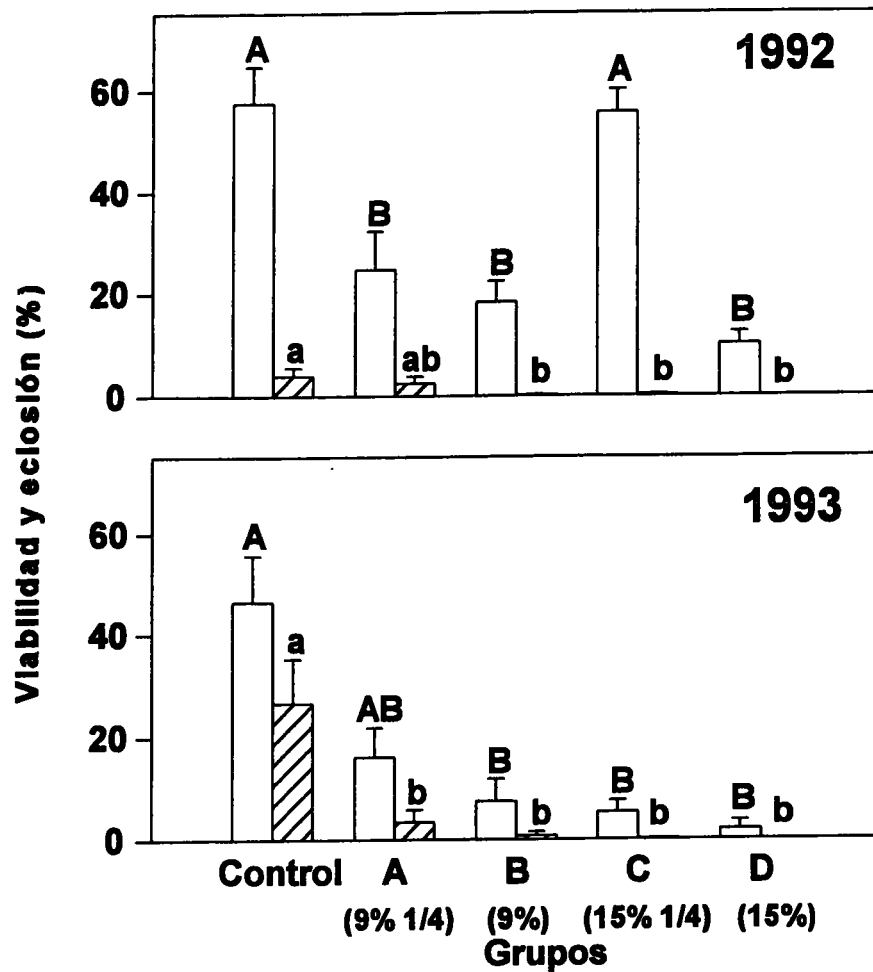


Figura III.2. Porcentajes de viabilidad y de eclosión de los diferentes grupos experimentales en los dos períodos de puesta considerados. Los datos se representan como medias de los porcentajes de todas las puestas obtenidas a lo largo del período reproductor \pm SEM. Barras blancas: porcentajes de viabilidad; barras rayadas: porcentajes de eclosión. Letras mayúsculas diferentes sobre las barras indican diferencias significativas en los porcentajes de viabilidad y las letras minúsculas en los porcentajes de eclosión, dentro de un mismo año ($p < 0.05$).

3.3.- Análisis de lípidos y ácidos grasos.

Composición en ácidos grasos de las dietas experimentales.

La composición porcentual de ácidos grasos presentes en las dietas utilizadas en este experimento aparecen en la tabla III.3 (Sección de Material y Métodos de este mismo capítulo). Los ácidos con un único doble enlace, es decir los monoeno de 18, de 20 o de 22 átomos de carbono, tuvieron un porcentaje mucho más elevado, de entre el doble y 10 veces más alto, en las dos dietas artificiales que en la dieta natural. El ácido linoleico (18:2 n-6) presentó en la dieta control un porcentaje bastante reducido, 2.6%, mientras que en los piensos con los que se alimentó a los otros dos grupos experimentales este porcentaje se incrementó hasta un 3.5% en la dieta con el 15% de lípidos y 4.7%, en la dieta con el 9% de lípidos.

Algunos ácidos grasos, como el ácido araquidónico (AA, 20:4 n-6) o el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) también aparecieron con diferencias claras entre las dietas. Así, el AA se presentó en las dietas artificiales con un porcentaje entre 5 y 8 veces más bajo (0.9% y 0.6% en las dietas con un 9% y un 15% de lípidos, respectivamente) que en la dieta natural (4.6%). En el caso del EPA, el porcentaje observado en las dietas artificiales fue del 9%, frente al 6.7% de la dieta natural. Finalmente, el porcentaje de ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3) en la dieta natural fue el doble (22%) del observado en las dietas artificiales (10%).

Cuando los ácidos grasos se agruparon por clases, se encontró que la cantidad de monoeno en las dietas artificiales (40 y 44%) fue de más del doble que en la dieta natural (17%). El total de PUFA fue también mayor en la dieta natural (42%) que en las

dietas artificiales (32% y 30%). Por su parte, la relación n-3:n-6 varió de unas dietas a otras: 4 en la dieta natural, 4.6 en la dieta con el 9% de lípidos y 6.3 en la dieta con el 15% de lípidos. Finalmente, resulta notable el hecho de que la relación DHA:EPA sea tres veces mayor (3.3) en la boga troceada que en el pienso (1.1 y 1.2). Del mismo modo también se observa una clara diferencia en la relación AA:EPA entre las dieta natural (0.7) y las dietas artificiales (0.1).

Clases de lípidos presentes en los huevos. Primera y segunda épocas de puesta.

Los porcentajes de lípidos neutros y de las diferentes clases de fosfolípidos observados en los lípidos totales extraídos de los huevos recogidos en la primera y segunda épocas de puesta, aparecen en las tablas III.7. y III.8, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre los grupos en las clases de lípidos analizadas.

El componente predominante en los lípidos de los huevos fueron los lípidos neutros, cuyo porcentaje osciló entre el 83% y el 87%. En la fracción polar el porcentaje más elevado, en todos los grupos experimentales, correspondió a la fosfatidilcolina. En la primera época de puesta este fosfolípido apareció con un porcentaje del 6.9% en el grupo B, pero en el resto de los grupos, y en ambas épocas de puesta, sus valores oscilaron entre 11% y 14%. A continuación de la fosfatidilcolina el fosfolípido más abundante fue la fosfatidiletanolamina, pero ya con un porcentaje mucho menor, de entre un 3% y un 4%. Finalmente, el porcentaje de fosfatidilinositol fue de, aproximadamente, el 1% y el de la esfingomiélin de un 0.5% o menor.

Variación inespecífica de la cantidad de lípidos

Tabla III.7. Clases de lípidos presentes en los lípidos totales extraídos de los huevos fertilizados correspondientes a los diferentes grupos experimentales en la primera época de puesta. Se representan como medias de 7 a 9 muestras \pm SEM.

	Grupo Control	Grupo A (9% 1/4)	Grupo B (9%)	Grupo C (15%1/4)	Grupo D (15%)
Lípidos totales (μg / huevo)	52.3 \pm 4.6	65.4 \pm 6.3	67.5 \pm 8.8	59.3 \pm 4.3	50.0 \pm 5.1
Composición en clases de lípidos (% de los lípidos totales)					
Fosfatidilcolina	10.7 \pm 2.6	12.1 \pm 0.9	6.9 \pm 1.1	12.3 \pm 0.4	14.0 \pm 0.7
Fosfatidiletanolamina	3.2 \pm 0.9	3.1 \pm 0.4	2.9 \pm 0.7	3.2 \pm 0.2	3.3 \pm 0.1
Fosfatidilinositol	0.8 \pm 0.2	0.7 \pm 0.1	0.6 \pm 0.0	0.7 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1
Esfingomielina	0.1 \pm 0.0	0.3 \pm 0.2	0.1 \pm 0.0	0.3 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1
Lípidos neutros	83.7 \pm 5.5	84.4 \pm 6.7	87.6 \pm 8.4	83.2 \pm 4.9	84.6 \pm 5.2

Tabla III.8.- Clases de lípidos presentes en los lípidos totales extraídos de los huevos fertilizados correspondientes a los diferentes grupos experimentales en la segunda época de puesta. Se representan como medias de 7 a 9 muestras \pm SEM.

	Grupo Control	Grupo A (9% 1/4)	Grupo B (9%)	Grupo C (15%1/4)	Grupo D (15%)
Lípidos totales (μg /huevo)	47.7 \pm 5.9	49.6 \pm 11.0	53.5 \pm 6.5	48.3 \pm 4.3	49.7 \pm 9.4
Composición en clases de lípidos (% de los lípidos totales)					
Fosfatidilcolina	13.1 \pm 0.6	13.0 \pm 1.4	12.5 \pm 0.6	10.7 \pm 0.9	12.0 \pm 1.3
Fosfatidiletanolamina	4.3 \pm 0.2	4.2 \pm 0.2	3.8 \pm 0.2	3.2 \pm 0.2	3.7 \pm 0.5
Fosfatidilinositol	1.3 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1
Esfingomielina	0.5 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1
Lípidos neutros	80.6 \pm 5.3	80.8 \pm 9.3	81.9 \pm 6.3	84.7 \pm 4.3	82.0 \pm 7.7

Ácidos grasos presentes en los lípidos de los huevos. Primera época de puesta.

La composición porcentual en ácidos grasos de los lípidos de los huevos en la primera época de puesta aparece en la tabla III.9.

Considerados en conjunto, los más abundantes fueron los monoenos, con un 43% a un 45%, seguidos de los ácidos grasos saturados, 23% a 26% y de los PUFA, 22% a 27%. El porcentaje de dienos fue mucho menor que el de las clases de ácidos grasos anteriores: 4% a 8%. En todos los grupos los ácidos grasos de la serie n-3 fueron bastante más abundantes (14%-21%) que los de la serie n-6 (5%-7%), de modo que la relación ácidos grasos de la serie n-3 con respecto a los ácidos grasos de la serie n-6 osciló entre 1.9 en el grupo D (15%) y 3.6 en el grupo C (15% 1/4).

Tomados en cuenta individualmente, los ácidos grasos mas abundantes fueron los monoenos de 18 átomos de carbono cuyo porcentaje, dentro del contenido total de lípidos, fue de, aproximadamente, el 30%. A continuación, el porcentaje más elevado correspondió a los ácidos grasos saturados de 16C (16:0), 15% a un 17%, seguidos de los monoenos de 16 átomos de carbono (16:1), 10% a 11%, y del DHA, 7.5% a 13%.

El contenido de monoenos, de dienos, de PUFA o de ácidos grasos de las series n-3 y n-6 no mostró diferencias significativas entre grupos. Tampoco se vieron diferencias en la relación n-3:n-6.

Paralelamente a lo observado en la composición en ácidos grasos de las dietas, el grupo control presentó el porcentaje más bajo de ácido linoleico (2.8%). No obstante, este porcentaje no llegó a ser significativamente distinto del observado en los huevos procedentes de los peces alimentados con pienso (4.8%- 6.7%), entre los cuales no se observó ninguna diferencia significativa. En los huevos del grupo control el AA mostró un porcentaje (2%) de al menos el doble del observado en los demás grupos experimentales (0.5% a 1%), pero sólo llegó a ser significativamente distinto ($p < 0.05$) del porcentaje obtenido en el grupo B (pienso con 9% de lípidos, a saciedad). El porcentaje de EPA en los huevos del grupo control fue mucho menor (1.4%) que en los de los grupos alimentados con dietas artificiales, en los cuales los porcentajes de este ácido graso oscilaron entre el 2.5% y el 4.5%, pero no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso. En el caso del DHA no se observa ninguna diferencia entre los grupos experimentales, en los que el contenido de este ácido graso varió entre 7.5% en el grupo C (15% 1/4) y 12.9% en el grupo D (15%). Debido a la baja cantidad de EPA presente en los huevos del grupo control, la relación DHA:EPA fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en este grupo (6.4) que en todos los demás grupos experimentales (en los que osciló entre 2.8 y 3.1). Del mismo modo la relación AA:EPA fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los huevos del grupo control (1.4) que en los demás grupos experimentales (0.2 a 0.4).

Tabla III.9.- Porcentajes de ácidos grasos de los lípidos totales de los huevos de los diferentes grupos experimentales en la primera época de puesta. Se representan como la media de los análisis de 7 a 9 muestras. Con el de clarificar la presentación de los resultados no se muestra el SEM que alcanzó un valor máximo del 5% de la media. Superíndices diferentes en los valores de una misma fila denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). *, indica la existencia de más de un monoeno.

	Grupo Control	Grupo A (9% 1/4)	Grupo B (9%)	Grupo C (15%1/4)	GrupoD (15%)
14:0	2.0	2.4	2.4	2.6	2.3
15:0	0.7	nd	nd	0.6	0.8
16:0	17.0	17.0	16.6	16.1	14.9
16:1 *	11.3	11.8	10.6	10.6	11.3
16:2 n-3	1.6	0.2	1.4	0.9	0.9
17:0	0.8	nd	nd	0.5	0.3
16:3 n-3	1.9	0.8	0.4	0.8	0.4
18:0	5.8	5.5	5.3	4.8	5.1
18:1 *	31.6	30.6	31.2	28.1	28.7
18:2 n-6	2.8	5.7	6.7	6.5	4.8
18:3 n-3	0.9	0.9	0.5	1.7	0.9
18:4 n-3	nd	nd	nd	nd	0.3
20:1 *	1.2	2.4	3.0	4.9	1.8
20:4 n-6 (AA)	2.0 ^h	1.0 ^{ab}	0.5 ^a	0.9 ^{ab}	1.0 ^{ab}
20:4 n-3	0.6	0.2	0.2	0.5	0.5
20:5 n-3 (EPA)	1.4	4.5	3.3	2.5	4.5
22:1 *	nd ^a	0.4 ^{ab}	0.3 ^{ab}	1.5 ^b	0.9 ^{ab}
22:5 n-6	0.7 ^b	nd ^a	nd ^a	0.1 ^a	0.1 ^a
22:5 n-3	0.8	1.0	0.3	0.7	1.0
22:6 n-3 (DHA)	9.0	12.6	10.5	7.5	12.9
Total saturates	26.3	24.9	24.3	24.6	23.4
Total monoenes	44.1	45.2	45.1	45.1	42.7
Total dienes	4.4	5.9	8.1	7.4	5.7
Total PUFA	21.7	26.9	23.8	22.1	27.3
Total n-3	16.2	20.2	16.6	14.6	21.4
Total n-6	5.5	6.7	7.2	7.5	5.9
Relacion n-3 n-6	2.9	3	2.3	1.9	3.6
Relacion AA:EPA	1.4 ^a	0.2 ^b	0.2 ^b	0.4 ^b	0.2 ^b
Relacion DHA:EPA	6.4 ^b	2.8 ^a	3.1 ^a	3.0 ^a	2.8 ^a

Ácidos grasos presentes en los lípidos de los huevos. Segunda época de puesta.

Los porcentajes correspondientes a los diferentes ácidos grasos presentes en los lípidos de los huevos, en la segunda época de puesta, se representan en la tabla III.10.

Los ácidos grasos más abundantes fueron, en todos los grupos alimentados con dietas artificiales, los monoenos de 18 átomos de carbono (25%-28%), igual que en la primera época de puesta. En el grupo control, sin embargo, el ácido graso más abundante fue el DHA, cuyo porcentaje se elevó hasta un 28%, mientras que el de 18:1 fue del 23%. El contenido en DHA aumentó también en los huevos de los grupos alimentados con pienso, en los que osciló entre un 17.4%, en el grupo B, y un 19.5% en el grupo D. Como resultado de esta elevación el DHA fue el segundo ácido graso más abundante en los huevos de estos grupos, seguido del ácido graso 16:0. Debido a estos cambios, el contenido total de PUFA en los huevos de los grupos alimentados con dietas artificiales se elevó hasta valores de 36.7%-39.4%, similares a los encontrados en el contenido total de monoenos: 38.5%-40.3%. En el grupo control, los PUFA, con un 44.2%, fueron incluso más abundantes que los monoenos, que se presentaron en un 33.2%. El porcentaje de ácidos grasos saturados fue de un 19% en todos los grupos y el de dienos bajó hasta valores que oscilaron entre el 2.9% en el grupo control y el 7.3% en el grupo A.

Tras estar sometidos al tratamiento alimenticio durante un año y medio, las diferencias en el contenido de ácidos grasos de los huevos, en esta segunda época de puesta, se acentuaron notablemente. Al considerar en conjunto varios ácidos grasos aparecieron algunas diferencias interesantes entre los grupos. El contenido de PUFA en el grupo control fue significativamente ($p<0.05$) mayor que en los otros grupos

experimentales. Además, en los grupos alimentados con un 15% de lípidos (grupos C y D), la proporción de PUFA fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que en el grupo B (9%). Estas mismas diferencias entre grupos, descritas para el contenido en PUFA, son las que aparecieron cuando se tomó en consideración el contenido en ácidos grasos totales de la serie n-3. Sin embargo, en los ácidos grasos de la serie n-6 la situación se invirtió, siendo el grupo control el que presentó un contenido significativamente menor ($p < 0.05$) que el resto de los grupos. Como resultado de estas proporciones, la relación de ácidos grasos totales de la serie n-3 con respecto a la serie n-6 fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en el grupo control que en los demás grupos. Hay que hacer notar que esta relación fue también mayor en los grupos alimentados con un 15% de lípidos que en los grupos alimentados con un 9% de lípidos, aunque en este caso la única diferencia significativa ($p < 0.05$) apareció entre los grupos B y D.

El porcentaje de ácido linoleico en los huevos del grupo control resultó ser significativamente ($p < 0.05$) menor que en los huevos de los animales alimentados con pienso. Además, en estos últimos, los huevos de los grupos alimentados con un pienso con el 15% de lípidos, presentaron un porcentaje de ácido linoleico significativamente más bajo ($p < 0.05$) que el de los grupos alimentados con el pienso con un 9% de lípidos. El AA, en los huevos del grupo control, mostró un porcentaje significativamente más elevado ($p < 0.05$) que en todos los demás grupos. En los huevos del grupo D (15%) este porcentaje fue significativamente más alto ($p < 0.05$), que en los grupos A y B, alimentados con el 9% de lípidos.

El porcentaje de EPA fue significativamente más bajo ($p < 0.05$) en los huevos del grupo control que en los de los grupos alimentados con dietas artificiales, entre los cuales

no se observaron diferencias significativas. Al mismo tiempo, los huevos del grupo control presentaron el porcentaje más elevado de DHA, siendo significativamente mayor ($p < 0.05$) que en los demás grupos. La otra diferencia significativa en el contenido de DHA apareció entre los huevos del grupo D y los del grupo B, siendo el porcentaje del primero significativamente mayor ($p < 0.05$) que el del segundo. El resultado de todas estas diferencias fue que las proporciones AA:EPA y DHA:EPA en el grupo control fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) que en el resto de los grupos experimentales.

Tabla III.10.- Porcentajes de ácidos grasos presentes en los huevos de los diferentes grupos experimentales en la segunda época de puesta. Se representan como la media de los análisis de 7 a 9 muestras. Con el de clarificar la presentación de los resultados no se muestra el SEM que alcanzó un valor máximo del 5% del de la media. Superíndices diferentes en los valores de una misma fila denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). *, indica la existencia de más de un monoeno.

	Grupo Control	Grupo A (9% 1/4)	Grupo B (9%)	Grupo C (15%1/4)	GrupoD (15%)
14:0	1.8	2.0	2.0	2.4	2.1
15:0	0.5	0.2	0.2	0.3	0.3
16:0	12.9	13.3	13.4	12.8	12.6
16:1 *	8.8	9.0	9.0	9.2	9.0
16:2 n-3	1.1 ^c	0.3 ^{ab}	0.3 ^a	0.4 ^b	0.4 ^b
17:0	0.5 ^b	0.1 ^a	0.2 ^a	0.2 ^a	0.2 ^a
16:3 n-3	1.1 ^c	0.5 ^a	0.5 ^a	0.7 ^b	0.7 ^b
18:0	4.2	3.9	4.0	3.9	4.0
18:1 *	23.3 ^a	25.8 ^b	27.7 ^c	25.3 ^b	25.5 ^b
18:2 n-6	1.8 ^a	7.0 ^c	6.8 ^c	6.0 ^b	5.7 ^b
18:3 n-3	0.8 ^a	1.2 ^{bc}	1.1 ^b	1.3 ^c	1.2 ^{bc}
18:4 n-3	0.6 ^a	0.9 ^{bc}	0.7 ^{ab}	1.2 ^d	1.0 ^{cd}
20:1 *	1.1 ^a	3.0 ^{bc}	2.8 ^b	2.9 ^{bc}	3.1 ^c
20:4 n-6 (AA)	1.9 ^c	0.9 ^a	0.9 ^a	1.0 ^{ab}	1.1 ^b
20:4 n-3	0.6 ^b	0.6 ^{ab}	0.5 ^a	0.8 ^c	0.7 ^c
20:5 n-3 (EPA)	5.7 ^a	7.2 ^b	7.1 ^b	7.1 ^b	7.2 ^b
22:1 *	nd ^a	0.8 ^b	0.8 ^b	1.1 ^c	0.9 ^{bc}
22:5 n-6	0.8 ^c	0.1 ^a	0.1 ^b	0.3 ^b	0.3 ^b
22:5 n-3	1.8 ^c	1.4 ^a	1.3 ^a	1.6 ^b	1.5 ^{ab}
22:6 n-3 (DHA)	28.0 ^c	18.5 ^{ab}	17.4 ^a	19.0 ^{ab}	19.5 ^b
Total saturates	19.9	19.5	19.8	19.6	19.2
Total monoenes	33.2 ^a	38.6 ^{bc}	40.3 ^c	38.5 ^b	38.5 ^b
Total dienes	2.9 ^a	7.3 ^d	7.1 ^{cd}	6.4 ^{bc}	6.1 ^b
Total PUFA	44.2 ^c	38.6 ^{ab}	36.7 ^a	39.4 ^b	39.3 ^b
Total n-3	39.7 ^c	30.6 ^{ab}	28.9 ^a	32.1 ^b	32.2 ^b
Total n-6	4.5 ^a	8 ^c	7.8 ^{bc}	7.3 ^{bc}	7.1 ^b
Relación n-3:n-6	8.8 ^c	3.8 ^{ab}	3.7 ^a	4.4 ^{ab}	4.5 ^b
Relación AA:EPA	0.3 ^a	0.1 ^b	0.1 ^b	0.1 ^b	0.1 ^b
Relación DHA:EPA	4.9 ^b	2.5 ^a	2.4 ^a	2.6 ^a	2.7 ^a

Análisis de 17 β -estradiol y de vitelogenina.

Niveles plasmáticos de 17 β -estradiol.

Los niveles plasmáticos de E2 detectados en las hembras de los cinco grupos experimentales a lo largo del primer período reproductor aparecen en la figura III.3.

El grupo control mostró unos niveles de E2 muy homogéneos, sin que se observaran elevaciones estadísticamente significativas en meses consecutivos. Así, únicamente a partir del mes de diciembre, y en meses posteriores durante la puesta y postpuesta reciente, aparecieron valores significativamente diferentes ($p < 0.05$) de los basales registrados en octubre. Además, la concentración plasmática de estradiol se mantuvo estable entre noviembre y febrero, sin mostrar variaciones estadísticamente significativas en estos meses. Entre febrero y marzo se produjo una bajada significativa de los niveles hormonales que continuaron decreciendo hasta alcanzar valores basales en el mes de mayo.

Todos los grupos alimentados con dietas artificiales presentaron un comportamiento distinto al grupo control, puesto que en todos ellos la concentración plasmática de E2 se elevó de un modo significativo ($p < 0.05$) en noviembre y diciembre, a partir de los niveles basales de octubre. En el grupo A este incremento fue más acentuado que en el resto de los grupos, pero la concentración plasmática de E2 descendió significativamente ($p < 0.05$) en el mes siguiente, manteniéndose sin variación hasta febrero. En los otros tres grupos, B, C y D, los niveles alcanzados en diciembre se estabilizaron y se mantuvieron hasta el mes de febrero. En el mes de marzo se observó un descenso

significativo de la concentración de E2, que en el grupo D alcanzó valores basales en este mes. En los otros grupos se llegó a los niveles basales en el mes de abril.

Como resultado de la distinta variación observada en los niveles plasmáticos de E2 aparecieron una serie de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales. A consecuencia de la moderada elevación de los niveles observada en el grupo control, éste presentó valores significativamente menores ($p < 0.05$) que los de los grupos A, B y D en el mes de diciembre. En este mismo mes, el grupo C también mostró una concentración de E2 significativamente menor ($p < 0.05$) que la del grupo A. En el mes de enero el grupo control siguió presentando unos niveles de E2 que fueron significativamente menores ($p < 0.05$) que los de los grupos B y C.

Niveles plasmáticos de vitelogenina.

Los niveles de Vg plasmática detectados a lo largo del primer año experimental mostraron un perfil similar en las hembras de los cinco grupos estudiados. En el mes de octubre aparecieron en todos los casos niveles basales, que se incrementaron bruscamente en los meses siguientes de modo que, tal y como se muestra en la figura III.4, las concentraciones observadas fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) en meses consecutivos. En los grupos que recibieron una dieta artificial en diciembre o enero se alcanzaron unos valores de aproximadamente 1 mg/ml o mayores, que ya no fueron significativamente diferentes de los observados en meses posteriores, hasta marzo. En el caso del grupo control, tras una subida muy brusca en el mes de noviembre (desde prácticamente 0 hasta 1.3 mg/ml) la concentración de Vg plasmática se mantuvo hasta enero, pero en febrero experimentó una nueva elevación (llegando hasta 2.3 mg/ml), manteniéndose los niveles alcanzados hasta el mes de marzo. En todos los grupos se

detectó una disminución significativa ($p < 0.05$) de la cantidad de Vg en los meses de abril y mayo. En este último mes se alcanzaron niveles basales, casi iguales a 0 que ya se mantuvieron en los meses siguientes.

Los niveles de Vg en el grupo control, en consonancia con la fuerte elevación registrada en noviembre y diciembre, resultaron ser, en estos meses, significativamente más elevados ($p < 0.05$) que en el resto de los grupos. En enero no se detectaron diferencias entre grupos. La nueva elevación sufrida por el grupo control, en el mes de febrero, hizo que la concentración de Vg fuera significativamente mayor en este grupo ($p < 0.05$) que en los grupos A, B y C. En el mes de marzo, el valor de Vg observado en el grupo control también fue significativamente más alto ($p < 0.05$) que en el grupo A.

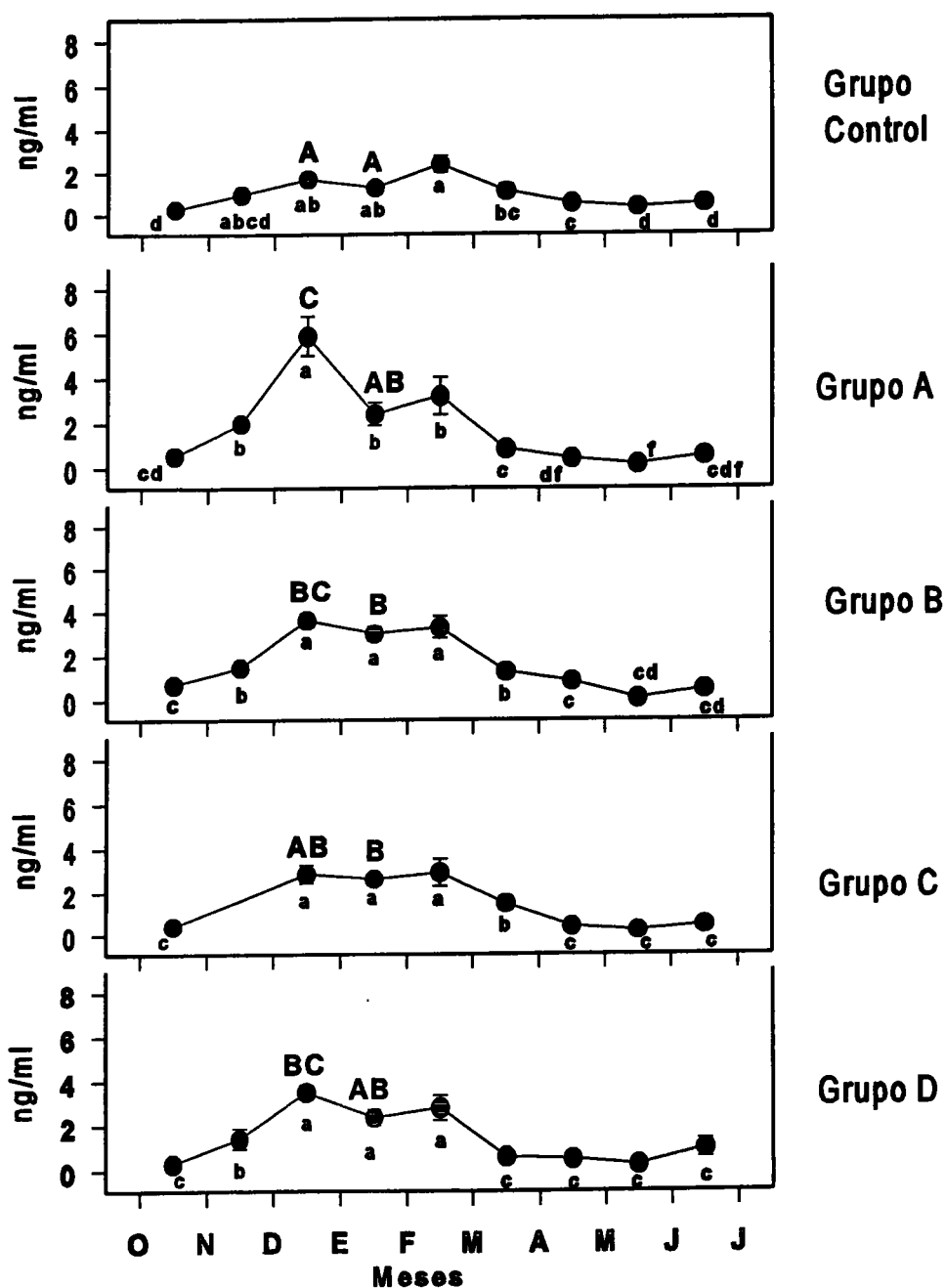


Figura III.3.- Niveles plasmáticos de 17β-estradiol en las hembras de los diferentes grupos experimentales a lo largo del primer período reproductor estudiado. Se representan las medias de 5 a 9 muestras ± SEM. Letras mayúsculas o minúsculas diferentes señalan, respectivamente, diferencias significativas entre grupos dentro de un mismo mes, o entre meses, dentro de un mismo grupo ($p < 0.05$).

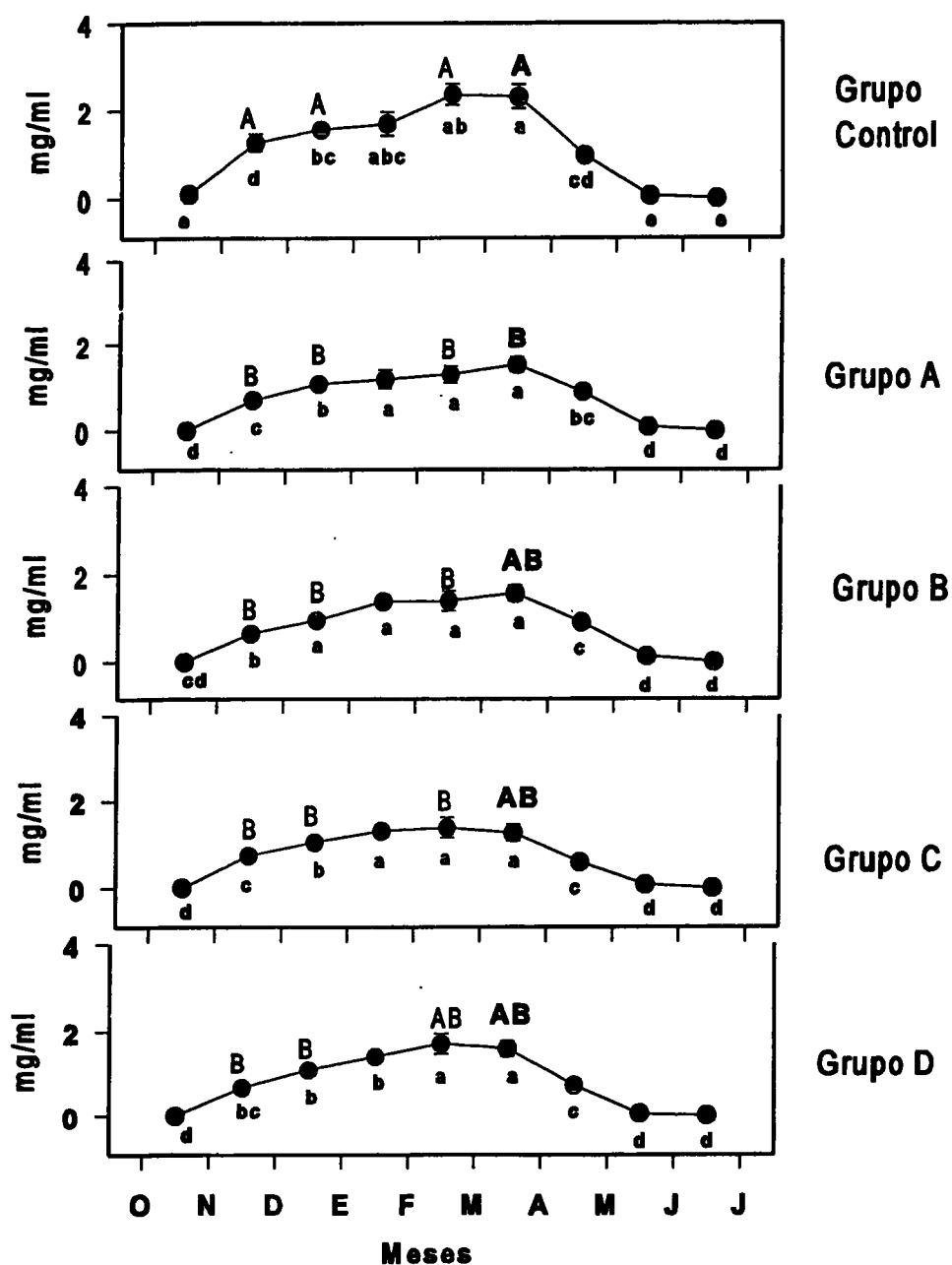


Figura III.4.- Niveles plasmáticos de vitelogenina detectados en las hembras de los diferentes grupos experimentales a lo largo del primer período reproductor estudiado. Se representan las medias de 5 a 9 muestras \pm SEM. Letras mayúsculas diferentes indican la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupo dentro de un mes. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre meses dentro de un mismo grupo ($p < 0.05$).

4.- DISCUSIÓN

4.1.- Resultados de puesta.

La reducción de la ración en los grupos alimentados con las dietas artificiales no provocó un claro descenso de la FT y de la FR con respecto a los grupos alimentados a ración completa. De hecho, en la segunda época de puesta, el grupo C (15% 1/4) mostró la FT y la FR más altas de todas las recogidas. En la lubina, igual que en otras especies de peces, la fecundidad está estrechamente relacionada con el diámetro del huevo y con el tamaño del animal (Bromage *et al.*, 1992). La disminución del diámetro del huevo o bien un aumento del tamaño del animal están asociados con un incremento de la fecundidad (Cerdá *et al.*, 1993). Sin embargo, el elevado valor de fecundidad observado en el segundo año en el grupo C no puede relacionarse con un mayor tamaño de las hembras, ya que mostraron un peso similar al observado en los otros grupos. Del mismo modo, tampoco puede asociarse el aumento de fecundidad con una disminución del diámetro del huevo, que aumentó ligeramente con respecto al año anterior. El elevado valor de fecundidad obtenido parece ser debido a algún factor determinado genéticamente en alguna de las hembras de ese grupo ya que, de hecho, las características genéticas de los animales pueden jugar un papel muy importante en la determinación de la fecundidad (Bromage *et al.*, 1992).

Una disminución de la fecundidad total asociada con restricciones de la dieta se ha observado en especies como el bacalao (Kjesbu, 1988), la trucha arcoiris (Bromage *et al.*, 1992), el *Melanogrammus aeglefinus* (Hislop *et al.*, 1978) o la platija (Horwood *et al.*, 1989). Sin embargo en el presente experimento la reducción de la ración no puede relacionarse de una manera clara con un descenso de la fecundidad. Por otra parte

tampoco se observó ningún efecto de la reducción de la ración sobre el crecimiento de las hembras ya que no aparecieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos experimentales ni en el peso ni en la talla de las hembras a lo largo del primer año de experimentación. Del mismo modo, el peso en postpuesta de las hembras no fue significativamente ($p < 0.05$) diferente de unos grupos a otros. La reducción de la ración tampoco afectó al diámetro de los huevos o de la gota de grasa, que no mostraron diferencias significativas entre grupos. De una manera similar, en un experimento realizado previamente en lubina (Cerdá *et al.*, 1994a), la reducción de la ración hasta un 0.5% de la biomasa no llegó a afectar a la fecundidad ni al peso de las hembras o al diámetro de los huevos, lo que sugirió que las condiciones de restricción de la ración no habían sido lo suficientemente estrictas. En el presente experimento, la ración se redujo al 0.3% de la biomasa únicamente en los meses de invierno, cuando la ingesta de alimento por los animales es muy baja. Sin embargo, en los meses de verano se mantuvo una ración similar a la del experimento de Cerdá *et al.* (1994a). Probablemente en esos meses los animales fueron capaces de almacenar las suficientes reservas como para llevar a cabo el proceso de reproducción normalmente, sin que, incluso, se llegara a observar ningún detrimento del peso de las hembras en postpuesta.

La reducción de la ración tampoco afectó a la calidad de las puestas. Si bien los porcentajes de eclosión fueron demasiado bajos como para establecer comparaciones entre grupos, los porcentajes de huevos viables fueron, de hecho, más altos en los grupos alimentados a ración reducida que en sus homólogos alimentados a ración completa. Estos datos son similares a los observados por Cerdá *et al.* (1994a) en la lubina y confirman los obtenidos en otras especies de peces en las que la cantidad de alimento recibido por los

reproductores tampoco parece tener un efecto claro sobre el tamaño de los huevos, su peso o su composición (revisado por Kjorsvik, 1990).

La FT aumentó en todos los grupos en años consecutivos. En la lubina, se han descrito previamente incrementos similares (Cerdá *et al.*, 1995). Este efecto es debido, probablemente, al aumento en el tamaño de las hembras que se produce con la edad, mecanismo que parece actuar en todas las especies de peces (Bromage *et al.*, 1995). Sin embargo, y a pesar del incremento de la FT, la FR disminuyó en todos los grupos experimentales, con a excepción ya comentada del grupo C. La disminución de la FR está asociada con un aumento del tamaño de las hembras debido al crecimiento. Este fenómeno, ha sido también descrito en trucha arcoiris y parece operar, de modo similar, en otras especies de peces (Bromage *et al.*, 1995). Además, en el presente experimento, otro factor que parece estar relacionado con la reducción de la FR en las dos épocas de puesta consecutivas es el incremento en el diámetro de los huevos (Tabla III.4) observado en todos los grupos excepto en el A.

La calidad de la dieta sí que tuvo un efecto claro sobre los resultados de puesta. El grupo alimentado con una dieta natural mostró unos valores de fecundidad y unas tasas de viabilidad y de eclosión claramente más elevadas que las de los otros grupos experimentales. Cerdá *et al.*, (1994a, 1995) observaron que en la lubina un porcentaje de proteínas en las dietas artificiales superior al 50% no tenía ningún efecto negativo sobre la calidad de las puestas, de modo que la baja calidad de los huevos encontrada en ocasiones debía ser ocasionada por otros factores nutricionales. Las dietas artificiales utilizadas en nuestro experimento presentaron una concentración de proteínas lo suficientemente elevada como para que los malos resultados de puesta obtenidos no

puedan atribuirse a una deficiencia proteica en las dietas consumidas por los reproductores. Por otra parte, las variaciones en la cantidad de lípidos ingeridos en los grupos alimentados con dietas artificiales no estuvo asociada con ninguna mejora en la calidad de las puestas.

Por lo tanto, las diferencias observadas en los resultados de puesta entre el grupo alimentado con una dieta natural y los grupos que recibieron las dietas artificiales deben de estar ocasionadas por la propia composición bioquímica de los nutrientes básicos presentes en las dietas o por algún tipo de micronutriente, o por el efecto combinado de ambos factores. Hasta el momento, no se ha observado una clara influencia del contenido vitamínico o en minerales de las dietas de los reproductores sobre el contenido vitamínico y las tasas de viabilidad y de eclosión de los huevos (Revisado por Kjorsvik, 1990). Recientemente, en varios experimentos realizados en trucha arcoiris en los que se varió el contenido de ácido ascórbico de las dietas, no aparecieron diferencias significativas en las tasas de eclosión de los huevos de los diferentes grupos experimentales (Blom y Dabrowski, 1994; Dabrowski y Blom, 1995). Sin embargo, la composición en ácidos grasos de los lípidos de la dieta ejerce una profunda influencia sobre la composición en ácidos grasos de los huevos y sobre su calidad (Revisado por Luquet y Watanabe, 1986; Kjorsvik, 1990; March, 1993; Sargent, 1995; Sargent *et al.*, 1995).

La dieta natural presentó un perfil de ácidos grasos muy distinto del de las dietas artificiales. La cantidad total de ácidos grasos de la serie n-3 así como las relaciones DHA:EPA (DHA, 22:6 n-3; EPA, 20:5 n-3) y AA:EPA (AA, 20:4 n-6) mostraron valores mucho más elevados en la boga que en los piensos. Para que el proceso de la reproducción se desarrolle normalmente en los peces marinos es necesario que los PUFA sean

suministrados en cantidades y proporciones adecuadas, particularmente de los de la serie n-3 (revisado por March *et al.*, 1993; Sargent *et al.*, 1989; Sargent 1995; Sargent *et al.*, 1995). Por lo tanto, es posible que las diferencias observadas entre la dieta natural y las dietas artificiales, particularmente en la cantidad de ácidos grasos de la serie n-3, así como en las proporciones existentes entre estos ácidos grasos, sean la causa de las alteraciones observadas en los resultados de puesta. Con el fin de profundizar en estas cuestiones se analizó la composición de la fracción lipídica de los huevos. Los resultados obtenidos permitieron establecer una relación entre la composición lipídica de las dietas, la de los huevos y la calidad de estos últimos.

El incremento en el porcentaje de eclosión observado en años consecutivos en el grupo control fue en parte debido a un problema metodológico. Al inicio del primer período de puesta, durante aproximadamente un mes, los huevos eran recogidos y se mantenían en una probeta durante media hora para observar la fracción de huevos flotantes y la de huevos sumergidos. A partir de la fracción flotante se recogían varios mililitros de huevos que se llevaban a cubiletes para observar las tasas de eclosión (Ver Capítulo II, Material y métodos, sección 4.2). Los porcentajes de eclosión fueron muy bajos. Al medir la cantidad de oxígeno se observó que era muy baja entre la fracción de huevos flotantes, hecho que, probablemente, afectaba de modo negativo a los huevos. Para solucionar este problema los huevos utilizados para estudiar las tasas de eclosión se tomaron de inmediato, sin esperar a que se decantara la totalidad de huevos viables. No obstante las bajas tasas de eclosión no son sólo atribuibles a este hecho puesto que cuando el problema se subsanó siguieron resultando menores que al año siguiente. El primer ciclo reproductor considerado en este experimento era también el primer período de puesta de estos

animales. Debido a ello es posible que las bajas tasas de eclosión observadas también se hallen asociadas con un desarrollo todavía insuficiente de las hembras.

4.2.- Clases de lípidos presentes en los huevos.

Los porcentajes de lípidos neutros (LN) y de fosfolípidos (FL) observados en los huevos de lubina son semejantes a los de otras especies de aguas cálidas como el pargo japonés (Watanabe *et al.*, 1984d, f) o la dorada (Mourente y Odriozola, 1990). En los huevos de las tres especies se observaron unas cantidades mayores de LN que de FL, lo cual contrasta con los huevos de especies de aguas frías como el bacalao (Tocher y Sargent, 1984) o el fletán atlántico, *Hippoglossus hippoglossus* (Falk Petersen *et al.*, 1989; Bruce *et al.*, 1993), que contienen, aproximadamente, el doble de FL que de LN. Sin embargo, el contenido de LN de los huevos de lubina, aproximadamente cinco veces mayor que el de FL, resulta ser inusualmente alto cuando se compara con el del pargo japonés o la dorada.

Las clases de FL analizadas presentaron un orden de abundancia similar al de los huevos de otras especies de peces, tanto de agua dulce como de agua salada (revisado por Henderson y Tocher, 1987). Así, en todos los casos, la fosfatidilcolina fue el fosfolípido más frecuente, seguido por la fosfatidiletanolamina. El resto de los lípidos polares analizados, es decir la fosfatidilserina, el fosfatidilinositol y la esfingomiélna, mostraron unos porcentajes mucho más bajos.

Tanto en la lubina (Cerdá *et al.*, 1994a) como en otras especies de peces (Takeuchi *et al.*, 1981; Watanabe *et al.*, 1984e; Springate *et al.*, 1985; Knox *et al.*, 1988; Washburn *et al.*, 1990) se ha observado que las alteraciones en la composición de la dieta

tienen una influencia muy limitada sobre los porcentajes de proteínas, lípidos o hidratos de carbono presentes en los huevos. En el presente experimento, además, la alteración de los niveles de lípidos o de los perfiles de ácidos grasos de la dieta no ocasionó la aparición de diferencias entre los grupos experimentales en el contenido de lípidos ni en el de las clases lipídicas analizadas. De un modo similar, en otras especies como la dorada (Mourente y Odriozola, 1990) o el pargo japonés (Watanabe *et al.*, 1984d, f) la administración a los reproductores de distintas cantidades de ácidos grasos a través de la dieta no originó la aparición de diferencias en el contenido total de lípidos neutros o polares. En la dorada, la alteración del contenido de ácidos grasos de la serie n-3 y de las proporciones DHA:EPA en los nauplios de artemia con los que se alimentó a las larvas no provocó diferencias en el contenido de las clases de fosfolípidos analizadas (Koven *et al.*, 1992). También en la dorada, dietas con distintas cantidades de ácidos grasos administradas a los reproductores no dieron lugar a alteraciones en las cantidades de fosfolípidos de los huevos producidos (Fernández-Palacios *et al.*, 1995). En el presente experimento, la falta de diferencias en el contenido lipídico de los huevos procedentes del grupo control con respecto a los de los grupos alimentados con dietas artificiales sugiere que la lubina, de modo similar a otras especies de peces, es capaz de aprovechar las reservas lipídicas de que dispone y de desviarlas para producir huevos que posean la cantidad suficiente de recursos como para que el desarrollo embrionario se produzca con normalidad. Por lo tanto, las distintas calidades observadas entre los huevos de los diferentes grupos no parece que sean debidas a una falta cuantitativa de reservas, sino a una inadecuada composición de los recursos disponibles para el desarrollo embrionario, siendo particularmente importante, tal y como se ha señalado en la sección anterior (Sección 4.1 del presente capítulo) la composición en ácidos grasos de la fracción lipídica de los huevos.

4.3.- Contenido en ácidos grasos de los huevos.

Los ácidos grasos más abundantes en los huevos de lubina recogidos en los diferentes grupos experimentales, es decir 18:1, 16:1, 16:0, y DHA, fueron los mismos que se observaron en los huevos de otras especies marinas como el fletán atlántico (Falk Petersen *et al.*, 1989; Bruce *et al.*, 1993) o la dorada (Izquierdo *et al.*, 1989; Mourente y Odriozola, 1990a; Fernández Palacios *et al.*, 1995).

La composición en ácidos grasos de los huevos se vio influenciada claramente por la de las dietas. Así, el mayor porcentaje en AA y DHA de la dieta natural se reflejó en un mayor porcentaje de estos mismos ácidos grasos en los huevos procedentes del grupo control. El ácido linoleico, 18:2 n-6, característico de los aceites vegetales y los monoeno de 20 y 22 átomos de carbono, que se presentan en un elevado porcentaje en las dietas artificiales, también aparecieron en una proporción mucho más elevada en los huevos de los grupos alimentados con pienso que en los del grupo alimentado con boga. Este mismo efecto ha sido observado en el pargo japonés (Revisado por Watanabe y Kiron, 1995) y en la dorada (Zohar *et al.*, 1995) corroborando la idea de que cambios en la composición de la dieta materna pueden afectar la composición bioquímica de los huevos y, con ello, a su viabilidad.

Por otro lado, hay que señalar que la cantidad total de lípidos ingerida por los reproductores no tuvo ningún efecto sobre la composición en ácidos grasos de los huevos, ya que no se observan diferencias entre los grupos alimentados a ración reducida y los que recibieron la ración completa, ni tampoco entre los grupos alimentados con la dieta del 9% de lípidos y aquellos otros alimentados con una dieta con el 15% de lípidos.

Los ácidos grasos de la serie n-3, en particular los HUFA, es decir el DHA y el EPA, son muy importantes en los peces para el mantenimiento de la fluidez y permeabilidad de la membrana, así como para el normal funcionamiento de las enzimas ligadas a membrana (Bell *et al.*, 1986). Ahora bien, las especies marinas no son capaces de sintetizar ácido linolénico, 18:3 n-3, y tampoco pueden alargar y desaturar este ácido para formar el DHA y el EPA, por lo que estos tres ácidos grasos han de ser tomados en la dieta y resultan esenciales para los peces marinos (Sargent *et al.*, 1989).

La importancia de los PUFA de la serie n-3 se ha evidenciado en diversos experimentos llevados a cabo por Watanabe y sus colaboradores en pargo japonés (Revisado por Watanabe y Kiron, 1995). En estas experiencias se alteró la composición en ácidos grasos de las dietas administradas a los reproductores durante la época de prepuerta y se observó su efecto sobre la viabilidad de huevos y larvas. Se llegó a la conclusión de que la calidad de los huevos y larvas estaba directamente relacionada con su contenido en ácidos grasos de la serie n-3, en particular DHA y EPA, y con la relación n-3/n-6 observada. Sin embargo, en dorada (Fernández-Palacios *et al.*, 1995), no apareció una correlación entre el contenido de ácidos grasos de la serie n-3 de los huevos y su calidad, ya que para concentraciones altas de los ácidos grasos de la serie n-3 se observaba una reducción de las tasas de eclosión. Este hecho indica que el contenido total de ácidos grasos de la serie n-3 en los huevos no puede ser tomado como un criterio único de su viabilidad.

Además de las cantidades absolutas de DHA y EPA, así como de otros ácidos grasos que resulten esenciales, hay un factor que se ha revelado como sumamente importante en la determinación de la calidad de los huevos en los teleósteos marinos: las

proporciones relativas de DHA respecto a EPA y de los PUFA de la serie n-3 con respecto a los de la serie n-6 (relación n-3:n-6; Sargent *et al.*, 1995). En las larvas de la dorada (Koven *et al.*, 1993), del pargo japonés (Watanabe *et al.*, 1989a) y del *Pseudocaranx dentex* (Watanabe *et al.*, 1989b) se observó una mayor asimilación del DHA sobre el EPA en los lípidos. Éste hecho iba acompañado de una buena correlación con el crecimiento, mostrando que el DHA puede tener un mayor valor fisiológico. La administración de una dieta deficiente en ácidos grasos de la serie n-3 en trucha arcoiris, durante los tres últimos meses de vitelogénesis, previos al inicio de las puestas, provocó una clara disminución en el contenido de EPA de los huevos, mientras que el efecto sobre el contenido en DHA fue muy moderado (Frémont *et al.*, 1984). En larvas de dorada sometidas a ayuno el DHA se mantuvo sobre el EPA en la fracción fosfolipídica (Koven *et al.*, 1989). La mayor tasa de retención de DHA, que no fue consumido para la obtención de energía, se observó en larvas de *Solea senegalensis* sometidas a ayuno (Mourente y Vázquez, 1996). La importancia del DHA se puso también de manifiesto en el hecho de que en los huevos de los peces marinos la cantidad de DHA es claramente mayor que la de EPA en un amplio número de especies (Watanabe, 1993).

En el cerebro de los peces los lípidos constituyen hasta el 40% de la materia seca. Aproximadamente el 70% del total de los lípidos son fosfolípidos y de estos el 40% es fosfatidiletanolamina (Mourente *et al.*, 1991). El DHA puede llegar a ser el 40% del total de los ácidos grasos de la fosfatidiletanolamina y la especie molecular di-DHA-fosfatidiletanolamina llega a ser el 15% del total de especies moleculares de la fosfatidiletanolamina (Bell y Dick, 1991). En la retina de los peces las especies moleculares di-DHA pueden ser hasta el 40% del total de la fosfatidiletanolamina (Bell y Dick, 1991).

Todos estos hechos muestran la necesidad de un suministro adecuado de DHA para el normal desarrollo de la retina y del cerebro en las larvas de los peces.

La causa principal que hace que el DHA juegue un papel fundamental en el mantenimiento de las funciones celulares proviene de su estructura. Al aumentar el número de dobles enlaces en la cadena carbonada de un ácido graso se produce una contracción de la molécula que da lugar a una conformación extremadamente compacta (Sargent *et al.*, 1993). Este efecto es máximo en el caso del DHA, 22:6 n-3, cuya conformación de mínima energía corresponde a estructura helicoidal compacta que hace que su longitud total sea incluso menor que la de un ácido saturado como el 18:0 (Applegate y Glomsett, 1986). Probablemente, este ácido graso proporciona la estabilidad y fluidez necesarias a las membranas celulares de la retina o del cerebro durante los rápidos cambios conformacionales que experimentan las proteínas en ellas incluidas en el desarrollo de sus funciones.

En el caso concreto de la lubina, Cerdá *et al.* (1995) observaron una marcada reducción en la supervivencia de los huevos provenientes de los reproductores alimentados con dietas artificiales, al compararlos con los de animales alimentados con una dieta natural consistente en boga troceada. La boga troceada poseía una mayor cantidad de PUFA de la serie n-3, especialmente DHA, así como una mayor proporción de ácidos grasos de la serie n-3, con respecto a los de la serie n-6, que las dietas artificiales. En el presente experimento, en ambas épocas de puesta apareció una relación directa entre la proporción DHA:EPA de los huevos y su calidad. Puesto que el DHA y el EPA compiten por las mismas enzimas durante la formación de los fosfolípidos, y dado el papel tan importante jugado por el DHA en el mantenimiento de las funciones celulares, es muy

importante que exista una proporción adecuada de estos dos ácidos grasos. Por lo tanto, una relación DHA:EPA adecuada es fundamental en la determinación de la calidad del huevo de la lubina.

Por otra parte, el grupo control mostró un claro incremento de las tasas de viabilidad y de eclosión en la segunda época de puesta con respecto a la primera. Este fenómeno estuvo asociado con una elevación de la cantidad de ácidos grasos totales de la serie n-3 y de la proporción n-3:n-6, lo cual muestra la importancia de estas variables, junto con la relación DHA:EPA, en la determinación de la calidad de los huevos.

La necesidad de un suplemento adecuado, a través de la dieta, de los ácidos grasos de la serie n-3 está, actualmente, bien establecida en peces. Sin embargo, no se ha puesto mucho énfasis en el estudio de los requerimientos de ácidos grasos de la serie n-6. Entre estos ácidos grasos, en particular el AA resulta sumamente importante por su actuación como precursor de los eicosanoides. La importancia de estas sustancias radica en el papel fundamental que juegan en el mantenimiento de las funciones fisiológicas de un organismo, ya que ejercen un papel básico en el desarrollo de la respuesta inmune y de las reacciones inflamatorias (Sargent *et al.*, 1995), en la secreción de gonadotrofinas a nivel de la pituitaria (Eberhardt y Kiesel., 1992), en la esteroideogénesis gonadal (Mercure y Van der Kraak, 1995 a; 1996) y en el control de los procesos de maduración oocitaria y de ovulación (Murdoch *et al.*, 1993).

El AA sirve como precursor, de entre todo el conjunto de los eicosanoides, de los prostanooides de la serie 2 y de los leucotrienos de la serie 4. Otro ácido graso de la serie n-3, el EPA, actúa, por su parte, como precursor de los prostanooides de la serie

3 y de los leucotrienos de la serie 5. Éstas últimas sustancias son, sin embargo, biológicamente menos activas que las derivadas del AA (Sargent *et al.*, 1995). Ambos ácidos grasos, el AA y el EPA, compiten por los mismos enzimas en la producción de los eicosanoides. Como resultado, una proporción inadecuada entre ellos puede llevar a una inhibición competitiva de la síntesis de los eicosanoides derivados del AA y a una depresión de las funciones celulares ejercidas por estas sustancias.

En juveniles de rodaballo, la administración de dietas en las que se varió el contenido de AA llevó a una alteración del contenido de AA en los fosfolípidos que estuvo asociada con cambios en la producción de prostaglandinas y, por lo tanto, podría estar ejerciendo una profunda influencia en el mantenimiento de las funciones fisiológicas básicas del pez (Bell *et al.*, 1995). En el presente experimento se observa que la cantidad de AA en los huevos está directamente relacionada con la observada en la dieta, corroborando la esencialidad de este ácido graso. Los mejores resultados de puesta, correspondientes al grupo control, también están asociados con el mayor contenido de AA en los huevos y la mayor proporción AA:EPA. Todo ello indica que la cantidad total de AA y la relación AA:EPA juegan un papel fundamental en el desarrollo embrionario.

Los resultados obtenidos en el presente experimento, referentes al contenido de ácidos grasos de la dieta y de los huevos, indican que la proporción relativa de ácidos grasos administrados a través de la dieta, en particular las relaciones n-3:n-6, AA:EPA y DHA:EPA van a verse reflejadas en el contenido lipídico de los huevos y van a ejercer una profunda influencia en la formación del oocito y en el posterior desarrollo embrionario y, por lo tanto, en las tasas de viabilidad y de eclosión de los huevos. Una adecuada

proporción entre estos ácidos grasos en las dietas administradas a los reproductores resulta esencial para la obtención de puestas de elevada calidad.

4.4.- Niveles plasmáticos de 17 β -estradiol y de vitelogenina.

Niveles plasmáticos de 17 β -estradiol.

Perfil anual de 17 β -estradiol.

Los niveles plasmáticos de E2 comenzaron a elevarse en el mes de noviembre en todos los grupos, de modo paralelo al incremento en la concentración plasmática de vitelogenina. Este hecho denota el papel fundamental jugado por este esteroide en la estimulación de la síntesis de la Vg en lubina (Mañanos *et al.*, 1994a, b), de un modo similar a otras especies de vertebrados ovíparos (Van Bohemen *et al.*, 1982; Mommsen y Walsh, 1988).

En las especies de salmónidos con un ovario de tipo sincrono, en las que la ovulación y la puesta ocurren una única vez al año o, incluso, en la vida, los niveles plasmáticos de E2 en las hembras se incrementan durante la vitelogénesis para alcanzar la máxima concentración justo antes o en el inicio de la época de puesta (Revisado por Pankhurst y Carragher, 1991). En estas especies se observa un fuerte descenso en la concentración plasmática de E2 antes de la ovulación (Scott *et al.*, 1983; Kagawa *et al.*, 1983; Truscott *et al.*, 1986). En algunas especies de ciprínidos, como el pez rojo, que presentan un ovario de tipo asincrono y ovulan varias veces dentro de un mismo período de puesta, los niveles de E2 se elevan coincidiendo con la vitelogénesis y se produce un pico en sus niveles en el momento de la ovulación, manteniéndose elevados durante unos días después (Kobayashi *et al.*, 1988). Estos niveles elevados de E2, que aparecen después

de la ovulación, pueden estar jugando un papel importante en la inducción de la síntesis de Vg para el próximo grupo de oocitos que ovulen. De hecho, en otras especies es posible observar varios picos de E2 a lo largo del período de puesta (rodeo, *Acheilognathus rhombea*, Shimizu *et al.*, 1985; gobio, *Tridentiger obscurus*, Kaneko *et al.*, 1986).

La lubina presenta un ovario del tipo sincrono por grupos (Mayer *et al.*, 1993). En esta clase de ovario, el proceso de vitelogénesis se solapa con el de ovulación y puesta y, por lo tanto, los niveles plasmáticos de E2 se han de mantener elevados a lo largo de toda la época de puesta, debido al papel fundamental jugado por esta hormona en la estimulación de la síntesis de Vg a nivel hepático. Los perfiles observados en el presente experimento son acordes con este planteamiento y similares a los observados previamente (Prat *et al.*, 1990; Cerda *et al.*, 1994a). En otra especie de Moronidae, *Morone saxatilis*, que presenta el mismo tipo de desarrollo ovárico se describió una evolución de los niveles plasmáticos de E2 igual a la observada en la lubina (Blythe *et al.*, 1994).

Diferencias entre grupos en los niveles de 17 β -estradiol.

La concentración plasmática de E2 en el grupo control se mantuvo a lo largo de toda la época de puesta por debajo de la concentración observada en los demás grupos experimentales, alcanzándose diferencias claras que resultaron ser estadísticamente significativas ($p < 0.05$). La causa de las diferencias existentes en los niveles plasmáticos de E2 entre el grupo control y los grupos alimentados con dietas artificiales es difícil de establecer. En un experimento previo (Cerda *et al.*, 1994a), también se observó una clara reducción de los niveles plasmáticos de E2 en lubinas alimentadas con boga a ración

reducida, con respecto a otro grupo alimentado a ración completa. Cerdá *et al.*, (1994a) achacaron los bajos niveles de E2 del grupo alimentado a ración reducida a una deficiencia en la disponibilidad de colesterol ya que la esteroideogénesis es dependiente de un aporte adecuado de esta sustancia (Nagahama, 1983). Una explicación semejante podría ser válida para la presente experiencia, ya que el grupo control ingirió una cantidad menor de lípidos, en términos absolutos, que los grupos alimentados con una dieta artificial

Sin embargo estas diferencias no afectaron a la vitelogénesis o al proceso reproductor en general ya que los bajos niveles de E2 coincidieron con los niveles más elevados de Vg plasmática y aparecen en el grupo con mejores resultados de puestas. Todo esto indica que niveles bajos de E2 en el plasma son suficientes para estimular de una manera sostenida la síntesis de Vg, permitiendo el aporte adecuado de reservas para el desarrollo oocitario (Blythe *et al.*, 1994).

El hecho de que en el grupo control, con los niveles más bajos de E2, se produzcan los mejores resultados de puesta sugiere que estos valores son fisiológicamente normales y que ha de existir algún factor en los grupos alimentados con dietas artificiales que provoca una elevación anormal de la concentración plasmática de esta hormona. Al observar los perfiles en ácidos grasos de las dietas artificiales y de la dieta natural se observa que la diferencia más importante aparece en las concentraciones de los ácidos grasos monoenoicos de 20 y 22 átomos de carbono, que en las dietas artificiales se presentan en concentraciones hasta 10 veces más elevadas que en la dieta natural. Hay una serie de indicios que apuntan hacia el hecho de que sean las elevadas concentraciones de estos ácidos grasos las causantes de la elevación de los niveles de E2 en los grupos alimentados con dietas artificiales. En mamíferos se ha establecido de una manera clara

que, en el hígado, la β -oxidación de los ácidos grasos tiene lugar no sólo en las mitocondrias sino también en los peroxisomas (Masters y Crane, 1984). Estos orgánulos celulares derivan del retículo endoplasmático y, al menos una parte de las actividades enzimáticas asociadas a membrana presentes en el retículo endoplasmático, también aparecen en los peroxisomas (Berkaloff *et al.*, 1981). En una serie de artículos Henderson y Sargent (1984, 1985) y Henderson *et al.*, (1982) observaron que en el hígado de truchas arco iris alimentadas con un aceite de pescado parcialmente hidrogenado la actividad oxidativa peroxisomal era el doble de la observada en animales que recibieron un aceite de pescado normal. El aceite de pescado parcialmente hidrogenado presenta una mayor cantidad de ácidos erúcido (20:1 n-9) y cetoleico (22:1 n-11) que el aceite de pescado normal, así como una mayor proporción de estos ácidos con respecto a los PUFA y una mayor presencia de isómeros trans de estos ácidos grasos. Debido a ello los autores sugirieron que la situación fisiológica anormal causada por estos ácidos grasos sería la responsable de la proliferación de los peroxisomas.

Además de estos ácidos grasos monoenoicos de cadena larga hay diversos factores que pueden provocar un aumento de actividad peroxisomal, por ejemplo la administración de drogas hipolipemiantes (Lazarow 1977) o de algunas sustancias utilizadas como plastificantes, ftalatos (Osumi y Hashimoto, 1978). La proliferación peroxisomal causada por estas sustancias está relacionada con el metabolismo de las hormonas sexuales. Así, por ejemplo, en rata adulta la adición de fármacos hipolipemiantes, como el clofibrato, a la dieta no produce la proliferación de peroxisomas hepáticos en las ratas macho castradas tratadas con E2 ni en hembras normales, que tienen una producción endógena de E2. Por el contrario en hembras castradas tratadas con testosterona y en machos normales, que producen testosterona, el

clofibrato provoca esta proliferación (Lazarow, 1977). Este tipo de regulación es similar al de retroalimentación negativa causado, en ocasiones, sobre un enzima por el producto de la reacción, en este caso sería el E2, o al de regulación positiva ejercido por el sustrato de la reacción, en este caso la testosterona.

Otras sustancias que provocan la proliferación peroxisomal, como los ftalatos, se ha demostrado recientemente que, además, tienen actividad estrogénica (Jobling *et al.*, 1995). Si bien se ha observado que esta actividad es ejercida al interaccionar estas sustancias con el receptor del E2 no se descarta que también puedan inducir un aumento de la síntesis de este esteroide.

La asociación de la proliferación peroxisomal con la elevación de los niveles de E2 se puede explicar teniendo en cuenta que los peroxisomas se producen a partir de las membranas del retículo endoplasmático liso. Como resultado hay una serie de enzimas que son comunes a la membrana del retículo endoplasmático y a la de los peroxisomas. Entre estos enzimas se encuentran las reductasas dependientes del citocromo P450 que intervienen activamente en el metabolismo de esteroides. Recientemente se ha observado que los peroxisomas también aparecen en las células foliculares de los teleósteos y que, además, intervienen activamente en el proceso de esteroideogénesis (Mercure y Van der Kraak, 1995 b). La situación fisiológica anormal causada por una fuerte concentración de los ácidos grasos 20:1 n-9 y 22:1 n-11 podría ocasionar una proliferación peroxisomal en las células de la granulosa similar a la que se produce a nivel hepático, que llevara asociado un aumento de la actividad aromatasa encargada de la conversión de testosterona a estradiol. El resultado final sería una elevación de los niveles de E2.

Niveles plasmáticos de vitelogenina.

Los niveles de vitelogenina plasmática presentaron todavía a mediados de octubre valores basales, detectándose una clara elevación en noviembre, aproximadamente un mes antes del inicio de la época de puesta. Los niveles de Vg continuaron elevándose hasta alcanzar las máximas concentraciones durante la época de puesta. El perfil obtenido es muy similar al observado previamente en lubina. Mañánós *et al.* (1994b) encontraron en lubina alimentada con dietas naturales un fuerte incremento de la concentración de Vg plasmática al inicio de la época de puesta, llegando hasta 3 mg/ml, si bien en el resto de los meses los valores fueron similares a los encontrados en el presente experimento. Por su parte, Cerdá *et al.* (1994a), también en lubina alimentada con dietas naturales a diferentes raciones, encontraron unos perfiles similares a los aquí observados, aunque los máximos alcanzados en el mes de marzo fueron de unos 5 mg/ml.

Los niveles plasmáticos de Vg se vieron claramente afectados por el tipo de dieta administrado a los reproductores, presentando los animales que tomaron la dieta natural valores significativamente mayores que los de aquellos que fueron alimentados con dietas artificiales. En un experimento llevado a cabo en trucha (Frémont *et al.*, 1984) se observó que dietas deficientes en ácidos grasos de la serie n-3 provocaban una disminución significativa de los niveles de Vg plasmática. Además, en el mismo experimento, se vio que el DHA era incorporado a la Vg con preferencia sobre el EPA. En cuatro especies de teleósteos se ha observado que el DHA y el EPA constituyen alrededor del 50% del total de ácidos grasos de los lípidos presentes en la vitelogenina (Silversand y Haux, 1995). Además, los datos obtenidos al estudiar la composición en ácidos grasos de los lípidos del hígado y de la vitelogenina de estas especies de teleósteos sugieren que existe una selección específica de ácidos grasos durante el proceso de lipidación de la vitelogenina.

En el presente trabajo se observa una clara diferencia entre el contenido en ácidos grasos de la serie n-3 y la relación DHA:EPA entre la dieta natural y las dietas artificiales. Por otro lado se ha observado que el perfil de ácidos grasos de las dietas se refleja claramente en el de los ácidos grasos de los huevos. Puesto que la Vg es el precursor del vitelo de los huevos, el perfil de ácidos grasos de éstos probablemente es similar al que presenta la Vg. Por lo tanto, el perfil de ácidos grasos de la dieta probablemente esté modulando la composición en ácidos grasos de la Vg y, también es posible, que influya en las tasas de producción de la Vg y, por lo tanto, en los niveles de Vg detectados en plasma.

La ración a la que se administraron las dos dietas artificiales no tuvo ningún efecto en los niveles plasmáticos de Vg. De una manera similar, Cerdá *et al.* (1994a) tampoco encontraron diferencias en los niveles plasmáticos de Vg entre lubinas alimentadas con una dieta natural a distinta ración. Este hecho es acorde con la idea planteada por Hislop *et al.* (1978) y Robb *et al.* (1982) para *Melanogrammus aeglefinus*, y después recogida por Cerdá *et al.*, (1994a) para la lubina, de que esta especie, probablemente igual que otras muchas especies de peces, son capaces de desviar los recursos metabólicos de que disponen hacia la formación de los gametos. Por lo tanto, las variaciones observadas en la calidad de los huevos no parecen causadas por una deficiencia en la cantidad de recursos disponibles para la formación de los oocitos sino que probablemente está causada por las alteraciones en su composición ocasionadas por una composición inadecuada de los nutrientes básicos administrados a los reproductores a través de la dieta.

IV

EFFECTO DEL AUMENTO ESPECÍFICO DE LA CANTIDAD DE ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES INGERIDA POR LOS REPRODUCTORES DE LUBINA

RESUMEN

En este experimento se pretendió determinar si una proporción inadecuada de ácidos grasos en las dietas, particularmente DHA:EPA, a la que se atribuyeron los malos resultados de puesta obtenidos en la experiencia previa, podría ser compensada por un incremento de las cantidades absolutas de estos ácidos grasos ingeridas por los reproductores de lubina. El otro objetivo fue dar una descripción de la evolución de los niveles plasmáticos de GtHII a lo largo del ciclo reproductivo en una especie con un ovario de tipo síncrono por grupos, como es la lubina, y ver como las concentraciones de esta hormona se relacionan con las de Vg y E2.

Se establecieron cuatro grupos experimentales. Dados los buenos resultados obtenidos con el grupo control en la experiencia previa siguió utilizándose en esta otra. Debido a los objetivos perseguidos en esta experiencia resultaba ideal el uso de animales que hubieran perdido su capacidad reproductiva debido a un régimen nutricional inadecuado, ya que eso permitiría observar más claramente un posible efecto positivo de las nuevas dietas a ensayar. Por ello se utilizaron los animales que se habían mantenido en la experiencia anterior con dietas artificiales. Se reagruparon y se formaron con ellos tres nuevos grupos. El grupo A (también denominado grupo 9%) recibió el mismo pienso con el 9% de lípidos que en la experiencia anterior había producido muy malos resultados de puesta y sirvió como control negativo. En el grupo B se intentó mejorar la calidad de la dieta elevando específicamente la concentración de ácidos grasos de la serie n-3, especialmente de DHA y de EPA (grupo rico en n-3). El grupo C (30%) recibió un pienso con una elevada concentración de lípidos, el 30%, aumentándose, de este modo, la cantidad absoluta de ácidos grasos ingerida por los reproductores hasta límites muy superiores a los de la experiencia previa.

Aunque las hembras de los grupos alimentados con dietas artificiales presentaron un peso superior al de las hembras del grupo control no llegaron a establecerse diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). El grupo control presentó unas fecundidades mayores y unas tasas de viabilidad y de eclosión de los huevos significativamente ($p < 0.05$) más altas que las de los otros tres grupos. El análisis de ácidos grasos de los lípidos de las dietas permitió observar que la dieta natural presentaba una relación DHA:EPA y AA(20:4 n-6):EPA mayor que las de las dietas artificiales. El contenido de DHA en la dieta rica en n-3 (grupo B) alcanzó valores de aproximadamente el doble del de las otras dos dietas artificiales, acercándose a los porcentajes de la dieta natural. Sin embargo la elevación paralela de la concentración de EPA en esta dieta rica en n-3, hizo que la relación DHA:EPA fuera similar a las de las otras dietas artificiales. Los tres tipos de pienso usados mostraron, de nuevo, unas concentraciones de ácidos monoenoicos de cadena larga mucho más altas que las de la dieta natural.

Los lípidos de los huevos reflejaron las concentraciones de DHA y de EPA de las dietas, de modo que los valores de DHA de los huevos de las dietas control y rica en n-3 fueron significativamente mayores que los encontrados en los huevos de los otros dos grupos experimentales. Sin embargo, en el grupo B el contenido de EPA de los huevos también aumentó, reflejando el elevado contenido de EPA de la dieta. Como resultado la relación DHA:EPA en los huevos de este grupo fue similar a la observada en los huevos de los otros grupos alimentados con dietas artificiales y significativamente ($p < 0.05$) menor de la del grupo control. Todos estos datos sugieren que la calidad de los huevos de la lubina va a estar determinada, en gran medida, por la relación DHA:EPA observada en la fracción lipídica, pero no por las cantidades absolutas de estos dos ácidos grasos. Además, se confirma que la relación DHA:EPA presente en los lípidos de los huevos depende de la relación DHA:EPA presente en la dieta de los reproductores y no de la cantidad absoluta de ácidos grasos por ellos ingeridos.

Los niveles plasmáticos de GtHII se mantuvieron bajos en la época de vitelogénesis activa. Se observó un ligero aumento de la concentración plasmática de GtHII con el inicio de la época de puesta y apareció un pico coincidente con el punto medio del período de puesta. En los teleósteos se ha atribuido a la GtHII juega un papel fundamental en la estimulación de la maduración y ovulación oocitaria. Para explicar el perfil observado en el presente trabajo en los niveles plasmáticos de GtHII hay que tener en cuenta que la lubina presenta un ovario de tipo sincrono por grupos. En este tipo de ovario varias series de oocitos se van desarrollando independientemente. Como resultado, en un determinado grupo de hembras, los oocitos en maduración y ovulación comienzan a aparecer al inicio de la época de puesta y el mayor número de oocitos en estos estados de desarrollo aparece en el punto medio del período de puesta. Por lo tanto, las variaciones observadas en la concentración de GtHII indican que, en la lubina, esta hormona juega un papel muy importante en el control de la maduración oocitaria y de la ovulación.

Los bajos niveles de GtHII observados durante la época de vitelogénesis coincidieron con un paulatino aumento de la concentración de E2. El pico de GtHII se observó en el mes en el que el E2 llegó a los máximos valores en plasma. En mamíferos y en peces se ha observado que el E2 regula de un modo bifásico la secreción de GtHII: durante la época de vitelogénesis provoca una inhibición de la liberación de GtHII desde las células de la pituitaria aunque, a la vez, puede estar cumpliendo con un papel estimulador de su síntesis; finalmente la desensibilización de las células de la pituitaria permitiría la liberación de la GtHII en el momento de la maduración y ovulación oocitaria. Los perfiles de las concentraciones plasmáticas de E2 y de GtHII observados en el presente experimento apoyan esta hipótesis. Además, esta idea se ve corroborada por el hecho de que los mayores niveles de E2 observados durante la época de vitelogénesis en los grupos alimentados con dietas artificiales, coincidieron con los picos más altos de GtHII (grupos 9% y rico en n-3) o bien con un segundo pico de GtHII que apareció al finalizar las puestas

(grupo 30%). Estas observaciones sugieren que las elevadas concentraciones de E2 produjeron una mayor síntesis de GtHII que fue liberada en el momento de la ovulación o bien, con un cierto retraso.

Los niveles plasmáticos de E2 fueron más elevados durante la época de vitelogénesis en los tres grupos alimentados con dietas artificiales que en el grupo control. Las dietas artificiales mostraron una concentración mucho más elevada de ácidos grasos monoenoicos de cadena larga que la dieta natural. Del mismo modo que en la experiencia anterior, estos ácidos grasos podrían estar provocando una situación fisiológica anormal que produjera una proliferación peroxisomal a nivel de las células de la granulosa. Esta proliferación peroxisomal supone un aumento de las actividades enzimáticas encargadas de la transformación de T en E2 y el resultado sería una elevación de la concentración plasmática de E2.

Tal y como era de esperar los niveles plasmáticos de Vg fueron aumentando progresivamente durante los meses previos al inicio de puestas, para alcanzar los máximos niveles cuando estas ya habían comenzado. El grupo B (9%) mostró en plena época de vitelogénesis, en el mes de diciembre, unos niveles significativamente más altos que los observados en el grupo control, mientras que los otros dos grupos alimentados con pienso no mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al grupo control. Sin embargo, en la experiencia anterior los niveles de Vg de todos los grupos alimentados con dietas artificiales fueron menores que los del grupo alimentado con la dieta natural. Probablemente, la elevación de los niveles de Vg plasmática en las hembras alimentadas con dietas artificiales en esta experiencia fue causada por la mayor edad y tamaño de las hembras, de modo que fueron capaces de movilizar reservas de las que carecían dos años antes.

1.- INTRODUCCIÓN

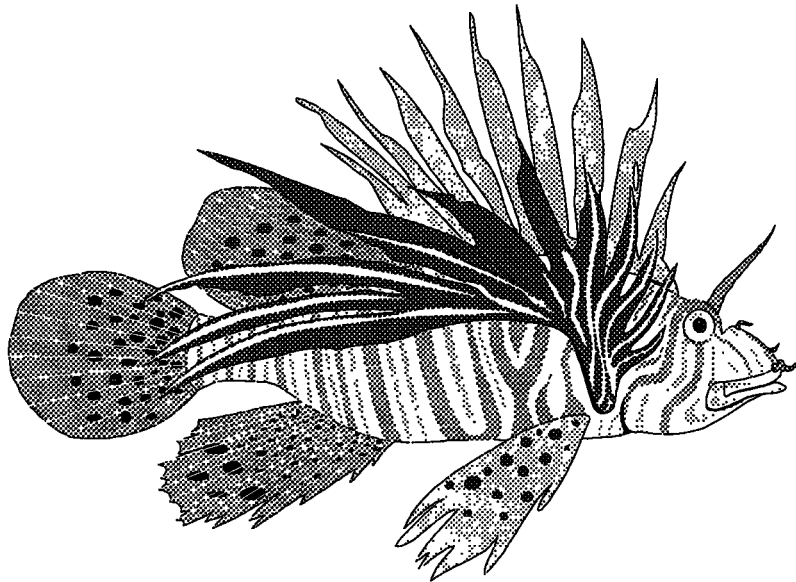
Experiencias realizadas en diversas especies de peces (Watanabe *et al.*, 1984 b, c, d, e, g, h; 1989 a, b; 1991 a, b; Fernández-Palacios *et al.*, 1995; Zohar *et al.*, 1995) han puesto de relieve la necesidad de administrar, a través de la dieta, cantidades adecuadas de ácidos grasos, particularmente de la serie n-3, para que el proceso reproductor se desarrolle normalmente. En la experiencia previa se ha observado que los lípidos de la dieta ejercen una fuerte influencia sobre la composición lipídica de los huevos y que la calidad de éstos no sólo depende de las cantidades absolutas de ácidos grasos en ellos presentes, sino también, y de modo muy especial, de las proporciones existentes entre los ácidos grasos de la serie n-3 y los de la serie n-6, así como de las relaciones DHA:EPA y AA:EPA.

En la presente experiencia se plantea la posibilidad de que unas proporciones DHA:EPA y n-3:n-6 inadecuadas en la dieta se puedan ver compensadas por una elevación de las cantidades totales de esos ácidos grasos ingeridas por los reproductores. Si existieran los mecanismos metabólicos adecuados en los reproductores los ácidos grasos podrían distribuirse en las proporciones adecuadas durante el desarrollo oocitario con independencia de la proporción existente entre ellos. Hasta el momento hay una falta absoluta de experiencias que permitan aclarar estas cuestiones debido a la dificultad y elevado coste que supone la preparación de piensos enriquecidos en un ácido graso particular. Esta dificultad es debida, principalmente, a que los aceites utilizados en la fabricación de dietas para peces suelen ser aceites naturales en los que las proporciones de ácidos grasos están limitadas por las proporciones existentes de forma natural en la materia prima de la que proviene ese aceite. Actualmente, existen aceites comerciales enriquecidos en algunas clases de ácidos grasos, por ejemplo de la serie n-3, y en particular DHA y

EPA, que pueden usarse en la manufactura de dietas artificiales. Sin embargo, el elevado precio de estos aceites hace que no se utilicen normalmente en la manufactura de piensos con fines comerciales, aunque su utilidad para estudios científicos resulta evidente.

Por otra parte, en la actualidad hay una escasez importante de trabajos científicos que profundicen en el estudio del efecto del régimen nutricional sobre los mecanismos hormonales que regulan el proceso reproductor en peces (Ver Introducción. Sección 3). En particular, los que se refieren al efecto de la composición de las dietas sobre el funcionamiento del eje hipotalámico-hipofisario son prácticamente inexistentes. Recientemente, Kah *et al.* (1994) observaron que lubinas alimentadas con una dieta pobre en proteínas y con una elevada concentración de carbohidratos exhibían ciertas alteraciones en la liberación de GnRH durante la época de puesta. Este hecho indica que las funciones secretoras del hipotálamo y de la hipófisis pueden llegar a verse afectadas por modificaciones en la composición de la dieta de los reproductores y que, por lo tanto, el régimen alimenticio puede provocar, también, alteraciones sobre la secreción de gonadotrofinas. Sin embargo, hasta el momento, el conocimiento acerca de los niveles normales de estas hormonas y de su evolución a lo largo del ciclo reproductor es muy limitado y se reduce a un pequeño número de especies (Ver Introducción. Sección 1.3). La falta de estos conocimientos básicos ha hecho que no resultara viable plantear experiencias para determinar la posible influencia del régimen nutricional sobre la secreción de gonadotrofinas. En la actualidad, la puesta a punto de un ELISA para GtH II de especies de Moronidae (Mañanós *et al.*, 1996, c), permite estudiar la variación de los niveles de esta hormona así como la influencia que los factores ambientales, incluido el régimen nutricional, pueden ejercer sobre su secreción.

Uno de los objetivos perseguidos en el experimento que ahora se describe fue determinar si los malos resultados de puesta causados por una proporción inadecuada de ácidos grasos en la dieta podrían ser compensados con un incremento de las cantidades absolutas de esos ácidos grasos ingeridas por los reproductores de lubina. Para elevar la cantidad de ácidos grasos de la serie n-3 en la dieta se utilizaron dos métodos diferentes: se aumentó la concentración de esos ácidos grasos en los lípidos de los piensos o bien se aumentó la cantidad total de lípidos del pienso. Además se estudió la variación de los niveles plasmáticos de Vg, de E2 y de GtH II a lo largo del primer ciclo reproductivo en las hembras de los cuatro grupos experimentales. El fin fue alcanzar una idea aproximativa de las interrelaciones que existen en la secreción de estas sustancias y determinar si las diferencias en la calidad de las dietas administradas a los reproductores pueden llegar a afectar a la secreción de GtH II.



Pez escorpión

2.- MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1.- Animales y tratamiento experimental.

Esta experiencia se inició en junio de 1993 y comprendió dos períodos reproductivos. Para cumplir con los objetivos del presente experimento resultaba ideal el uso de animales en un estado de completa infertilidad causado por un tratamiento nutricional inadecuado, ya que permitirían observar una posible recuperación debida al nuevo régimen de alimentación. Debido a ello se utilizaron los reproductores que en la experiencia anterior habían sido alimentados con las dietas artificiales. Estos animales fueron reagrupados y recibieron las nuevas dietas preparadas para este experimento. La edad de las lubinas utilizadas, al inicio del experimento, era, por lo tanto, de cuatro años. A esta edad un reproductor de lubina se encuentra todavía en su plenitud reproductora y por lo tanto son animales idóneos para estas experiencias. Su peso y talla medios fueron $1327.1 \text{ g} \pm 46.2$ y $39.8 \text{ cm} \pm 0.4$. El número de peces por grupo fue de 20 a 26 y la proporción de machos con respecto a hembras osciló entre 1 y 2 según el grupo experimental considerado.

Se establecieron cuatro grupos experimentales, tal y como se ha explicado en el apartado general de Material y Métodos. Uno de ellos fue el mismo grupo alimentado con boga de la experiencia anterior. Puesto que este grupo proporcionó los mejores resultados de puestas se le consideró como control positivo. Otro de los grupos, grupo A(9%), recibió el pienso con el 9% de lípidos (BOCM Pauls, Renfrew, Escocia. Dieta A) que había sido usado en la experiencia previa. Este pienso, tal y como se ha comentado anteriormente, llevó a los reproductores a un estado de completa infertilidad. En consecuencia el grupo alimentado con esta dieta sirvió como un control negativo. Este pienso, con el 9% de lípidos, sirvió de base para la fabricación de los que recibieron los otros dos grupos experimentales. El grupo B recibió una dieta especialmente rica en ácidos

grasos de la serie n-3. Esta dieta se fabricó usando el pienso base y elevando su contenido lipídico hasta un 16% por medio de un aceite rico en ácidos grasos de la serie n-3 (abreviadamente va a denominar a esta dieta como rica en n-3 o dieta B). Al grupo C (también denominado grupo 28%) se le administró un pienso con las mismas materias primas que el del 9% de lípidos pero cuyo contenido lipídico se elevó de una forma inespecífica hasta el 28% con un aceite de pescado (dieta C). La composición aproximada de las dietas aparece en la tabla IV.1 y los resultados de los análisis de ácidos grasos de estas dietas en la tabla IV.2. Los datos de la composición en ácidos grasos de las dietas experimentales se comentan en el apartado correspondiente de Resultados, en este mismo capítulo. Todos los peces fueron alimentados durante cinco días a la semana con una ración (porcentaje de la biomasa de cada tanque) que fue del 0.7% entre diciembre y marzo, del 1.8% entre julio y septiembre y del 1.2% el resto del año. Hay que señalar que todos los animales del grupo B murieron durante el verano siguiente a la primera época de puesta por causa de un fallo en el sistema de aireación del agua del tanque. Como consecuencia el segundo ciclo reproductor sólo lo completaron los tres grupos restantes.

2.2.- Muestreos.

De un modo similar a la experiencia anterior y tal y como se describió en el apartado general de Material y Métodos, los peces de todos los tanques se muestrearon una vez al mes a lo largo del primer año de experimentación. En estos muestreos se recogieron los datos de peso y talla de todos los animales. Ello permitió estudiar la posible influencia del crecimiento sobre los resultados de puesta y calcular la biomasa de cada tanque para ajustar así la ración a administrar. Se tomaron muestras de sangre de la forma habitual descrita en el capítulo general de Material y Métodos y el plasma extraído se guardó a -20°C. Los muestreos se interrumpieron después de un año con el fin de evitar la manipulación de los animales en verano, cuando la temperatura del agua es excesivamente alta y su contenido de oxígeno muy bajo, y durante la época de puesta.

2.3.- Análisis hormonales.

En las muestras de plasma procedentes de las hembras de todos los grupos experimentales se determinaron las concentraciones de GtHII, de 17 β -estradiol y de vitelogenina.

2.4.- Tratamiento estadístico.

Los tests estadísticos aplicados fueron los explicados en el apartado general de Material y Métodos, sección 7. El diámetro de los huevos, el de la gota de grasa y los datos de peso y talla resultaron ser paramétricos y se compararon utilizando un ANOVA seguido del test de rango múltiple de Student-Newman-Keuls. Los porcentajes de viabilidad y de eclosión de los huevos, así como los niveles hormonales y de vitelogenina fueron no paramétricos y se compararon con el test de Kruskal-Wallis seguido del test de comparaciones múltiples establecido por Conover (1980).

Tabla IV.1. Composición porcentual aproximada de la dieta natural y de los dos tipos de pienso con los que se alimentaron los diferentes grupos de animales en el presente experimento. ND: no detectado.

	Dieta natural	Dieta A (9% lípidos)	Dieta B (rica en n-3)	Dieta C (28% lípidos)
Proteínas	16 %	54.5 %	45 %	46 %
Lípidos	5 %	9 %	16 %	28 %
Carbohidratos	ND	16.5 %	20 %	17 %
Agua	77 %	10 %	9 %	4%
Cenizas	3%	10 %	10 %	5 %

Tabla IV.2. Porcentajes de ácidos grasos presentes en la fracción lipídica de la dieta natural (boga troceada) y de las dietas artificiales utilizadas en este experimento. *Incluye más de un monoeno.

	Dieta natural	Dieta A (9% lípidos)	Dieta B (rica en n-3)	Dieta C (28% lípidos)
14:0	1.9	4.6	4.5	5.7
15:0	0.7	0.4	0.4	0.5
16:0	20.1	15.0	13.4	14.9
16:1 n-7	4.1	4.9	5.3	5.6
16:2 n-3	0.7	0.8	1.3	0.8
17:0	1.0	0.3	0.3	0.3
16:3 n-3	0.6	.6	0.8	0.5
18:0	8.3	30	2.5	2.8
18:1 *	10.3	16.3	12.7	15.4
18:2 n-6	2.6	9.8	6.9	5.2
18:3 n-3	0.6	2.0	1.5	1.3
18:4 n-3	0.5	2.4	2.5	2.6
20:1 *	1.8	6.8	4.8	8.2
20:4 n-6 (AA)	4.6	0.6	0.8	0.5
20:4 n-3	0.2	0.6	0.6	0.7
20:5 n-3 (EPA)	6.7	7.2	11.6	0.7
22:1 *	0.6	10.4	6.8	12.9
22:5 n-6	1.2	0.2	0.4	0.2
22:5 n-3	2.4	0.9	1.3	0.9
22:6 n-3 (DHA)	22.1	9.1	17.4	8.8
Saturados totales	32.5	24.1	21.6	25.0
Monoenos totales	18.1	38.3	29.6	42.1
Dienos totales	3.4	10.7	8.4	6.3
PUFA	44.6	35.1	46.8	29.8
Total n-3	34.6	24.3	38.4	23.4
Total n-6	10.0	10.8	8.4	6.4
Relación n-3 n-6	3.5	2.3	4.5	3.7
Relación AA EPA	0.7	0.1	0.1	0.1
Relación DHA EPA	3.3	1.3	1.5	1.3

3.- RESULTADOS.

3.1. Variación en peso y talla de las hembras

El peso y talla de las hembras utilizadas en el presente experimento se muestra en la figura IV.1.

Durante el primer mes de experimentación el crecimiento fue moderado en todos los grupos. A partir del mes de agosto se produjo un incremento sostenido en peso hasta el mes de enero en los grupos alimentados con dietas artificiales y hasta febrero en el grupo control. A partir de este momento hubo un descenso del peso que fue más moderado entre abril y mayo. El grupo control presentó un peso menor que el resto de los grupos desde el mes de septiembre hasta el final del período considerado, sin embargo, no llegaron a observarse diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Al principio del experimento únicamente el grupo A (9%) presentó un aumento muy moderado la longitud. Este incremento no se detectó en ninguno de los otros grupos experimentales entre junio y julio. A partir de julio se produjo una elevación sostenida de la longitud en todos los grupos experimentales hasta diciembre, justo antes del inicio de la época de puesta. Desde este mes en adelante el incremento de longitud fue mucho más moderado. El análisis estadístico de los datos no demostró la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos. No obstante, el grupo control presentó, desde septiembre hasta mayo, una longitud media más baja que la del resto de los grupos.

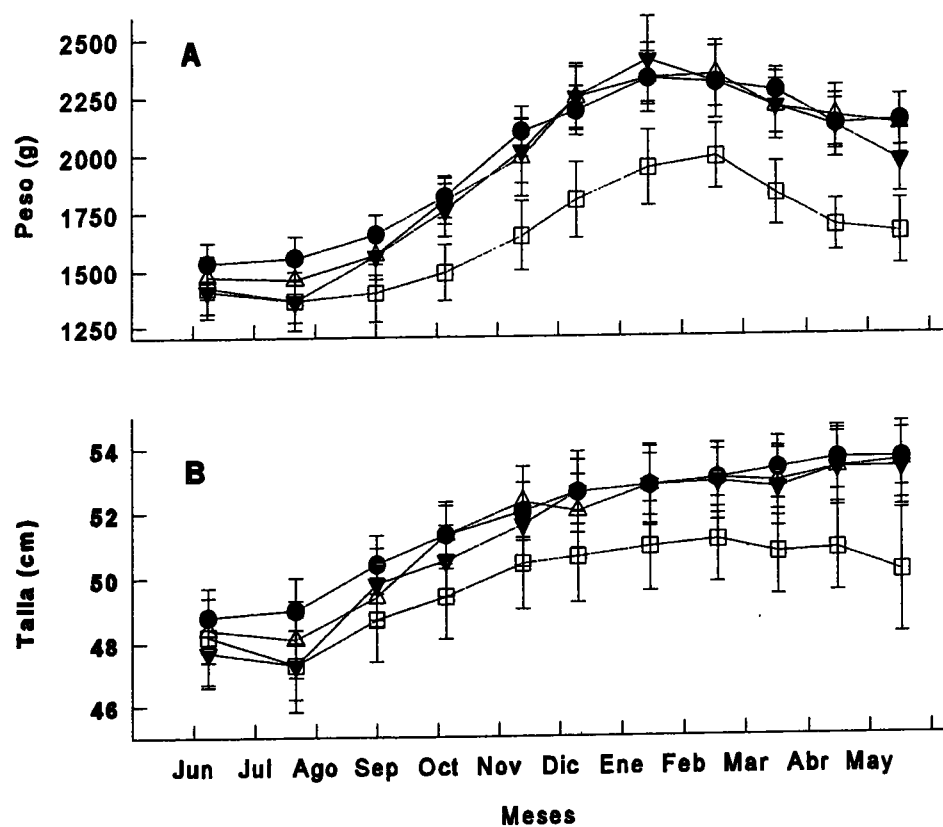


Figura IV. 1. Peso (A) y talla (B) de las hembras de los diferentes grupos experimentales en cada uno de los meses a lo largo del primer año de experimentación. Grupo A (9%), círculos negros; grupo B (rico en n-3), triángulos blancos; grupo C (28%), triángulos negros; grupo control, cuadrados blancos. Cada punto representa la media \pm SEM de 7 a 12 animales. No aparecieron diferencias significativas entre grupos en ningún mes, ni en peso, ni en talla.

3.1.- Resultados de puestas y características de huevos.

Características de las puestas y valores de fecundidad.

Los datos correspondientes a las características de las puestas de los diferentes grupos experimentales aparecen en la tabla IV.3. Los valores de FT y de FR se muestran en la tabla IV.4.

En el primer ciclo reproductivo todos los grupos iniciaron las puestas en la segunda mitad del mes de diciembre. La primera puesta apareció en el grupo A (9%), el 18 de diciembre. Pasados cuatro días las puestas se iniciaron en el grupo control, seis días después en el grupo B (rico en n-3) y doce días más tarde en el grupo C (28% de lípidos). La duración del período de puesta fue de 104 días en el grupo alimentado con una dieta natural y de 88 (grupo B), 89 (grupo C) y 110 (grupo A) días en los grupos alimentados con dietas artificiales. (Los datos correspondientes al grupo B no se citan en la segunda época de puesta porque este grupo murió durante el verano, entre las dos épocas de puesta estudiadas. Ver Material y Métodos de este mismo capítulo, sección 2.1). En el segundo ciclo reproductivo las puestas comenzaron el día 27 de diciembre en el grupo C que fue el grupo que más tarde las comenzó en la primera época de puesta. El grupo control las inició 16 días más tarde y en el grupo A, que fue el primero en comenzar a poner en la época de puesta anterior, no se recogieron puestas más que a partir del día 19 de enero. También hubo variaciones en la duración del período de puesta que osciló entre los 80 días del grupo A y los 100 días del grupo C.

En la primera época de puesta el punto medio del período de puesta varió entre el 7 de febrero, para el grupo B (rico en n-3) y el 21 de febrero, en el grupo control. En la segunda época de puesta el punto medio de puesta del grupo C (30%) fue el 15 de febrero, el del grupo B el 20 de febrero y el del grupo control el 26 de febrero.

Tabla IV.3. Características de las puestas de los distintos grupos experimentales. Junto a la fecha de inicio de las puesta se indica, entre paréntesis, el número de días que duró el período de puesta. El peso medio de las hembras en postpuesta se representa como la media \pm SEM del número de hembras de cada grupo durante el período de puesta.

		Grupo Control	Grupo A (9% lípidos)	Grupo B (rico en n-3)	Grupo C (28% lípidos)
Fecha de inicio de las puestas y duración del período de puesta (días)	1994	22.12.93 (104)	18.12.93 (108)	24.12.93 (88)	30.12.93 (89)
	1995	04.01.95 (96)	19.01.95 (80)		27.12.94 (100)
Pto. medio del período de puesta.	1994	210294	150294	70294	130294
	1995	260295	200295		150295
Nº total de hembras	1994	7	12	11	10
	1995	7	6		10
Nº puestas por hembra	1994	31	33	25	33
	1995	29	27		30
Peso medio de las hembras en postpuesta (g)	1994	1681 \pm 110	2117 \pm 107	2151 \pm 132	2110 \pm 137
	1995	2364 \pm 230	2863 \pm 157		2764 \pm 175

Los grupos alimentados con dietas artificiales mostraron, en la primera época de puesta, una FT mucho menor que la del grupo alimentado con la dieta natural. Estas diferencias se hicieron también patentes en los valores de FR, que en los grupos que recibieron las dietas granuladas fue aproximadamente la mitad de la observada en el grupo control. En la segunda época de puesta el grupo control continuó manteniendo el valor más elevado de FT, aunque fue muy similar al del grupo C. En la FR, sin embargo, el grupo control exhibió unos valores muy superiores a los de los dos grupos restantes, alimentados con dietas artificiales. El grupo C (28%) mostró en las dos épocas de puesta unos valores de FT y de FR más altos que los de los otros dos grupos alimentados con pienso.

La FT mostró una fuerte elevación en años consecutivos en los tres grupos que se mantuvieron durante dos ciclos reproductivos. Esta elevación fue extremadamente fuerte en el grupo C, duplicándose el valor de la FT en la segunda época de puesta con respecto a la primera. La FR, sin embargo, disminuyó ligeramente en la segunda época de puesta en los grupos control y A. El grupo C, al contrario, exhibió una elevación de los valores de FR, asociada con el fuerte incremento de la FT.

Diámetro de los huevos y de las gotas de grasa.

Los datos de diámetro de los huevos y de la gota de grasa aparecen en la tabla IV.5. El diámetro de los huevos osciló, en la primera época de puesta, entre 1.179 mm en el grupo C (30%) y 1.202 mm en el grupo A (9%). En la segunda época de puesta el diámetro menor correspondió al grupo C (28%), 1.152 mm, y el mayor al grupo A (9%) 1.170 mm. Por su parte el diámetro de la gota de grasa varió entre 379 μm (grupo control) y 398 μm (grupo A), en la primera época de puesta, y entre 367 μm (grupo control) y 378 μm (grupo A), en la segunda. Igual que en la experiencia anterior no se observaron

diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos en ninguna de estas dos variables, ni tampoco aparecieron diferencias significativas entre años dentro de un mismo grupo.

Tabla IV.4. Fecundidad total (n° de huevos por hembra) y relativa (n° de huevos por Kg de hembra) de los diferentes grupos experimentales en los dos períodos de puesta tomados en consideración.

		Grupo Control	Grupo A (9% lípidos)	Grupo B (rico en n-3)	Grupo C (28% lípidos)
Fecundidad Total (FT)	1994	1595651	1004913	750491	1096829
	1995	2082609	1292900		1926427
Fecundidad Relativa (FR)	1994	948904	474388	346909	519774
	1995	880388	451641		696995

Tabla IV.5. Diámetro medio de los huevos y de la gota de grasa en los diferentes grupos experimentales. Datos se presentan como medias \pm SEM. No aparecieron diferencias significativas entre grupos o entre años ($p < 0.05$)

		Grupo Control	Grupo A (9% lípidos)	Grupo B (rico en n-3)	Grupo C (28% lípidos)
Diámetro medio del huevo (mm)	1994	1.189 \pm 0.01	1.202 \pm 0.00	1.189 \pm 0.01	1.179 \pm 0.01
	1995	1.159 \pm 0.00	1.170 \pm 0.00		1.152 \pm 0.001
Diámetro medio de la gota de grasa (μm)	1994	379.5 \pm 4.6	398.0 \pm 6.0	380.7 \pm 6.9	389.2 \pm 3.8
	1995	367.2 \pm 5.1	378.5 \pm 5.3		374.2 \pm 4.7

Porcentajes de viabilidad y de eclosión de los huevos.

Los datos correspondientes a las variables tratadas en este apartado aparecen en la figura IV.2.

En las puestas del año 1994 el grupo control mostró el porcentaje más elevado de huevos viables, 47%, que fue significativamente distinto ($p < 0.05$) del observado en todos los demás grupos. En los grupos alimentados con dietas artificiales no aparecieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los porcentajes de flotabilidad de los huevos. Sin embargo, hay que resaltar que el grupo alimentado con el 9% de lípidos (grupo A) presentó un porcentaje (3%) más bajo que el de los otros grupos (12% en el grupo B y 13% en el grupo C), en los que los gránulos de la dieta habían sido enriquecidos con aceites de pescado.

En el año siguiente el grupo control siguió exhibiendo el porcentaje más elevado de huevos viables (52%), que fue, de nuevo, significativamente mayor ($p < 0.05$) que el del resto de los grupos. El porcentaje de viabilidad de los huevos en el grupo A, alimentado con el pienso con el 9% de lípidos, fue del 18%, resultando bastante menor del encontrado en el grupo C, 33%, aunque no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

En las tasas de eclosión, el grupo control mostró, en la primera época de puesta, un valor del 24%, significativamente mayor ($p < 0.05$) del exhibido por los restantes grupos experimentales, en los que osciló entre el 0.3% del grupo A y el 2.4% del grupo B. En el segundo período reproductivo el grupo control presentó un porcentaje de eclosión de los huevos del 29%, significativamente mayor ($p < 0.05$) del observado en los grupos A, 11%, y C, 5%.

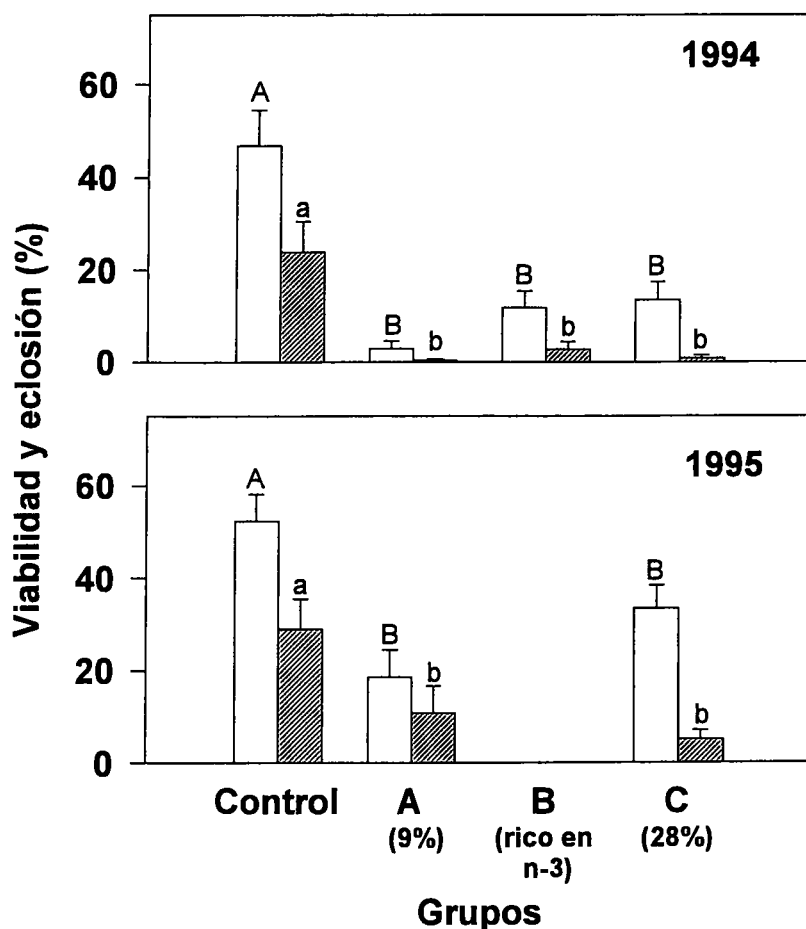


Figura IV.2. Porcentajes de viabilidad y eclosión de los diferentes grupos experimentales en los dos períodos de puesta considerados. Las columnas representan las medias de los porcentajes obtenidos en todas las puestas recogidas a lo largo del período experimental \pm SEM. Barras blancas: porcentajes de viabilidad; barras rayadas: porcentajes de eclosión. Letras mayúsculas diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los grupos en los porcentajes de viabilidad ($p < 0.05$). Letras minúsculas diferentes señalan la existencia de diferencias significativas en los porcentajes de eclosión ($p < 0.05$).

3.3.- Análisis de lípidos y de ácidos grasos.

Composición en ácidos grasos de las dietas experimentales.

Los porcentajes de ácidos grasos presentes en las dietas experimentales aparecen en la tabla IV.2 (Sección de Material y Métodos de este mismo capítulo). Las dietas utilizadas en el presente experimento mostraron algunas diferencias claras en su contenido en ácidos grasos. Tal y como se observó en la experiencia anterior, los monoenos de 16, 18, 20 y 22 átomos de carbono aparecieron en un porcentaje más elevado en las dietas artificiales que en la boga troceada. El porcentaje de monoenos de 20 átomos de carbono fue especialmente elevado en las dietas con el 9% (dieta A) y el 30% (dieta C) de lípidos: 6.8% y 8.2%, respectivamente. En cambio, en la dieta rica en ácidos grasos de la serie n-3 (dieta B) fue menor, 4.8%, y su porcentaje disminuyó enormemente en la dieta natural, 1.8%, con la que se alimentó al grupo control. Las diferencias entre dietas en el porcentaje de monoenos de 22 átomos de carbono fueron todavía mayores: 10.4% y 12.9% en las dietas A y C, respectivamente, un 6.8% en la dieta B y únicamente un 0.6% en la boga troceada.

Las dietas artificiales presentaron también un porcentaje elevado de ácido linoleico (18:2 n-6), reflejando la presencia de aceites vegetales en la manufactura del pienso: entre 5.2% en la dieta C y 6.9% en la dieta B. Por su parte, la dieta natural sólo presentó un 2.6% de este ácido graso. El porcentaje de ácido linolénico (18:3 n-3) fue también mayor en los gránulos de pienso (1.3% a 2%) que en la boga triturada (0.6%).

El porcentaje de ácido araquidónico en la boga alcanzó el 4.6%, mientras que en el pienso varió únicamente entre 0.5% y 0.8%. El nivel de EPA en la boga fue de 6.7%, similar al encontrado en las dietas A y C: 7.2% y 7.0%, respectivamente. Sin embargo, en

la dieta enriquecida en n-3 (dieta B) su nivel se elevó hasta 11.6%. Por su parte, los niveles de DHA fueron mucho mayores en la dieta B, 17.4%, y en la boga, 22.1%, que en las dietas A y C, en las que los porcentajes de este último ácido graso fueron, respectivamente, de 9.1% y de 8.8%. La relación AA:EPA fue mucho mayor en la dieta natural, 0.7, que en las dietas artificiales, 0.1. Del mismo modo, la relación DHA:EPA en la dieta natural, 3.3, fue más elevada que en el pienso, 1.3 a 1.5.

Considerando en conjunto todos los PUFA resultó que la dieta natural y la dieta B presentaron unos porcentajes de 44.6% y de 46.8%, bastante más elevados que los observados en la dieta A, en la que alcanzaron únicamente el 35.1%, y que en la dieta C, en la que se observó un 29.8% de PUFA. La cantidad de ácidos grasos de la serie n-3 fue más elevada en la dieta B (38.4%), que fue enriquecida precisamente en esos ácidos grasos, que en las restantes dietas (34.6% en la dieta natural, 24.3% en la dieta A y 23.4% en la dieta C). El porcentaje de ácidos grasos de la serie n-6 en la dieta natural fue de un 10% y en la dieta A de un 10.8%, reduciéndose este porcentaje en la dieta B a un 8.4%, y en la dieta C a un 6.4%. Como resultado de estos porcentajes la dieta B presentó una relación n-3:n-6 de 4.5, la más elevada de todas las observadas. Esta relación fue únicamente de 2.3 en la dieta A, mientras que en la dieta natural y en la dieta C fue de 3.5 y 3.7, respectivamente.

Contenido lipídico de los huevos. Primera época de puesta.

El contenido total de lípidos en los huevos recogidos durante la primera época de puesta en esta experiencia, así como los porcentajes de las diferentes clases de fosfolípidos y de lípidos neutros, aparecen en la tabla IV.6.

Los lípidos neutros fueron el componente principal de la fracción lipídica. Dentro de ellos los más abundantes fueron los ésteres de ceras, que mostraron porcentajes de alrededor del 55%. El contenido de triglicéridos fue bastante más bajo, aproximadamente la mitad del de los ésteres de ceras. Finalmente, el colesterol supuso aproximadamente el 5% del total de lípidos. En cuanto a los fosfolípidos, el más abundante fue la fosfatidilcolina (9% a 11%) y, a continuación, la fosfatidiletanolamina (3%). El resto de fosfolípidos aparecieron ya en porcentajes menores al 1%.

La única diferencia a destacar entre grupos, en los porcentajes de los diferentes tipos de lípidos analizados, corresponde a la fosfatidilcolina, que en los huevos de los grupos A y control apareció en una cantidad significativamente mayor ($p < 0.05$) que en los grupos B y C.

Tabla. IV.6. Contenido total de lípidos de los huevos recogidos de los diferentes grupos experimentales en la primera época de puesta y porcentaje de las clases lipídicas en ellos detectadas. Se representan la media de los análisis de 7 a 9 muestras \pm SEM. Letras distintas como superíndice indican la existencia de diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$)

	Grupo Control	Grupo A (9% lípidos)	Grupo B (rico en n-3)	Grupo C (28% lípidos)
Lípidos totales (μg / huevo)	28.36 \pm 1.23	28.2 \pm 12.69	28.19 \pm 2.10	25.97 \pm 1.81
Composición en clases de lípidos (% de los lípidos totales)				
Fosfatidilcolina	11.1 \pm 0.5 ^a	11.3 \pm 0.5 ^a	9.5 \pm 0.5 ^b	9.5 \pm 0.6 ^b
Fosfatidiletanolamina (+ ácido fosfatídico)	3.7 \pm 0.1	3.5 \pm 0.1	3.1 \pm 0.2	3.2 \pm 0.1
Fosfatidilinositol	1.0 \pm 0.0	0.9 \pm 0.0	0.8 \pm 0.1	0.8 \pm 0.0
Esfingomielina	0.3 \pm 0.0 ^{ac}	0.4 \pm 0.0 ^a	0.2 \pm 0.0 ^{bc}	0.2 \pm 0.0 ^b
Fosfatidilserina	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Ésteres de ceras	53.5 \pm 1.7	54.9 \pm 1.8	57.0 \pm 1.8	56.3 \pm 2.6
Triacilglicerol	25.7 \pm 1.1	23.8 \pm 1.2	24.2 \pm 1.1	24.9 \pm 1.6
Colesterol	4.7 \pm 0.2	5.2 \pm 0.2	5.1 \pm 0.3	5.1 \pm 0.4
Lípidos polares totales	16.1 \pm 0.1	16.2 \pm 0.1	13.6 \pm 0.1	13.7 \pm 0.1

Contenido de ácidos grasos en los huevos. Primera época de puesta.

Los porcentajes de los ácidos grasos extraídos de los huevos de los diferentes grupos experimentales en la primera época de puesta aparecen en la tabla IV.7.

Cuando los ácidos grasos se agruparon según el número de dobles enlaces que presentan, el grupo más abundante fue el de los PUFA (su rango de variación fue de entre 37.7%, grupo A, y 45.3%, grupo B) y, a continuación, el de los monoenoos (con un rango de variación de 32.6%, grupo B, a 38.4%, grupo C). El porcentaje de ácidos grasos saturados fue mucho menor y estuvo comprendido entre un 18.8% en el grupo A y un 20.6% en el grupo control. Por su parte, los dienos presentaron unos porcentajes que oscilaron entre el 2.0% en el grupo control y el 7.6% en el grupo A. Cuando la variable tomada en cuenta para agrupar los ácidos grasos fue la posición del primer doble enlace, se encontró que los ácidos grasos de la serie n-3 fueron los más abundantes: entre un 28.9% en el grupo A, y un 36.7% en el grupo B. A continuación, los más abundantes fueron los de la serie n-9: de un 19.6%, en el grupo control, a un 22.3%, en el grupo C. Finalmente, los ácidos grasos de la serie n-6 resultaron ser los más escasos: 4.7% en el grupo control, a un 8.7% en el grupo A.

Considerados individualmente los ácidos grasos más abundantes fueron los monoenoos de 18 átomos de carbono (18:1s) o el DHA, dependiendo de los grupos. Así, en los grupos A y C, el porcentaje de 18:1s fue del 24% y 25% y el de DHA del 18% y 19%, respectivamente. Por el contrario, en los grupos B y control, el porcentaje de 18:1s fue del 22% y el de DHA del 24% y 25%, respectivamente. A continuación, los ácidos grasos más abundantes fueron los monoenoos de 16 átomos de carbono, cuyo porcentaje osciló entre el 7.8% del grupo A y el 10.0% del grupo control, y el EPA, con porcentajes de entre 5.2%, grupo control, y 8.5%, grupo B.

Las diferencias observadas entre grupos en el contenido en ácidos grasos de los huevos se muestran también en la tabla IV.7. Conviene indicar que la cantidad de ácidos grasos de la serie n-3 presentes en los huevos del grupo A fue significativamente más baja ($p < 0.05$) que en los grupos B y Control. Al contrario, la cantidad de ácidos grasos de la serie n-6 fue significativamente menor ($p < 0.05$) en el grupo control que en el resto de los grupos. Como resultado de estas diferencias la proporción de ácidos grasos de la serie n-3 con respecto a los de la serie n-6 fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en el grupo control que en los grupos A y C. Por su parte, el grupo A presentó el valor más bajo en la relación n-3:n-6, siendo significativamente distinto ($p < 0.05$) del resto de los grupos.

Cuando se tomó en cuenta el contenido de cada ácido graso individualmente, se encontró que la cantidad de AA presente en los huevos del grupo control fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que la de los huevos de los grupos A y C. Por su parte, el EPA mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre todos los grupos, siendo el grupo control el que presentó el porcentaje más bajo de este ácido graso. El porcentaje de DHA fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en el grupo control que en los grupos A y C. A consecuencia de las diferencias existentes en la distribución de los diferentes ácidos grasos entre grupos, la relación DHA:EPA fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en el grupo control que en los grupos A y C y la relación AA:EPA fue también significativamente mayor ($p < 0.05$) en el grupo Control que en todos los demás grupos.

Tabla IV.7. Porcentajes de ácidos grasos presentes en los lípidos de los huevos recogidos en la primera época de puesta. Se representa la media de 7 a 9 muestras. (SEM inferior al 5% de la media. No se muestra para ganar claridad en la presentación). Letras diferentes como superíndice dentro de una misma fila indican diferencias significativas entre grupos en el contenido del ácido graso correspondiente. ($p < 0.05$).

	Grupo Control	Grupo A (9% lípidos)	Grupo B (rico en n-3)	Grupo C (28% lípidos)
14:0	2.5	2.3	2.2	3.1
15:0	0.7	0.3	0.4	0.5
16:0	13.8	12.7	13.9	12.7
16:1*	10.1 ^b	7.8 ^a	7.9 ^a	8.5 ^a
18:0	3.6	3.4	3.7	3.4
18:1*	22.1	24.4	22.2	25.1
18:2 n-6	1.7 ^c	7.3 ^a	6.7 ^{ab}	5.9 ^{bc}
18:3 n-6	0.1	0.1	0.2	0.1
18:3 n-3	0.8	1.2	1.1	1.2
18:4 n-3	0.8	0.9	0.9	1.3
20:1*	0.9	2.7	2.1	3.8
20:2 n-6	0.3	0.3	0.2	0.3
20:4 n-6	1.9 ^c	0.7 ^a	0.9 ^{bc}	0.8 ^{ab}
20:4 n-3	0.6	0.6	0.6	0.7
20:5 n-3	5.2 ^a	6.8 ^a	8.5 ^b	7.9 ^c
22:1	nd	1.2	0.4	1.1
21:5 n-3	0.2	0.2	0.3	0.3
22:5 n-6	0.7	0.2	0.2	0.2
22:5 n-3	1.5	1.3	1.2	1.3
22:6 n-3	25.4 ^c	18.0 ^a	24.4 ^{bc}	18.6 ^a
Total Saturados	20.6	18.8	20.2	19.6
Total Monoenos	33.1 ^a	36.1 ^a	32.6 ^a	38.4 ^b
Total Dienos	2.0 ^c	7.6 ^a	7.0 ^{ab}	6.2 ^b
Total PUFA	39.2 ^a	37.7 ^a	45.3 ^b	38.7 ^a
Total n-3	34.3 ^{cd}	28.8 ^a	36.7 ^{bc}	31.1 ^{ad}
Total n-6	4.7 ^c	8.7 ^a	8.3 ^{ab}	7.4 ^b
Total n-9	19.6 ^a	21.8 ^a	20.1 ^a	22.3 ^b
n-3 n-6	7.3 ^b	3.3 ^a	4.5 ^{bc}	4.2 ^b
AA EPA	0.4 ^a	0.1 ^b	0.1 ^b	0.1 ^b
DHA EPA	4.9 ^c	2.6 ^{ab}	2.9 ^{ac}	2.4 ^b

3.4.- Análisis de GtHII, 17 β -estradiol y vitelogenina.

Niveles plasmáticos de GtHII.

Los niveles plasmáticos de GtHII detectados en las hembras de los diferentes grupos experimentales aparecen en la figura IV.3.

Todos los grupos mostraron unos perfiles similares en los valores de esta hormona hasta el inicio del período de puesta, en diciembre. En octubre, todos los grupos presentaron niveles basales de GtHII, con valores cercanos a 1 ng/ml. En el mes de noviembre, se observó en el grupo control un ligero incremento de estos valores, que no llegó a ser estadísticamente significativo. También en el mes de noviembre, los grupos A (9%) y B (dieta rica en n-3) mostraron una elevación significativa ($p < 0.05$) de los niveles de GtHII, mientras que en el grupo C (28%) se produjo un descenso estadísticamente significativo ($p < 0.05$). En el mes de diciembre, la concentración plasmática de GtHII se mantuvo en los grupos control, A y B, pero en el grupo C se elevó de manera significativa ($p < 0.05$). En el mes de enero, la concentración plasmática de GtH II aumentó en todos los grupos. La cantidad de esta hormona continuó acrecentándose en el mes de febrero, dando lugar, en los grupos alimentados con dietas artificiales, a un claro pico, ya que se alcanzaron valores significativamente diferentes ($p < 0.05$) de los observados en los meses anterior y posterior. En el caso del grupo control los niveles de este mes de febrero fueron mayores que en enero pero no llegaron a alcanzarse diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), aunque sí que lo fueron con respecto a los meses anteriores. La concentración de GtH II descendió en todos los grupos en marzo, llegando a valores significativamente ($p < 0.05$) menores que los del mes de febrero. Los niveles hormonales se mantuvieron en los meses siguientes o continuaron descendiendo muy lentamente en

los grupos Control, A y B. Como excepción, en el grupo C se observa un segundo pico de esta hormona en el mes de abril, alcanzando valores significativamente mayores ($p < 0.05$) que los de los meses de marzo y mayo. Todos los grupos alcanzaron niveles basales en el mes de julio (0.5 a 1 ng/ml).

Los distintos grupos experimentales mostraron ciertas diferencias significativas ($p < 0.05$) a lo largo del ciclo tomado en consideración. Así, el grupo C, en noviembre y enero, y el grupo B, en diciembre, presentaron valores significativamente menores ($p < 0.05$) que los del resto de grupos experimentales. Hay que hacer notar el hecho de que el pico de los niveles plasmáticos de GtH II observado en el mes de febrero fue bastante más alto en los grupos A y B que en los grupos control y C, alcanzándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Igualmente, el segundo pico observado en el grupo C hizo que los niveles plasmáticos de este grupo, en el mes de abril, fueran significativamente diferentes ($p < 0.05$) de los observados en los grupos A y B. Finalmente, los grupos B y C presentaron niveles significativamente más bajos que los grupos A y control en el mes de mayo.

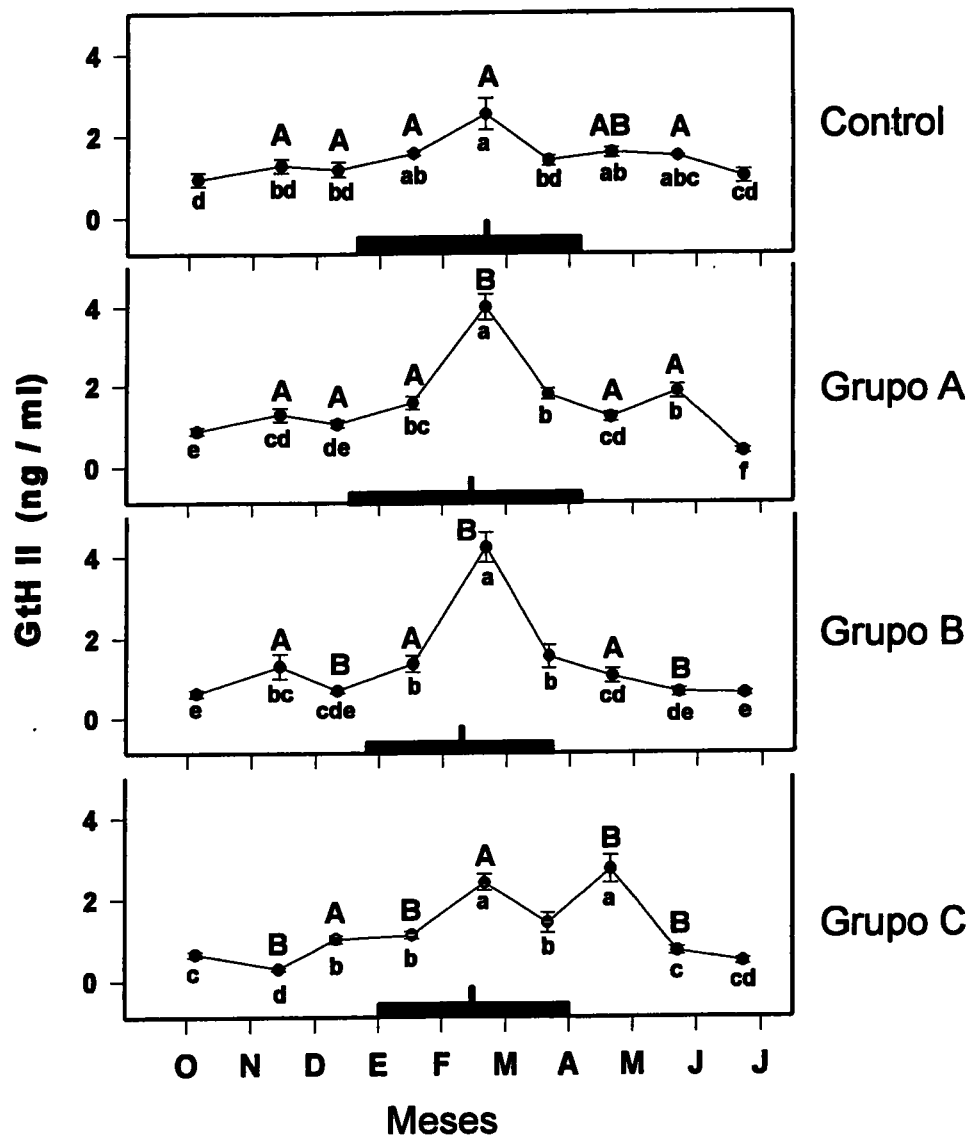


Figura IV.3. Niveles plasmáticos de GtHII detectados en los plasmas de las hembras de los diferentes grupos experimentales a lo largo del primer período experimental. Cada punto representa la media \pm SEM de 6 a 10 animales. Letras minúsculas diferentes dentro de un mismo grupo señalan diferencias significativas entre meses. Letras mayúsculas distintas indican diferencias entre grupos dentro de un mismo mes ($p < 0.05$). Las barras horizontales al pie de cada figura representan el período de puesta y la línea vertical el punto medio de puesta.

Niveles plasmáticos de 17 β -estradiol.

Los perfiles obtenidos en los niveles plasmáticos de E2 se muestran en la figura IV.4. La concentración plasmática de E2 evolucionó de una manera diferente en las hembras del grupo control con respecto a las de los grupos alimentados con dietas artificiales. En el grupo control la elevación de los niveles plasmáticos de E2, que comenzó en el mes de octubre y continuó hasta el mes de enero, se produjo de manera progresiva, sin que llegaran a observarse diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en meses consecutivos. En cambio, en los grupos alimentados con dietas artificiales el E2 aumentó en el plasma de una manera mucho más brusca. Como resultado, los niveles de E2 en plasma alcanzados en noviembre en los grupos A, B y C fueron significativamente más altos ($p < 0.05$) que los del mes de octubre. Además en el grupo B, los niveles plasmáticos de E2 fueron también en el mes de diciembre, significativamente mayores ($p < 0.05$) que los observados en noviembre. Los máximos valores de E2 se alcanzaron en todos los grupos en el mes de febrero, pero únicamente en el grupo control apareció un pico, con unos valores estadísticamente mayores ($p < 0.05$) que los del mes de enero. En todos los grupos, incluyendo el control, se produjo una disminución drástica de los niveles de E2 en el mes de marzo, apareciendo valores significativamente ($p < 0.05$) más bajos que los del mes de febrero. La concentración plasmática de E2 continuó descendiendo hasta alcanzar valores basales en abril o mayo.

Como resultado de la distinta evolución de la concentración plasmática de E2, aparecieron algunas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre grupos, dentro de un mismo mes. En concreto, todos los grupos alimentados con dietas artificiales mostraron unos niveles plasmáticos de estradiol significativamente mayores ($p < 0.05$) que los del grupo control, en los meses de diciembre y enero.

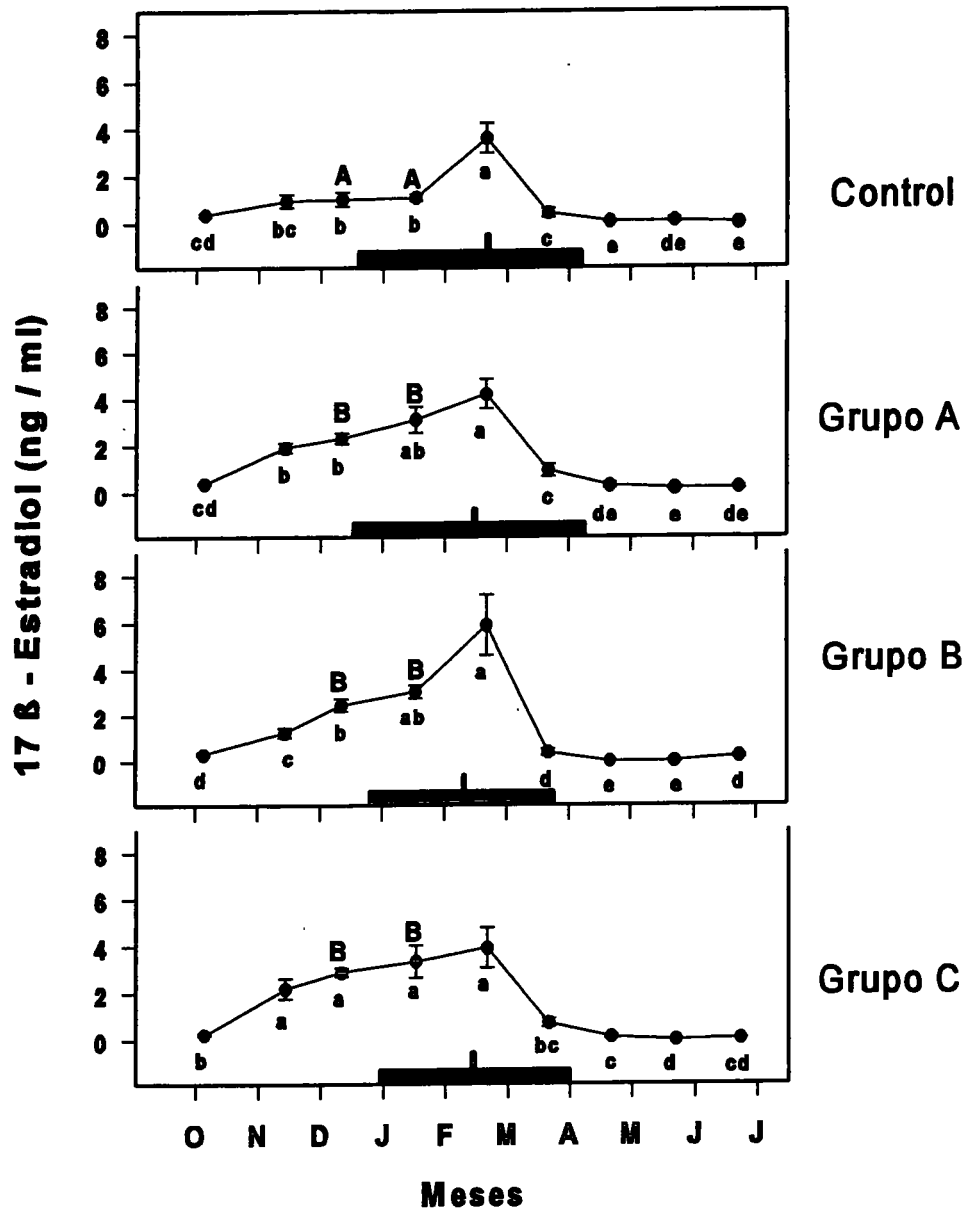


Figura IV.4. Concentración plasmática de 17β-estradiol detectada en las hembras de los distintos grupos experimentales a lo largo del primer ciclo reproductivo estudiado. Cada punto es la media \pm SEM de 6 a 10 animales. Letras minúsculas diferentes señalan diferencias significativas entre meses dentro de un mismo grupo mientras que las letras mayúsculas diferentes son indicativas de la existencia de diferencias significativa entre grupos dentro de un mismo mes ($p < 0.05$). La barra horizontal al pie de las figuras representa el período de puesta y la barra vertical el punto medio de puesta.

Niveles plasmáticos de vitelogenina.

Los valores de Vg plasmática detectados en las hembras de los diferentes grupos experimentales aparecen en la figura IV.5. Todos los grupos mostraron en el mes de octubre niveles basales de Vg, cercanos a 0 mg/ml, que se elevaron bruscamente durante los meses siguientes hasta alcanzar en el mes de enero valores de 5 a 8 mg/ml. Como resultado de esta fuerte elevación en todos los grupos aparecieron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la concentración de Vg plasmática en el mes de noviembre con respecto a la del mes de octubre. Valores significativamente distintos ($p < 0.05$) de los del mes de noviembre se alcanzaron en los grupos A y C en el mes de diciembre y en los grupos control y B en el mes de enero. Las cantidades de Vg plasmática observadas en el mes de enero se mantuvieron en el grupo control durante febrero y marzo. Por el contrario, en todos los grupos alimentados con dietas artificiales se produjo una fuerte disminución de la concentración plasmática de Vg en el mes de febrero, que resultó ser estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en los grupos A y B, recuperando, en el mes de marzo, valores similares a los que se presentaron en el mes de enero. En abril, se produjo un descenso estadísticamente significativo ($p < 0.05$) de los niveles plasmáticos de Vg en todos los grupos, alcanzándose los niveles basales en el mes de mayo.

El grupo control experimentó una ascensión más suave de la concentración plasmática de Vg que el resto de los grupos. Como consecuencia los niveles plasmáticos de Vg en el grupo control fueron significativamente menores ($p < 0.05$) que los del grupo A en el mes de diciembre. En el mes de febrero la situación se invirtió, resultando los niveles plasmáticos de Vg en el grupo control significativamente mayores ($p < 0.05$) que en el grupo A.

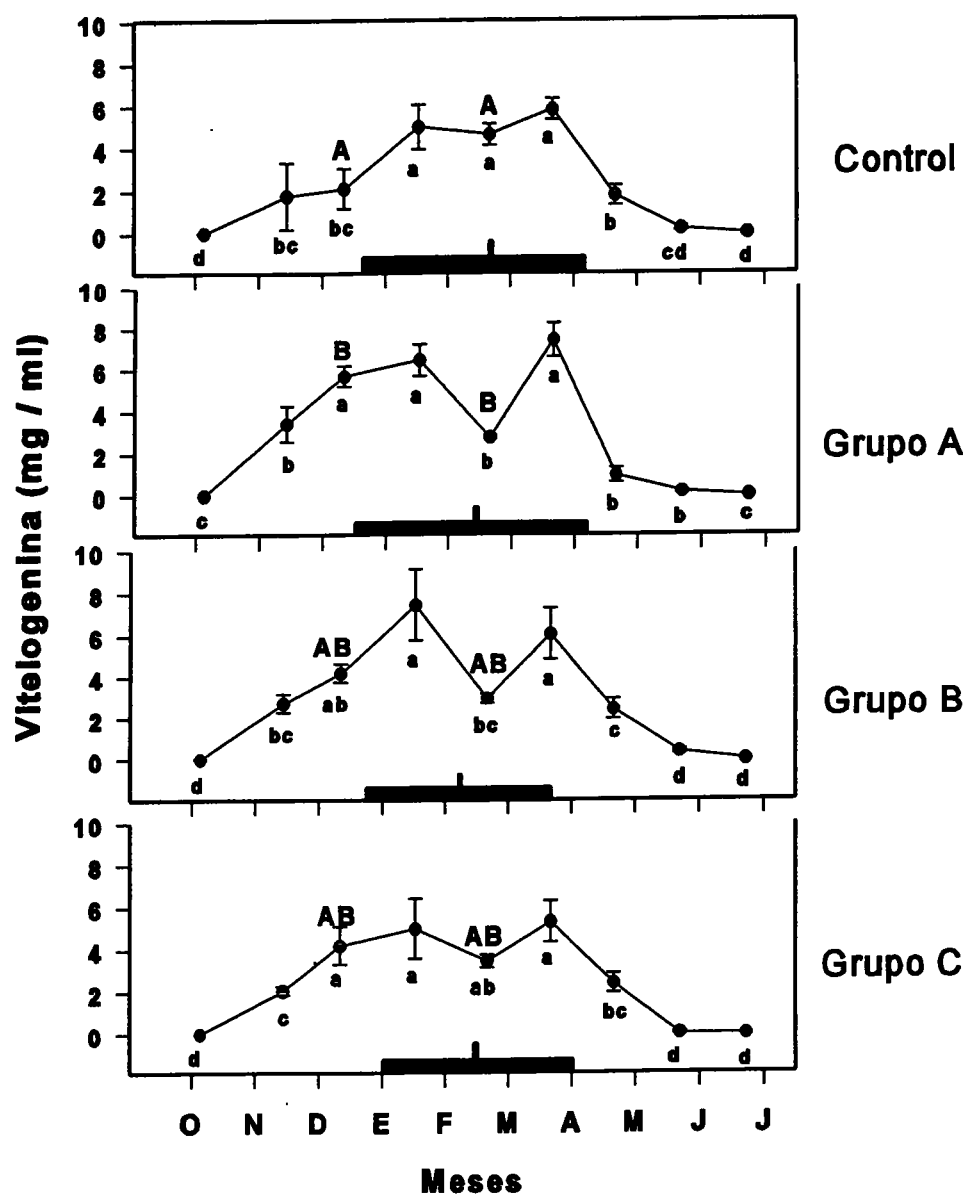


Figura IV. 5. Niveles plasmáticos de vitelogenina detectados en los diferentes grupos experimentales durante el primer período experimental. Cada punto representa la media \pm SEM de 6 a 10 animales. Letras minúsculas diferentes señalan diferencias estadísticamente significativas entre meses dentro de un mismo grupo y letras mayúsculas diferentes señalan diferencias significativas entre grupos dentro de un mismo mes ($p < 0.05$). Las barras horizontales al pie de las figuras representan el período de puesta mientras que las barras verticales representan el punto medio de puesta.

4.- DISCUSIÓN

4.1.- Resultados de puesta.

Los valores de FT observados presentaron un rango de 750 491 a 2 082 609 y resultaron ser mucho mayores que los encontrados en la experiencia previa o en otros trabajos llevados a cabo en lubina: la máxima FT detectada previamente en animales bajo experimentación se encontró en lubinas de 4 años alimentadas con una dieta natural y fue de 664000 (Cerdá *et al.*, 1995). La elevada FT del presente experimento fue debida, probablemente, a la edad de las lubinas utilizadas (5 años). El aumento de edad en la lubina lleva asociado un aumento de la FT (Mayer *et al.*, 1990b) causado por el concomitante incremento de tamaño, como parece ocurrir en otras especies de peces (Bromage *et al.*, 1992).

Por otro lado, y confirmando lo observado en el experimento anterior, se produjo un fuerte incremento de la FT en la segunda época de puesta, que no fue acompañado por un aumento similar de la FR. Este mismo fenómeno fue previamente observado por Bromage *et al.* (1995) en trucha arco iris, lo que les llevó a sugerir que una determinada masa de hembras de pequeño tamaño podría producir un mayor número de huevos que una masa equivalente de hembras de mayor tamaño. Esta característica biológica tiene importantes aplicaciones prácticas en las explotaciones piscícolas dado que un determinado peso total de peces de pequeño tamaño podría producir un mayor número de huevos que el mismo peso total de reproductores más grandes, con los consiguientes beneficios económicos de manipulación y estabulación de animales.

El incremento de la FT se produjo de manera simultánea a la disminución del diámetro de los huevos en todos los grupos experimentales. Por el contrario en salmónidos (Bromage *et al.*, 1995) o en pez gato africano (Richter *et al.*, 1995) las variaciones de tamaño y fecundidad con la edad se hallan asociadas con incrementos en el tamaño de los huevos. Los huevos grandes, tanto en lubina (Cerdá *et al.*, 1994b) como en otras especies, producen larvas de mayor tamaño que los huevos pequeños (revisado por Springate y Bromage, 1985; Lagomarsino *et al.*, 1988; Monteleone y Houde, 1990; Chambers y Legget, 1996). La importancia de este fenómeno radica en el hecho de que las larvas más grandes pueden tener mayores ventajas a la hora de capturar el alimento y de evitar a los predadores que las larvas pequeñas (Chambers y Legget, 1996). Sin embargo en la lubina, bajo condiciones de cautividad, se encontró (Cerdá *et al.*, 1994b) que, a pesar de esa ventaja inicial, no había reducciones de viabilidad de los huevos o de los porcentajes de eclosión ni, incluso, de la supervivencia larvaria a los cuarenta días. Por lo tanto la moderada reducción del diámetro de los huevos puede ser un mecanismo que ayude a producir el ligero aumento de fecundidad sin que la viabilidad inicial de los huevos llegue a verse afectada. Esta hipótesis fue apuntada por Cerdá (1993) y se ve corroborada por las observaciones realizadas en el presente experimento. Por otro lado, las desventajas debidas a la menor disponibilidad de recursos energéticos en los alevines provenientes de los huevos de menor tamaño se puede ver compensada, al menos en condiciones de vida salvaje, por la relativa elevación de la fecundidad de las hembras, como se ha sugerido en otras especies (Hayashizaki *et al.*, 1995; Springate y Bromage, 1985).

Tal y como se observó en la experiencia previa, los grupos que fueron alimentados con dietas artificiales mostraron unos valores de FT y de FR menores que los del grupo control. Paralelamente, los porcentajes de flotabilidad y de eclosión de los

huevos provenientes de los animales alimentados con las dietas artificiales fueron significativamente menores ($p < 0.05$) que los de los huevos del grupo que fue alimentado con boga. Estos resultados coinciden con los de otros estudios previos, también llevados a cabo en lubinas, en los que se demostró que deficiencias nutricionales estaban asociadas con disminuciones en los valores de fecundidad y de calidad de los huevos (Cerdá *et al.*, 1994a, b; 1995). En la discusión de la experiencia anterior ya se señaló que el porcentaje de proteínas suministrado en las dietas artificiales es lo suficientemente alto como para no provocar alteraciones en los resultados de puesta (Cerdá *et al.*, 1994b). Por otra parte la modificación del contenido absoluto de lípidos de las dietas artificiales en el presente experimento no estuvo asociada con variaciones en los resultados de puesta, por lo que tampoco puede atribuirse al contenido absoluto de lípidos la responsabilidad de los malos resultados encontrados en los animales alimentados con dietas artificiales. Todo ello parece apuntar hacia las variaciones en la composición de ácidos grasos de la fracción lipídica de las dietas artificiales con respecto a la dieta natural como una causa importante de los malos resultados de puesta obtenidos. En el apartado siguiente de esta discusión se va a profundizar en las relaciones existentes entre la composición en ácidos grasos de las dietas, de los huevos y los resultados de puesta.

4.2.- Composición de lípidos y ácidos grasos de los huevos.

Composición lipídica de los huevos.

Tal y como se observó en la experiencia anterior, los lípidos neutros fueron mucho más abundantes que los fosfolípidos en los huevos de lubina. Además, las clases de lípidos analizadas también presentaron el mismo orden de abundancia, que es semejante al de otras especies de peces (Henderson, 1987).

Dentro de la fracción lipídica apolar hay que destacar que el mayor porcentaje de todas las clases de lípidos analizadas corresponde a los ésteres de ceras, cuya concentración fue más del doble que la de triglicéridos. La principal función de estos ésteres de ceras, junto con la de los triglicéridos, es la de servir como fuente de energía (Sargent *et al.*, 1989). Los ésteres de ceras han sido observados en los huevos de otras especies de peces marinos como el mágil (Spener y Sand, 1970) y el rodaballo (Finn *et al.*, 1995). Sin embargo los huevos de muchas especies carecen de ellos, como es el caso del fletán (Ronnestad *et al.*, 1995), el bacalao, el arenque, el *Gadus virens*, el *Melanogrammus aeglefinus*, y el *Ammodytes lanceolatus* (Tocher y Sargent, 1984). El elevado porcentaje de ésteres de ceras aparecido en los huevos de la lubina resulta una peculiaridad característica de esta especie.

A diferencia de lo observado en la experiencia anterior, la variación en las concentraciones de lípidos y de ácidos grasos administradas a través de la dieta sí que provocó la aparición de niveles de fosfatidilcolina y de esfingomiélna estadísticamente distintos ($p < 0.05$) entre los huevos de los distintos grupos. Sin embargo no se dio una relación directa entre la composición de fosfolípidos y la calidad de las puestas, ya que a

los grupos con mayores niveles de fosfatidilcolina y esfingomielina les correspondieron, indistintamente, unos huevos de calidad alta, como los del grupo control, o de calidad baja como los del grupo A (ver tabla IV.6 para datos de lípidos y figura IV.2 para datos de calidad de huevos). Todo ello parece indicar que las diferencias encontradas en la calidad de las puestas no pueden atribuirse a las variaciones en el contenido de fosfatidilcolina y de esfingomielina observadas de unos grupos a otros.

Contenido de ácidos grasos de los huevos.

El grupo control fue el mismo que se utilizó en la experiencia anterior y el perfil de ácidos grasos de sus huevos fue similar al obtenido previamente. Puesto que este grupo dio los mejores resultados de puesta en todos los ciclos reproductivos estudiados el contenido de ácidos grasos de sus huevos podría utilizarse como referencia en el estudio de la composición bioquímica de los huevos de lubina.

Los porcentajes de ácidos grasos observados en los huevos de los diferentes grupos reflejaron, de nuevo, los porcentajes encontrados en las dietas. Este hecho se observa de una manera muy clara en los huevos de los grupos que recibieron la dieta con el 7% y 30% de lípidos. Ambas dietas fueron fabricadas con el mismo aceite por lo que el perfil de ácidos grasos fue muy similar y se repitió de una manera muy evidente en los lípidos de los huevos. Los resultados de la presente experiencia corroboran la hipótesis, planteada en el experimento anterior, de que el contenido y proporciones de ácidos grasos en los huevos depende únicamente de las concentraciones de ácidos grasos de la dieta y no del contenido total de lípidos que se administra a los reproductores.

Como se indicó en la experiencia previa, los PUFA de la serie n-3, y en particular el DHA (22:6 n-3), cumplen con una función generalizada de mantenimiento de la integridad estructural y funcional de las membrana plasmática en peces (Sargent, 1994). En particular el DHA ejerce un papel muy importante en las membranas celulares de los tejidos neuronales y ojos de todos los vertebrados, incluidos los peces (Sargent *et al.*, 1995). La importancia del DHA queda ilustrada por el hecho de que los lípidos constituyen aproximadamente el 40% del peso seco del cerebro de los peces, correspondiendo cerca de un 10% a la fosfatidiletanolamina (Mourente *et al.*, 1991) y el DHA supone alrededor del 40% del total de los ácidos grasos presentes en este fosfolípido (Bell y Dick, 1991). Si se tiene en cuenta que el tejido neuronal es una parte bastante grande del total del embrión y de la larva, se comprende que un aporte adecuado de DHA durante el crecimiento es fundamental para el normal desarrollo embrionario.

En el presente experimento, se pretendió observar si una elevada concentración de DHA en la dieta, como la que presenta el grupo B, que se reflejaría en un elevado porcentaje de DHA en los huevos permitiría un crecimiento adecuado del embrión, independientemente de la proporción de este ácido graso con respecto al EPA (20:5 n-3). Los huevos del grupo B presentaron, sin embargo, unas tasas de eclosión muy bajas, asociadas a una baja relación DHA:EPA, a pesar de que los niveles de DHA fueron similares a los de los huevos del grupo control. Estos resultados indican que el normal desarrollo embrionario de la lubina es altamente dependiente de la relación DHA:EPA y no de la cantidad absoluta de DHA. Además, el hecho de que los valores más elevados de la relación DHA:EPA estuvieran asociados con los mejores resultados de puesta confirma la idea de que el DHA tiene una mayor importancia funcional que el EPA.

Un aspecto que no se ha contemplado hasta el momento en las publicaciones relativas a la nutrición de reproductores de peces es el del valor más adecuado de la relación DHA:EPA en las dietas. Únicamente Sargent *et al.* (1994) recomiendan el uso de una proporción DHA:EPA de alrededor de 2:1 en las dietas de peces. Sin embargo, en el caso de la lubina, los mejores resultados han sido obtenidos, tanto en los presentes experimentos como en los realizados por Cerdá *et al.*, (1995), en animales alimentados con la dieta natural en la que la relación DHA:EPA era de 3.3. Este hecho debería de ser tomado en consideración de ahora en adelante en el diseño de los piensos artificiales para peces.

4.3.- Niveles plasmáticos de GtHII, de 17 β -estradiol y de vitelogenina.

Niveles plasmáticos de GtHII.

La variación de la concentración plasmática de GtHII a lo largo del ciclo reproductivo ha sido establecida hasta el momento en algunas especies de salmónidos (Prat *et al.*, 1996; Sumpter *et al.*, 1991; Swanson, 1991) y en el pez rojo (Kobayashi *et al.*, 1988). En el presente trabajo se da, por primera vez, una descripción detallada de la evolución de los niveles de GtHII en una especie de pez con un ovario del tipo sincrónico por grupos, como es la lubina.

En el grupo control, los niveles de GtHII fueron bajos a lo largo del período de gametogénesis, es decir, en la época de prepuesta, de octubre a diciembre. A continuación, la concentración plasmática de esta hormona se elevó, coincidiendo con el inicio del proceso de maduración y ovulación oocitaria, al comienzo de la época de puesta y alcanzó los niveles máximos en el punto medio de las puestas, cuando los niveles de Vg

y de E2 eran los más altos. En salmónidos, el único grupo de peces en el que existen ensayos específicos para determinar la concentración plasmática de GtHI y de GtHII, se observó que los niveles plasmáticos de GtHI se mantienen elevados durante la gametogénesis produciéndose un claro descenso en el período de prepuesta, que coincide con una brusca subida de la concentración de GtHII (Suzuki *et al.*, 1988; Swanson, 1991). En trucha arcoiris y en trucha común los valores de la concentración plasmática de GtHII sufren una fuerte elevación en el momento de la ovulación para descender rápidamente a continuación (Kobayashi *et al.*, 1987a; Sumpter and Scott, 1989). En el pez rojo, especie con un desarrollo ovárico de tipo asíncrono, el crecimiento de los oocitos tiene lugar bajo unos niveles de GtH II extremadamente reducidos (Kobayashi *et al.*, 1987b; 1988). Únicamente en el momento de la ovulación apareció un claro aumento en la concentración plasmática de esta hormona que descendió inmediatamente después. La lubina se caracteriza por poseer un ovario de tipo síncrono por grupos, en el que dos o tres series de oocitos se van desarrollando independientemente hasta las últimas fases de desarrollo oocitario (Mayer *et al.*, 1988; Alvariño *et al.*, 1992a). Como resultado, en un mismo ovario pueden aparecer oocitos en estados de desarrollo muy diferentes. Además, en un determinado grupo de hembras, será en el momento medio del período de puesta cuando el proceso de maduración coincida en un mayor número de oocitos. El pico observado en esta experiencia, en todos los grupos, en el momento medio del período de puesta soporta la idea de que, en la lubina, la GtHII es muy importante en el control del proceso final de maduración oocitaria y de la ovulación, de modo similar a lo descrito en otras especies de peces.

La GtHII también parece estar implicada, en salmónidos, en la estimulación de la secreción del E2. Así, por ejemplo, la GtHII estimula la secreción de E2 en folículos aislados de salmón, de un modo semejante a como lo hace la GtHI (Suzuki *et al.*, 1988; Swanson *et al.*, 1991). Sin embargo, en folículos de trucha arcoiris en inicio de vitelogénesis únicamente la GtH I fue capaz de estimular la síntesis de E2, sin que la GtHII tuviera efecto alguno (Sumpter *et al.*, 1991). En nuestra experiencia, los grupos alimentados con dietas artificiales presentaron durante la fase de vitelogénesis unos elevados niveles de E2 que no aparecieron asociados con una concentración alta de GtHII. Sin embargo, apareció un pico transitorio de GtHII al comienzo de la vitelogénesis cuyo significado es todavía desconocido pero que podría estar implicado en la estimulación inicial de la secreción de E2. De todas maneras, los niveles bajos de GtHII durante la vitelogénesis sugieren que esta hormona no juega un papel fundamental en la lubina en la estimulación sostenida de la síntesis de E2 y en el mantenimiento de la vitelogénesis. Estas funciones le corresponden probablemente a la GtHI.

El paulatino aumento de los niveles de E2 durante la primera mitad (octubre a enero) del ciclo considerado aparece asociado con una baja concentración de GtHII que aumentó bruscamente en el punto medio del período de puesta (febrero). Los niveles bajos iniciales de GtHII podrían ser debidos a una inhibición de su secreción debida a una retroalimentación negativa causada por el E2. La desensibilización de las células secretoras de GtHII ocasionaría la secreción repentina de la GtHII. En todas las especies de mamíferos estudiadas se ha observado un efecto de retroalimentación negativa causado por los esteroides sobre la secreción de LH (revisado por Schwartz, 1995). En el caso concreto de la vaca (Goodman *et al.*, 1980) la secreción de LH es regulada por el E2 de

un modo bifásico: un fuerte aumento en los niveles de E2 circulante provoca la supresión de la secreción de LH, antes de inducir finalmente su liberación.

En peces parece operar un mecanismo similar. En un experimento llevado a cabo en salmón coho (Benfey *et al.*, 1989) se observó que los niveles hipofisarios de GtHII fueron significativamente más elevados en los animales inyectados con E2 que en los controles, que sólo recibieron suero salino. En cambio, los niveles plasmáticos de GtHII en los animales inyectados con E2 fueron significativamente menores ($p < 0.05$) que en los animales controles. Los autores atribuyeron este efecto a una inhibición por los estrógenos de la liberación de GtHII desde la pituitaria. Este mismo control de la liberación de GtHII a través de un mecanismo de retroalimentación negativa ejercido por los esteroides fue observado en diversas especies de teleósteos por medio de experiencias de gonadectomía y posterior administración de esteroides (Bommelaer *et al.*, 1981; Kobayashi and Stacey, 1990). Estudios realizados en ejemplares inmaduros de salmónidos (Crim and Evans, 1983) y de anguila europea (Dufour *et al.*, 1983) han mostrado que el E2 y la T ejercen una acción positiva sobre la estimulación de la síntesis de GtH a nivel de la pituitaria, pero no sobre su liberación (Revisado por Peter 1982, 1983; Kah, 1986). Como ya se ha comentado previamente en el presente trabajo (Ver Capítulo I. Introducción, sección 1.3) el control neuroendocrino de la secreción de GtH II en el pez rojo es regulado por la acción estimulante de la GnRH y por la acción inhibitoria de la dopamina (Peter *et al.*, 1991). El efecto negativo de los esteroides sobre la liberación de GtH de la pituitaria en pez rojo parece ser, en parte, debido a una estimulación de la renovación de la dopamina con lo que se favorece su acción inhibidora (Trudeau *et al.*, 1991a; 1993).

En el pez rojo la acción estimulante de los esteroides quedó patente por el hecho de que el E2 y la T ejercieron un efecto positivo sobre la secreción de GtH estimulada por la GnRH (Trudeau *et al.*, 1991 b). Por su parte, la T tuvo este mismo efecto en carpa y en *Paramisgurnus dabryanus* ("chinese loach") (Trudeau *et al.*, 1991 c). Sin embargo, estos esteroides por sí solos, sin la estimulación de la GnRH, no tuvieron ningún efecto sobre la secreción basal de GtH. En la lubina, los implantes de E2 y de T provocaron un incremento de los niveles hipofisarios de GnRH, (Zanuy, Carrillo, Mateos, Trudeau, Kah, 1997, resultados sin publicar) mostrando el papel estimulador de estos esteroides sobre la secreción de esta hormona.

Los datos obtenidos en el presente trabajo acerca de los niveles de GtHIII no permiten establecer los mecanismos neuroendocrinos modulados por la acción de los esteroides, pero parecen indicar que en los reproductores de lubina los esteroides ejercen, en un principio una influencia negativa sobre la secreción de GtHIII para favorecer, finalmente, su liberación. El hecho de que en lubinas alimentadas con dietas artificiales se observara un descenso de los niveles hipofisarios de GnRH en la época de puesta (Kah *et al.*, 1994) sugiere que es en este momento cuando la GnRH contenida en las terminaciones nerviosas de la pituitaria es liberada para ser utilizada. La acción de la GnRH sobre la liberación de GtH se vería favorecida por los elevados niveles de esteroides detectados en plasma tal y como se ha observado en otras especies de peces (Trudeau *et al.*, 1991a, b,c). Esta hipótesis parece estar corroborada por las diferencias en los niveles de GtHIII observados entre los grupos A (9%) y B (rico en n-3) y el grupo control. Probablemente los mayores niveles detectados en los grupos A y B en febrero, en el punto medio del período de puesta, están asociados con una mayor estimulación de la secreción de GtHIII causada por los mayores niveles de E2 que aparecieron durante los meses precedentes en

estos mismos grupos. La inhibición inicial de la secreción de GtHII por los esteroides, en el caso de la lubina, no parece debida a la acción de la dopamina ya que la inhibición dopaminérgica en esta especie se observó que era casi nula (Carrillo *et al.*, 1995b).

El grupo C, que recibió un pienso con un 30% de lípidos, exhibió, igual que los demás grupos, un primer pico en los niveles plasmáticos de GtHII coincidente con el punto medio del período de puesta. Sin embargo, durante la postpuesta apareció, en este grupo, una segunda elevación de los niveles de GtHII que no se observó en ningún otro de los grupos experimentales. Este segundo pico parece estar relacionado con un retraso en la liberación de la GtHII acumulada a nivel de la pituitaria, pero su causa y significado resultan, por el momento, desconocidos.

Niveles plasmáticos de 17 β -estradiol.

La concentración plasmática de E2 evolucionó en todos los grupos de un modo similar a lo descrito en la experiencia anterior, es decir los niveles de E2 fueron aumentando paulatinamente a lo largo del proceso de vitelogénesis, alcanzaron un pico hacia el punto medio de puestas y disminuyeron al final del período de puesta. Este hecho evidencia el papel fundamental jugado por este esteroide en la estimulación de la síntesis hepática de Vg en la lubina (Mañanós *et al.*, 1996a). Además, se halla en relación con el hecho de que la lubina presente un ovario de tipo sincrono por grupos (Mayer *et al.*, 1988; Alvariño *et al.*, 1992a) lo que hace que el proceso de vitelogénesis se solape con el período de puesta.

Igual que en el primer experimento realizado, desde el inicio del proceso de vitelogénesis hasta el punto medio del período de puesta, todos los grupos alimentados con dietas artificiales presentaron unos niveles de E2 más altos que los del grupo que recibió una dieta natural. Tal y como ocurrió en la primera experiencia, el contenido total de lípidos de la dieta natural fue mucho menor que el de las dietas artificiales. Puesto que para la síntesis de esteroides es necesario un aporte adecuado de colesterol (Nagahama, 1983), una deficiencia nutricional en lípidos podría estar relacionada con una disminución de la cantidad de colesterol disponible para servir de sustrato en la formación del E2. Esta hipótesis fue sugerida previamente por Cerdá *et al.*, (1994) al observar que en lubinas alimentadas con una ración que era la mitad de la ración normal se producía una disminución en los niveles plasmáticos de E2 (Ver discusión del capítulo III. Sección 4.4). No obstante las dietas artificiales presentaron una concentración de ácidos grasos monounsaturados de 20 y 22 átomos de carbono mucho mayor que la de la dieta natural. Tal y como se propuso en la discusión de la primera experiencia (Sección 4.4) los elevados niveles dietéticos de estos monoenoos pueden relacionarse con una proliferación peroxisomal (Henderson *et al.*, 1982; Henderson y Sargent, 1984, 1985) a nivel hepático. Mercure *et al.*, (1995) también observaron la existencia de peroxisomas a nivel de las células foliculares y, además, demostraron su relación con el metabolismo de esteroides. Por lo tanto la proliferación de peroxisomas causada por los monoenoos de 20 y 22 átomos de carbono podría producirse también en las células foliculares de la granulosa. Los peroxisomas derivan de las membranas del retículo endoplasmático (Berkaloff *et al.*, 1981) en las que se encuentran las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo de esteroides. Debido a ello, una proliferación peroxisomal en las células de la granulosa llevaría ligada, también, una elevación de la actividad enzimática relacionada con la

transformación de T en E2, que es propia de las células de la granulosa. La consecuencia final sería una elevación de la síntesis de E2.

Por otra parte, se confirma de nuevo la hipótesis de que bajos niveles de E2, como los aparecidos en el grupo control, son suficientes para estimular de un modo adecuado la síntesis de Vg (Blythe *et al.*, 1994) que podrá ser utilizada para que el crecimiento de los oocitos se produzca normalmente, obteniéndose buenos resultados de puesta.

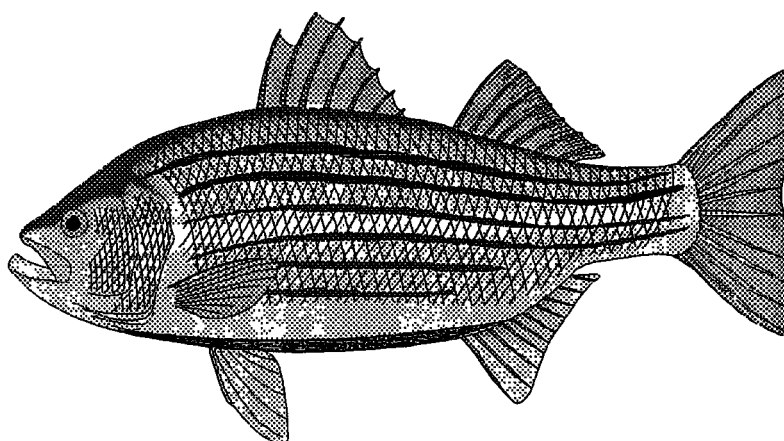
Niveles plasmáticos de vitelogenina.

Los niveles plasmáticos de Vg siguieron, al principio del ciclo reproductivo, una evolución similar a la observada en la experiencia consistente en la variación inespecífica de la cantidad de lípidos administrada a los reproductores (Capítulo III, sección 3.3): desde los valores basales de octubre se fueron elevando paulatinamente hasta alcanzar los máximos en el mes de enero. Este aumento coincidió con el del E2 y es similar al observado previamente en lubina (Mañanós *et al.*, 1994a; 1997c; Cerdá *et al.*, 1994a). En el mes de febrero la concentración plasmática de Vg disminuyó ligeramente en los grupos que habían sido alimentados con dietas artificiales. Probablemente este hecho esté relacionado con la finalización del proceso de vitelogénesis a nivel hepático (Cerdá *et al.*, 1994). En todos los grupos, sin embargo, se observó un nuevo incremento de los niveles de Vg plasmática en el mes de marzo. Este segundo aumento ha sido observado previamente (Mañanós *et al.*, 1997c) y se ha asociado con la reacción cruzada que presenta el ensayo de Vg con las proteínas de vitelo que pasan a la corriente sanguínea durante el proceso de atresia folicular que se produce en la reabsorción gonadal.

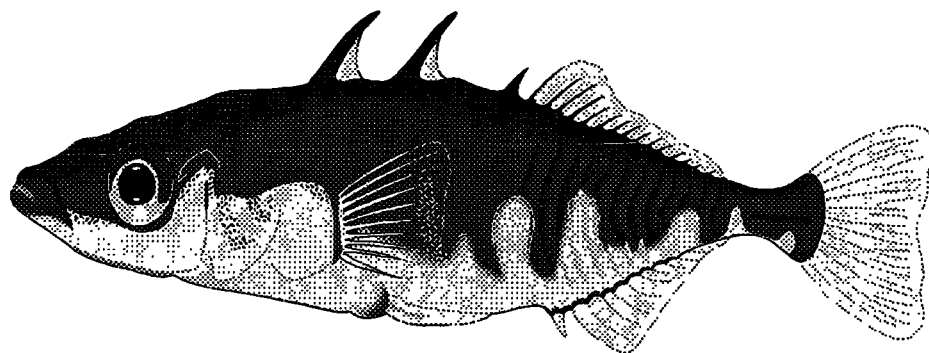
Los valores absolutos de la concentración plasmática de Vg fueron mucho mayores que en la experiencia de la que provenían estos animales (primera experiencia realizada consistente en la variación inespecífica de la cantidad de lípidos ingerida por los reproductores, Capítulo III), llegándose, a partir de diciembre y durante toda la época de puesta, a concentraciones hasta tres veces más grandes que las observadas en aquella experiencia. Valores tan altos no habían sido registrados previamente (Mañanós *et al.*, 1994a, 1997c; Cerdá *et al.*, 1994a). Probablemente, este aumento de la capacidad de síntesis de Vg se halle en relación con el incremento de tamaño experimentado por los animales, ya que en la experiencia presente el peso medio en postpuesta de las hembras osciló entre 1681 g y 2151 g, mientras que en el período de puesta en el que se midió la Vg en la primera experiencia el peso en postpuesta de las hembras estuvo entre 901 g y 1004 g. Los elevados niveles de Vg también pueden encontrarse asociados con la necesidad de un elevado aporte de reservas que permita que el ovario de las hembras crezca del modo adecuado para alcanzar las elevadas fecundidades registradas.

El grupo A mostró una fuerte elevación de la concentración de Vg plasmática en el mes de diciembre, haciendo que los valores alcanzados fueran significativamente más altos ($p < 0.05$) que los del grupo control en este mismo mes. Este resultado puede parecer contradictorio con respecto a lo observado en la experiencia de la que provienen estos animales, en la que los grupos alimentados con dietas artificiales mostraron valores de Vg plasmática inferiores a los del grupo alimentado con una dieta natural. Sin embargo las medidas de la concentración plasmática de Vg se realizaron, en ese caso, en lubinas de tres años que se encontraban en su primera época de puesta mientras que las lubinas utilizadas en el presente experimento tenían una edad de cinco años y estaban en su tercera época de puesta. Probablemente, los mayores niveles de E2 detectados en el grupo A provoquen

la movilización de reservas acumuladas de las que los animales carecían en el primer período reproductor permitiendo la existencia de una elevada tasa de síntesis de Vg. De hecho, la capacidad de la lubina para acumular ácidos grasos como reserva y movilizarlos en el momento más adecuado para que el desarrollo embrionario se produzca normalmente quedó comprobada en otra experiencia realizada en este mismo trabajo (Ver Resultados y Discusión del capítulo V) en la que se observó el efecto de la alteración estacional de la administración de dietas ricas en EFA sobre los resultados de puesta y sobre los niveles de Vg y de E2. La Vg formada en las hembras de esta segunda experiencia, sin embargo, no sirvió para suministrar al oocito las reservas necesarias para que los procesos de embriogénesis y eclosión tuvieran lugar del modo adecuado, como se deduce de los resultados de calidad de los huevos y de su composición en ácidos grasos.



Lubina americana



Espinoso

V

**EFECTO DEL MOMENTO DE
ADMINISTRACIÓN DE DIETAS RICAS EN
ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES**

1000

RESUMEN

Una vez que se había establecido la importancia de ciertos ácidos grasos, particularmente el DHA (22:6 n-3) y el EPA (20:5 n-3), así como de las relaciones DHA:EPA y AA(20:4 n-6):EPA en la determinación de la calidad de los huevos, se planteó el interrogante de cual era el momento, dentro del ciclo reproductivo, en el que los ácidos grasos administrados con la dieta, pueden llegar a afectar a la composición de los huevos y, de ese modo, a su calidad. Responder a esta cuestión fue uno de los objetivos de la tercera experiencia llevada a cabo. Además, se hicieron análisis de E2 y de Vg con el fin de confirmar las observaciones realizadas en las experiencias anteriores.

Para llevar a cabo este experimento se utilizaron dos tipos de dieta. Una dieta rica en ácidos grasos esenciales (EFA) y otra pobre en ellos. Para preparar estas dietas los gránulos del pienso con el 9% de lípidos, utilizados en las experiencias anteriores, se sumergieron en aceite de pescado o en aceite de maíz, de modo que el porcentaje total de lípidos de la dieta se elevó hasta el 20%. El aceite de pescado tiene una elevada proporción de ácidos grasos de la serie n-3, de modo que con ella se consiguió un pienso rico en EFA. Al contrario, el aceite de maíz es pobre en este tipo de ácidos grasos y el pienso obtenido resultó también pobre en ellos.

Se establecieron cuatro grupos experimentales. Cada uno de ellos recibió la dieta enriquecida en ácidos grasos esenciales (EFA) durante un determinado período del ciclo reproductivo. Las temporadas en que no se administró esta dieta los animales recibieron el pienso enriquecido con aceite de maíz. El grupo Sep-Feb fue alimentado con la dieta rica en EFA entre los meses de septiembre y febrero, es decir, a lo largo de toda la época de vitelogénesis, que se solapa, al final, con el período de puesta. Al grupo Feb-

Abr se le administró esta dieta entre los meses de febrero y de abril, o sea, durante la época de puesta. El grupo Abr-Sep tomó la dieta rica en EFA entre abril y septiembre, coincidiendo con la época de postpuesta y de previtelogénesis. Finalmente, el grupo Ene-Dic se mantuvo con esta dieta durante todo el año. La experiencia se alargó durante tres períodos reproductivos.

Los distintos tratamientos nutricionales no provocaron la aparición de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos en el peso de las hembras. El experimento comenzó en el mes de julio, de manera que el grupo Abr-Sep tomó la dieta rica en EFA entre el inicio del experimento y septiembre, es decir únicamente durante dos meses, previamente al inicio de la vitelogénesis. En los resultados de puesta de este primer ciclo reproductivo no se observaron diferencias entre los grupos en los valores de fecundidad. Sin embargo, el grupo Sep-Feb, que recibió la dieta rica en EFA a lo largo de todo el proceso de vitelogénesis, y el grupo Ene-Dic, que fue alimentado continuamente con esta dieta, presentaron unas tasas de viabilidad de los huevos y de eclosión significativamente más elevadas que las de los grupos Abr-Sep y Feb-Abr. Cuando comenzó el segundo período de puesta el grupo Abr-Sep ya había recibido la dieta rica en EFA durante cinco meses seguidos. En este segundo ciclo estudiado tampoco aparecieron diferencias claras en los valores de fecundidad entre los grupos. Los grupos Sep-Feb y Ene-Dic mostraron de nuevo los valores más elevados en las tasas de viabilidad y de eclosión de los huevos y en el grupo Abr-Sep se observó una clara elevación con respecto al año anterior y con respecto al grupo Feb-Abr. En el tercer período experimental estudiado el grupo Feb-Abr mostró una fecundidad mucho menor que el resto de los grupos. El grupo Ene-Dic presentó un porcentaje medio de huevos viables significativamente ($p < 0.05$) mayor que

el resto de los grupos. En cuanto a los porcentajes de eclosión, el grupo Feb-Abr mostró un valor significativamente menor ($p < 0.05$) que el de los otros grupos experimentales.

Al analizar los ácidos grasos de las dos dietas experimentales se encontró que la diferencia más importante radicaba en la relación n-3:n-6, que era casi diez veces más alta en la dieta rica en EFA que en la dieta pobre en EFA. Los ácidos grasos de los huevos reflejaron la composición de las dietas de manera que en el primer ciclo reproductivo la mejor calidad observada en los huevos de los grupos Sep-Feb y Ene-Dic estuvo asociada con una relación n-3:n-6 significativamente más alta que en los otros dos grupos experimentales. En el segundo período de puesta los mejores resultados obtenidos en los grupos Sep-Feb y Ene-Dic aparecieron, de nuevo, ligados a las relaciones n-3:n-6 más altas. La mejoría observada en el grupo Abr-Sep, con respecto al grupo Feb-Abr, fue paralela a la aparición de unos valores más elevados de las relaciones n-3:n-6 y DHA:EPA en los huevos del grupo Abr-Sep, que en los del grupo Feb-Abr. Igualmente, el grupo Abr-Sep presentó un porcentaje mayor de ácidos grasos n-3 que el grupo Feb-Abr. Además, el porcentaje medio de estos ácidos grasos aumentó en los huevos de los diferentes grupos paralelamente a su calidad, es decir, los mayores porcentajes aparecieron en el grupo Ene-Dic, seguido, en orden de abundancia, por los grupos Sep-Feb, Abr-Sep y Feb-Abr.

Todos estos hechos confirmaron la importancia conjunta que tienen un porcentaje adecuado de los ácidos grasos n-3, así como unos valores suficientemente elevados de las relaciones DHA:EPA y n-3:n-6, en la determinación de la calidad de los huevos. Además los datos obtenidos permiten afirmar que los ácidos grasos administrados durante la época de vitelogénesis a los reproductores de lubina pueden alcanzar a los

oocitos en formación de modo que afecten a la composición y calidad de los huevos obtenidos en la época de puesta inmediata. Por otra parte, la clara mejoría observada en el segundo año experimental en la calidad de los huevos del grupo Abr-Sep indica que los ácidos grasos pueden ser acumulados en las reservas corporales y ser movilizados en el momento más adecuado para pasar a formar parte de las reservas de los oocitos en desarrollo.

El E2 y la Vg se analizaron a lo largo del año experimental en los dos grupos que habían recibido dos tipos de dietas totalmente distintas a lo largo de los períodos completos de vitelogénesis y puesta: se trata de los grupos Abr-Sep y Ene-Dic. Los niveles plasmáticos de E2 no mostraron diferencias entre los dos grupos. Los niveles plasmáticos de Vg durante la época de vitelogénesis fueron mayores en el grupo alimentado con la dieta rica en EFA (grupo Ene-Dic) que en el grupo que recibió la dieta pobre en EFA (grupo Abr-Sep). Puesto que las lubinas utilizadas se encontraban en su primer período de puesta, los resultados obtenidos sugieren que la ingesta de unas cantidades adecuadas de ácidos grasos de la serie n-3 así como una relación n-3:n-6 lo suficientemente elevada en la dieta, van a favorecer la aparición de unas concentraciones plasmáticas de Vg fisiológicamente normales.

1.- INTRODUCCIÓN.

Los datos obtenidos en las experiencias previas corroboran la hipótesis de que la composición de la fracción lipídica de las dietas administradas a los reproductores va a ejercer una fuerte influencia sobre los resultados de puesta y la calidad de los huevos debido a que provocan modificaciones en la composición de ácidos grasos de esos huevos. Se ha observado, además, que los procesos hormonales relacionados con la regulación del ciclo reproductor pueden presentar alteraciones dependientes del tipo de dieta consumida por los animales.

Sin embargo, las diferencias más acusadas han aparecido entre los efectos causados por una dieta natural y los ocasionados por dietas artificiales. Por su parte, el distinto contenido lipídico de las dietas artificiales no llevó a la aparición de diferencias estadísticamente significativas entre las variables tomadas en consideración. Este hecho impuso la necesidad de llevar a cabo comparaciones entre dietas artificiales que se diferenciaban en aquellas características a las que se ha atribuido las modificaciones en la calidad de los huevos, es decir de utilizar dietas artificiales que se diferenciaban en las proporciones relativas de ácidos grasos en ellas presentes y no en sus cantidades absolutas.

Por otro lado, un aspecto que no se ha contemplado en trabajos previos realizados en lubina es el de la variación estacional de los requerimientos nutricionales necesarios para que el proceso reproductor se desarrolle normalmente. En otras especies de peces tampoco se ha ahondado en esta cuestión. Hasta 1992 el único estudio realizado en este sentido trataba acerca del efecto de la alteración estacional de la ración en trucha arco iris (Ridelman *et al.*, 1984), observándose en él que el ayuno de los reproductores de

trucha durante 1.5 meses antes del inicio de las puestas no provocaba ninguna disminución de la fecundidad o del tamaño de los huevos. En 1992, Bromage *et al.*, llevaron a cabo un experimento consistente en disminuir la ración administrada a diferentes grupos experimentales de trucha arco iris durante períodos de cuatro meses a lo largo del año anterior al inicio de su primer ciclo reproductivo. Estos autores concluyeron que la fecundidad debía de determinarse tempranamente, ya que únicamente aquellos grupos en los que la ración se redujo durante el inicio del año sufrieron una disminución de la fecundidad con respecto al grupo control. Del mismo modo que las necesidades de una determinada cantidad de alimento no son las mismas a lo largo del año, probablemente la necesidad de un suministro adecuado de cierto tipo de nutrientes, en nuestro caso EFA, puede mostrar fuertes variaciones de unos meses a otros.

En el presente experimento se pretendió observar el efecto del incremento de las proporciones relativas de EFA en dietas artificiales y, a la vez, determinar cual era el momento, dentro del ciclo reproductivo, en el que los ácidos grasos administrados a través de la dieta tienen un mayor efecto sobre la composición y viabilidad de los huevos obtenidos.

2.- MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1.- Animales y tratamiento experimental.

Esta experiencia comenzó en junio de 1992 y duró tres años consecutivos. Se utilizaron lubinas de dos años de edad, con un peso y talla medios iniciales de 413.4 ± 17.3 g y 32.9 ± 1.0 cm, respectivamente. Las lubinas se repartieron en ocho tanques, recibiendo cada uno de ellos unos 30 animales, con una proporción de machos respecto de hembras de aproximadamente 1.5.

Se establecieron cuatro grupos experimentales, cada uno de los cuales tomó una dieta rica en EFA durante un período diferente. Así, el grupo Sep-Feb recibió esta dieta, rica en EFA, de mediados de septiembre a mediados de febrero, durante el período de vitelogénesis; el grupo Feb-Abr la recibió desde mitad de febrero a mitad de abril, en plena época de puesta; al grupo Abr-Sep se le administró esta dieta entre mediados de abril y mediados de septiembre, a partir del momento en que las puestas tocaban a su fin y el organismo se prepara para el próximo período de puestas, es decir durante el período de postpuesta y previtelogénesis. Finalmente, el grupo Ene-Dic tomó esta dieta a lo largo de todo el año. Durante la época del año en que alguno de estos grupos no recibió la dieta rica en EFA se le administró otra dieta con muy bajo contenido en EFA. Un esquema del protocolo experimental seguido aparece en la figura V.1.

Las dos dietas utilizadas en el presente experimento se obtuvieron a partir de la dieta base, con un 9% de lípidos, usada en las experiencias anteriores (Ver Capítulos III y IV. Sección 2.1 de Material y Métodos). Los gránulos de esta dieta fueron bañados con aceite de pescado, rica en EFA, o con aceite de maíz, pobre en EFA, para obtener las

dietas rica y pobre EFA, respectivamente. La cantidad de aceite con la que se bañó el pienso se calculó de modo que los lípidos de la dieta llegaran al 20%. La composición de la dieta aparece en la tabla V.1 y los porcentajes de ácidos grasos de cada una de las dos dietas experimentales se muestra en la tabla V.2.

Todos los grupos experimentales recibieron la misma cantidad de alimento, ajustándose la ración a un 1% de la biomasa de cada tanque, lo que permitió que los animales se alimentaran hasta la saciedad.

2.2.- Muestreos.

Se realizaron muestreos mensuales durante el primer año de experimentación. Se pesó y midió a los animales, lo que permitió calcular la biomasa y ajustar la ración. También se obtuvieron muestras de sangre. Estos muestreos se interrumpieron durante la segunda época de puesta para evitar interferencias con el proceso reproductor. A partir de junio del tercer año los muestreos se reanudaron, únicamente pesando y midiendo a los animales, para poder calcular la biomasa y la ración de cada tanque, hasta el mes de noviembre, interrumpiéndose de nuevo antes de la tercera época de puesta.

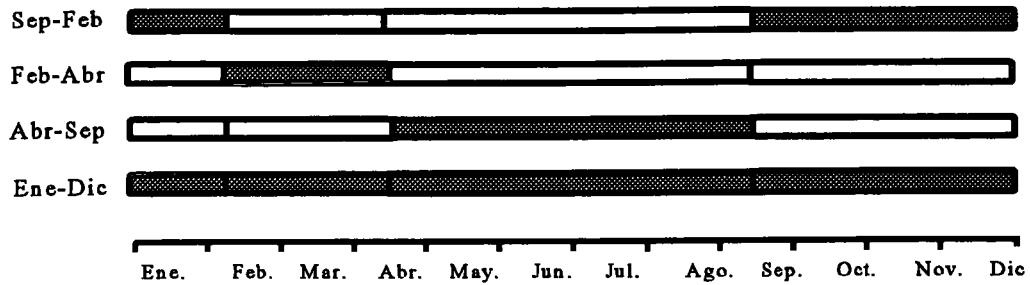


Figura V.1. Esquema del protocolo experimental seguido en la presente experiencia. Cada uno de los grupos experimentales recibió un pienso enriquecido en EFA durante un determinado período del año, lo que se señala por el relleno oscuro. El resto del año recibieron un pienso pobre en EFA indicado por el relleno claro.

Tabla V.1. Composición aproximada de las dietas utilizadas en la presente experiencia.

Composición aproximada	
Proteínas	48%
Lípidos	20%
Carbohidratos	14%
Agua	9%
Cenizas	9%

Tabla V.2. Porcentaje de ácidos grasos presentes en cada una de las dos dietas utilizadas en el experimento. (* : incluye más de un monoeno).

	Dieta pobre en EFA	Dieta rica en EFA
14:0	3.2	5.9
15:0	0.2	0.4
16:0	13.6	13.6
16:1*	10.0	7.8
18:0	2.3	1.8
18:1*	18	12.2
18:2 n-6	27.7	3.8
18:3 n-6	0.1	0.2
18:3 n-3	1.0	0.9
18:4 n-3	1.5	3.0
20:1*	4.9	11.5
20:4 n-6 (AA)	0.3	0.5
20:4 n-3	0.4	0.5
20:5 n-3 (EPA)	4.9	8.8
22:1	7.3	15.6
21:5 n-3	0.2	0.3
22:5 n-6	nd	0.1
22:5 n-3	0.5	0.7
22:6 n-3 (DHA)	5.7	8.1
Total saturados	19.3	21.7
Total monoenos	40.2	47.1
Total dienos	27.9	4
Total PUFA	42.5	27.1
Total n-3	14.2	22.3
Total n-6	28.3	4.8
Relación n-3/n-6	0.5	4.6
Relación AA/EPA	0.1	0.1
Relación DHA/EPA	1.2	0.9

2.3.- Estudio de la distribución de frecuencias de desarrollo oocitario y de la fecundidad total de las hembras.

En el mes de diciembre se sacrificaron 5 ó 6 hembras de cada grupo experimental (Ver Material y Métodos, sección 5). Se extrajeron los ovarios y se tomaron muestras de entre 1 y 3 gramos de las partes anterior, media y posterior. Estas muestras se mantuvieron en líquido de Gilson, que descompuso el tejido conjuntivo dejando libres los oocitos. El número y el tamaño de los oocitos presentes en una alícuota de la muestra se determinó por análisis de imagen. Puesto que se conocía el peso, tanto de la muestra como del ovario, se calculó el número total de oocitos de los ovarios de cada una de las hembras antes de que se iniciaran las puestas, es decir la FT de las hembras en prepuesta.

Además, se realizaron cortes de los oocitos de distinto tamaño con el fin de observar cual era su estado de desarrollo. Se tomaron en consideración los siguientes estados: previtelogénesis, que correspondió a los oocitos de hasta 200 μm ; vitelogénesis, oocitos de 200 μm a 400 μm ; vitelogénesis avanzada, 400-600 μm ; postvitelogénesis, de 600 μm en adelante (Ver Material y Métodos, sección 5 y figura II.1). Se agrupó a los oocitos en estos estados intervalos de tamaño y se observó si existían diferencias en la distribución entre las partes anterior, media y posterior del ovario y entre los diferentes grupos experimentales.

2.4.- Análisis hormonales.

En las muestras de plasma obtenidas durante el primer año de experimentación en los grupos Abr-Sep y Ene-Dic se analizaron los niveles de E2 y Vg por los métodos ya descritos (RIA y ELISA. Ver Material y Métodos, Secciones 7.2 y 7.3, respectivamente). La elección de estos dos grupos se basó en el hecho de que desde el inicio de la

vitelogénesis, en septiembre, hasta el final de la primera época de puesta, en abril, ambos grupos recibieron tratamientos nutricionales completamente diferentes: uno de ellos recibió el pienso pobre en EFA (grupo Abr-Sep), y el otro el pienso rico en EFA (grupo Ene-Dic). La uniformidad de los tratamientos recibidos a lo largo de todo el período de vitelogénesis y puesta permitiría que estos dos grupos reflejaran, de un modo claro, el efecto de la variación de la composición en ácidos grasos de la dieta sobre los niveles de Vg y de E2.

2.5.- Tratamiento estadístico.

Los tests estadísticos aplicados fueron los que se han explicado en el apartado general de Material y Métodos. Se comprobó la parametricidad de los datos usando el test de Kolmogorov-Smirnoff para el estudio de la normalidad de la distribución y el test de Bartlett para la homoscedasticidad de los datos. Los datos del diámetro de los huevos y de la gota de grasa, así como los de peso y talla de las hembras y los de FT real resultaron ser paramétricos. Se compararon utilizando un ANOVA de dos vías, seguido por el test de Student-Newman-Keuls para detectar diferencias entre grupos. El resto de los datos, es decir, los porcentajes de viabilidad y de eclosión de los huevos y las concentraciones plasmáticas de vitelogenina y estradiol fueron no paramétricos por lo que se compararon mediante el test de Kruskal-Wallis. Como test de múltiple rango se utilizó el descrito por Conover (1980).

3.- RESULTADOS.

3.1.- Variación de peso y talla de las hembras.

Los cambios de peso y talla de las hembras de los diferentes grupos experimentales a lo largo del primer año de experimentación se muestran en la figura V.2.

Durante el primer mes el crecimiento fue muy bajo, apareciendo en todos los grupos, con la excepción del grupo Ene-Dic, una pérdida general en peso. A partir de este momento se observó un crecimiento positivo que se mantuvo hasta el mes de diciembre, al inicio de la época de puesta. Con el comienzo de las puestas se observó en todos los peces, excepto en los del grupo Abr-Sep, un crecimiento muy moderado o incluso una reducción del peso. El análisis estadístico de los datos de peso no mostró la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos en ninguno de los meses considerados.

La talla de todas las hembras aumentó de forma sostenida a lo largo de todo el período considerado, aunque en los grupos Abr-Sep y Sep-Feb, durante los tres primeros muestreos, y en el grupo Abr-Sep, entre marzo y abril, se detectó una ligera disminución de la talla. No se observó la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las hembras de los diferentes grupos experimentales a lo largo de todo el año.

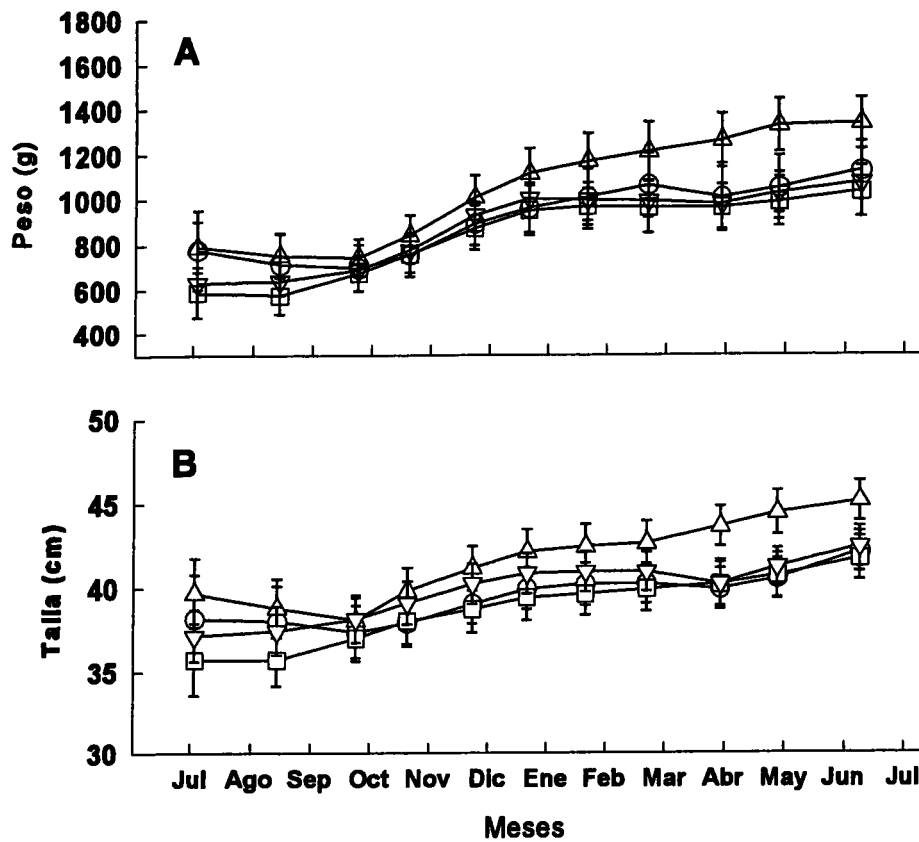


Figura V.2. Variación del peso (A) y de la talla (B) de las hembras de los diferentes grupos experimentales durante el primer año de experimentación. Grupo Sep-Feb, círculos; grupo Feb-Abr, cuadrados; grupo Abr-Sep, triángulos; grupo Ene-Dic, triángulos invertidos. Cada punto representa la media \pm SEM de 17 a 24 hembras. No se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos.

3.2.- Resultados de puestas y características de huevos.

Características de las puestas y valores de fecundidad.

Las puestas se iniciaron siempre en el mismo intervalo de tiempo, en los tres períodos reproductivos tomados en consideración: entre los últimos diez días de diciembre y los cinco primeros de enero (tabla V.3). Ninguno de los tratamientos experimentales provocó una tendencia al adelantamiento o retraso del momento de inicio de las puestas. En la duración del período de puesta ocurre algo similar, pero al hacer mención de esta variable sí que hay que destacar que el grupo Feb-Abr presentó un período de puesta extraordinariamente corto en el tercer año, coincidiendo, como se verá más adelante, con unos pésimos resultados en la calidad de las puestas.

El punto medio del período de puesta no mostró diferencias importantes entre los grupos. En la primera época de puesta se situó entre el 1 de febrero, en el grupo Sep-Feb, y el 12 de febrero, en el grupo Ene-Dic. En la segunda época de puesta apareció entre el 3 de febrero, en el grupo Abr-Sep, y el 16 de febrero, en el grupo Sep-Feb. En la tercera época de puesta fue el grupo Feb-Abr el que presentó un punto medio del período de puesta más temprano, el 22 de enero, mientras que el más tardío correspondió al grupo Ene-Dic, en el que se observó el día 10 de febrero.

Tabla V.3. Algunas características de las puestas de los diferentes grupos experimentales en los tres periodos de puesta considerados. Junto a la fecha de inicio de las puestas se indica el número de días que duró el período de puesta, entre paréntesis. El peso de las hembras en postpuesta se indica como la media \pm SEM del número de hembras que había en cada grupo, valor que también aparece en la tabla.

		Grupo Sep-Feb	Grupo Feb-Abr	Grupo Abr-Sep	Grupo Ene-Dic
Fecha de inicio de las puestas y duración del período de puesta (días)	1993	26.12.92 (94)	26.12.92 (95)	29.12.92 (85)	5.1.93 (83)
	1994	03.01.94 (73)	21.12.93 (94)	22.12.93 (85)	04.01.94 (74)
	1995	02.01.94 (79)	01.01.95 (56)	22.12.94 (95)	03.01.95 (78)
Pto. medio del período de puesta	1993	01.02.93	04.02.93	07.02.93	12.02.93
	1994	16.02.94	04.02.94	03.02.94	12.02.94
	1995	03.02.95	22.01.95	23.01.95	10.02.95
Nº total de hembras	1993	23	19	24	17
	1994	14	13	15	10
	1995	11	13	9	10
Nº puestas por hembra	1993	1.5	0.9	1.8	1.6
	1994	1.9	2.5	2.2	2.4
	1995	1.1	0.7	2	0.9
Peso medio de las hembras en postpuesta (g)	1993	1046 \pm 142	984 \pm 109	1322 \pm 118	1023 \pm 89
	1994	1429 \pm 68	1535 \pm 146	1732 \pm 121	1464 \pm 79
	1995	2201 \pm 120	2357 \pm 205	2556 \pm 262	2599 \pm 180

Los valores de fecundidad obtenidos en los diferentes grupos experimentales a lo largo de los tres años que duró el experimento se muestran en la tabla V.4. En la primera época de puesta (1993), que era, también, la de la primera freza para la mayoría de los animales bajo experimentación, tanto la FT como la FR arrojaron valores similares y bastante homogéneos, que se mantuvieron en un rango de 266010 a 358585 para la FT y de 259745 a 288875 para la FR.

En la segunda época de puesta tomada en consideración (1994) la FT llegó a ser en todos los grupos más del doble de la observada en el período anterior. La FR también se elevó considerablemente en todos los grupos, aunque en el grupo Feb-Abr este aumento fue más moderado que en el resto.

En el tercer período (1995) la FT continuó aumentando en los grupos Sep-Feb, Abr-Sep y Ene-Dic, llegando, en este último, casi a duplicar el valor con respecto al observado en el año anterior. Por el contrario, el grupo que recibió el pienso rico en EFA únicamente durante dos meses en la época de puesta, grupo Feb-Abr, mostró una FT muy reducida que se quedó, aproximadamente, en la mitad de lo obtenido en los otros grupos. Este grupo experimentó, de hecho, una disminución del valor de FT con respecto a lo observado en el año anterior. La FR, en esta tercera época de puesta, se mantuvo cerca del valor observado en el año anterior en los grupos Sep-Feb, Abr-Sep y Ene-Dic, sin mostrar tampoco variaciones importantes entre estos grupos. Por el contrario, el grupo Feb-Abr presentó un valor de FR extremadamente bajo: menos de la mitad del observado en los otros grupos e inferior al de los dos años anteriores en este mismo grupo.

Tabla V.4. Fecundidad total (n° de huevos por hembra) y relativa (n° de huevos por Kg de hembra) de los diferentes grupos experimentales en los tres períodos de puesta tomados en consideración.

		Grupo Sep-Feb	Grupo Feb-Abr	Grupo Abr-Sep	Grupo Ene-Dic
	1993	305957	269926	358585	266010
Fecundidad Total	1994	760601	600838	943596	538205
	1995	1172811	528973	1177061	1049623
	1993	288875	274183	287600	259745
Fecundidad Relativa	1994	532234	391366	549172	408427
	1995	544513	227924	530464	442660

Diámetro de los huevos y de las gotas de grasa.

El diámetro medio de los huevos y de las gotas de grasa de cada uno de los grupos experimentales en los tres años de experimentación aparece en la tabla V.5. En los datos expuestos se observa claramente que el diámetro de los huevos presenta un rango de variación muy reducido. Ello hace que no lleguen a detectarse diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las medias obtenidas para los diferentes grupos en los tres años de experimentación. Sin embargo, al comparar en conjunto los datos de todos los grupos entre años, se observó que el diámetro medio de la tercera época de puesta era significativamente menor ($p < 0.05$) que el de las dos épocas de puesta anteriores.

El diámetro medio de la gota de grasa muestra una clara tendencia a reducirse en años consecutivos en todos los grupos. Sin embargo, únicamente el diámetro medio de la gota de grasa del grupo Sep-Feb en 1995 fue significativamente distinto ($p < 0.05$) del

de este mismo grupo en los dos años anteriores y del diámetro del grupo Abr-Sep en 1993. Cuando los diámetros de la gota de grasa de todos los grupos se consideraron conjuntamente para cada año aparecieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el año 1995 y los años 1993 y 1994.

Tabla V.5. Diámetros medios de los huevos y de la gota de grasa obtenidos en cada uno de los grupos en las diferentes épocas de puesta. También aparecen los datos correspondientes al conjunto de todos los grupos en cada año. Los datos aparecen como medias \pm SEM. Las diferencias estadísticas entre grupos, considerando todos los años en conjunto, se representan por medio de asteriscos diferentes. Los valores sin asterisco no fueron significativamente diferentes de todos los demás ($p < 0.05$). Letras mayúsculas diferentes como superíndice señalan diferencias estadísticas entre años para el conjunto de todos los datos ($p < 0.05$).

		Diámetro medio anual.	Grupo Sep-Feb	Grupo Feb-Abr	Grupo Abr-Sep	Grupo Ene-Dic
Diámetro medio del huevo (mm)	1993	1.186 \pm 0.01	1.198 \pm 0.01	1.180 \pm 0.01	1.200 \pm 0.01	1.167 \pm 0.01
	1994	1.183 \pm 0.01	1.206 \pm 0.01	1.158 \pm 0.01	1.185 \pm 0.01	1.181 \pm 0.01
	1995	1.159 \pm 0.01 ^B	1.172 \pm 0.01	1.163 \pm 0.02	1.144 \pm 0.02	1.159 \pm 0.01
Diámetro medio de la gota de grasa (μm)	1993	383.0 \pm 1.6 ^A	384.6 \pm 2.9*	384.8 \pm 4.2	383.8 \pm 3.1*	378.7 \pm 2.9
	1994	381.5 \pm 1.6 ^A	384.5 \pm 2.8*	381.5 \pm 3.4	378.8 \pm 3.2	381.2 \pm 3.3
	1995	370.6 \pm 2.4 ^B	365.4 \pm 4.5 ^{ab}	376.7 \pm 4.8	369.6 \pm 5.9	370.6 \pm 4.2

Porcentajes de viabilidad y de eclosión de los huevos.

Los porcentajes medios de huevos viables obtenidos y las tasas de eclosión aparecen en la figura V.3. En la primera época de puesta, los grupos que fueron alimentados con un pienso rico en EFA durante el período de vitelogénesis (grupo Sep-Feb) o durante todo el año (Grupo Ene-Dic) presentaron los porcentajes más elevados de huevos viables. El porcentaje más bajo correspondió al grupo Abr-Sep, que en este primer año de experimentación sólo recibió la dieta rica en ácidos grasos entre junio, cuando se inició el experimento, y mediados de septiembre. Los grupos Sep-Feb y Ene-Dic presentaron valores significativamente mayores ($p < 0.05$) que el grupo Abr-Sep y, además, el grupo Sep-Feb también dio unos porcentajes significativamente más altos ($p < 0.05$) que los del grupo Feb-Abr.

En la segunda época de puesta se observaron, en los grupos Sep-Feb y Ene-Dic, unos porcentajes de viabilidad significativamente más altos ($p < 0.05$) que los del grupo Feb-Abr. El porcentaje observado en el grupo Abr-Sep, que en esta segunda época de puesta ya había recibido la dieta rica en EFA durante cinco meses, fue más elevado que en el período reproductor anterior de modo que no aparecieron diferencias significativas entre este y los otros grupos. Finalmente, en la tercera época de puesta, el grupo Ene-Dic presentó el valor más elevado de todos los observados a lo largo del experimento, lo que hizo que este porcentaje fuera significativamente distinto del de los otros tres grupos ($p < 0.05$). Sin embargo hay que remarcar que el grupo Feb-Abr presentó un porcentaje de viabilidad menor que en épocas anteriores y muy diferente del de los otros grupos aunque no llegaron a detectarse diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a los grupos Sep-Feb y Abr-Sep.

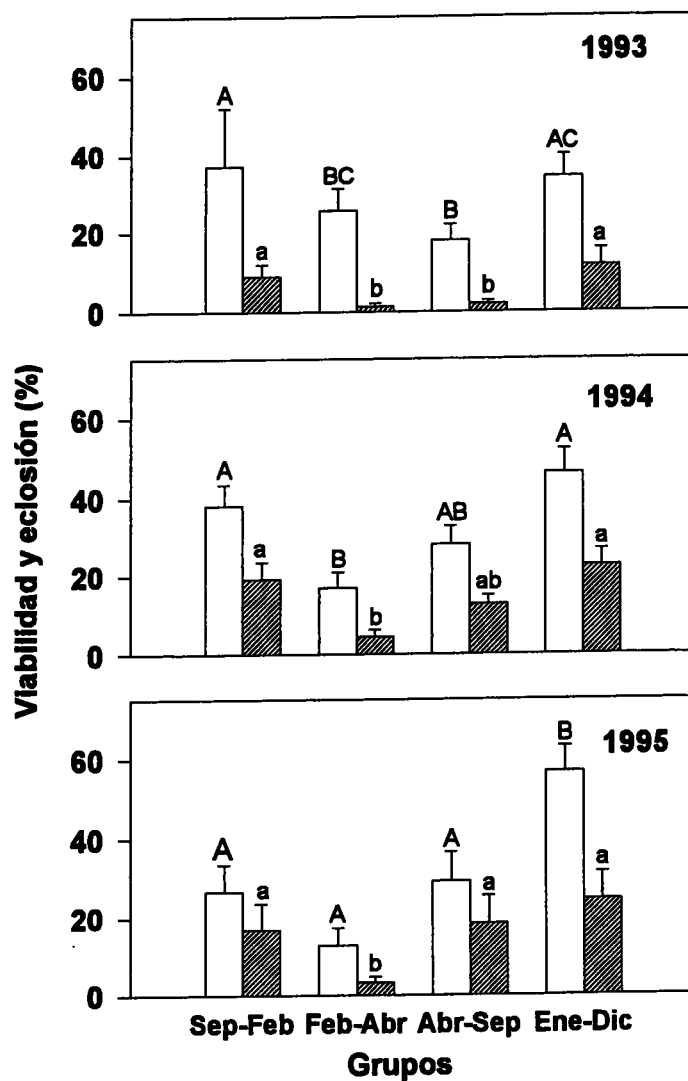


Figura V.3. Porcentajes de viabilidad y de eclosión de los huevos en los diferentes grupos experimentales en los tres períodos de puesta estudiados. Porcentajes de viabilidad: barras blancas; porcentajes de eclosión: barras rayadas. Los datos se presentan como media \pm SEM de los resultados obtenidos en todas las puestas de cada grupo. Letras mayúsculas diferentes sobre las barras blancas señalan diferencias estadísticamente significativas en la tasa de viabilidad y letras minúsculas diferentes sobre las barras rayadas diferencias estadísticamente significativas en la tasa de eclosión. ($p < 0.05$).

En la primera época de puesta las tasas de eclosión de los grupos Sep-Feb y Ene-Dic fueron similares y significativamente ($p < 0.05$) mayores que las de los grupos Feb-Abr y Abr-Sep. Estos dos últimos grupos, que habían sido alimentados con la dieta rica en EFA durante un período de tiempo muy corto, exhibieron unos porcentajes de eclosión muy bajos.

En la segunda época de puesta se elevó el porcentaje de eclosión de todos los grupos, pero el grupo Feb-Abr siguió presentando un valor muy bajo y significativamente ($p < 0.05$) menor que el de los grupos Sep-Feb y Ene-Dic. Por su parte, el grupo Abr-Sep dio un porcentaje de eclosión mucho mayor que en la época de puesta anterior, de modo que no llegaron a establecerse diferencias significativas entre este grupo y los otros tres.

En el último año de experimentación, los porcentajes de eclosión observados en los grupos Abr-Sep y Ene-Dic fueron mayores que en el año anterior. El grupo Sep-Feb presentó un valor algo menor que en la época de puesta previa, pero, tanto este grupo, como los grupos Abr-Sep y Ene-Dic, tuvieron valores significativamente mayores ($p < 0.05$) que el grupo Feb-Abr, en el que se dio una disminución de la tasa de eclosión con respecto al año anterior.

Distribución de frecuencias de tamaño oocitario y fecundidad total en los diferentes grupos experimentales.

La distribución de las frecuencias de tamaño oocitario en las hembras de los diferentes grupos experimentales, así como en las diferentes partes del ovario aparecen en la figura V.4.

En todos los ovarios estudiados se observó que los oocitos en estado de vitelogénesis avanzada presentaban el porcentaje más elevado, seguidos de los oocitos en estado de postvitelogénesis. Al comparar los porcentajes obtenidos en las regiones anterior, media y posterior del ovario de todas las hembras se encontró que los oocitos presentaban una distribución de tamaños homogénea a lo largo de todo el ovario, sin que se encontraran diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las distintas partes consideradas. Por otra parte, cuando se compararon los resultados correspondientes a los diferentes grupos experimentales se vio que en los ovarios de las hembras del grupo Feb-Abr aparecían ciertas diferencias con respecto a los de los otros grupos experimentales: el porcentaje de oocitos en estado de vitelogénesis avanzada era significativamente más alto ($p < 0.05$), a la vez que el de oocitos en previtelogénesis era significativamente menor ($p < 0.05$), que el de los demás grupos experimentales. Además, el porcentaje de oocitos en inicio de vitelogénesis en el grupo Feb-Abr fue significativamente más bajo ($p < 0.05$) que en el grupo Abr-Sep.

Los valores de fecundidad total calculados a partir del conteo de oocitos de las muestras de ovario fueron los siguientes, presentados como media \pm SEM de 5 ó 6 animales: grupo Sep-Feb, 3143037 ± 578477 ; grupo Feb-Abr, 3169240 ± 734790 ; grupo Abr-Sep, 6183779 ± 1104624 ; grupo Ene-Dic, 4344896 ± 482913 . La fecundidad correspondiente al grupo Abr-Sep fue significativamente diferente ($p < 0.05$) de la de los grupos Sep-Feb y Feb-Abr.

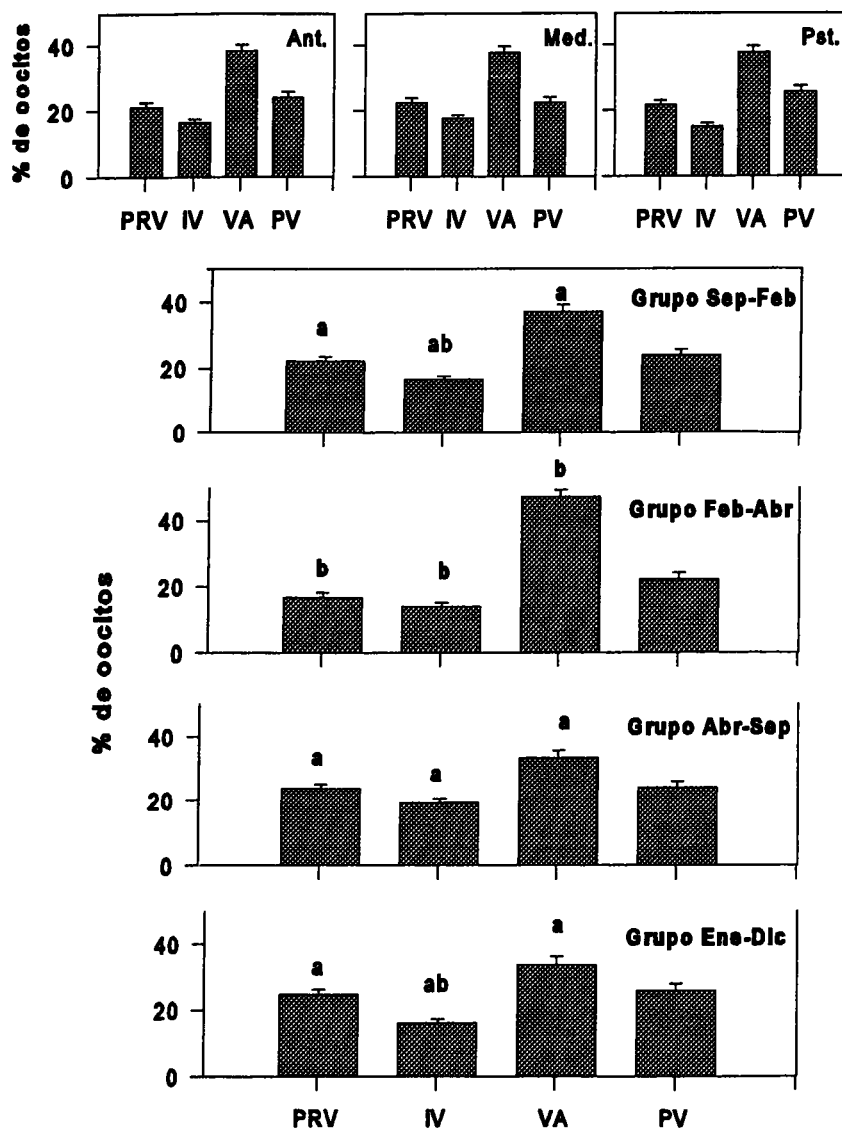


Figura V.4. Porcentajes medios correspondientes a los distintos estados de desarrollo oocitario considerados, en las partes anterior, media y posterior del ovario (parte superior de la figura) y en los ovarios completos de las hembras de los diferentes grupos experimentales (parte inferior de la figura). Letras diferentes sobre columnas correspondientes a un determinado estado de desarrollo oocitario señalan diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p < 0.05$). Ant: parte anterior del ovario. Med: parte media del ovario. Pst: parte posterior del ovario PRV: previtelogénesis. IV: inicio de vitelogénesis. VA: vitelogénesis avanzada. PV: postvitelogénesis.

3.3.- Análisis de lípidos y de ácidos grasos.

Composición en ácidos grasos de las dietas experimentales.

Los porcentajes de ácidos grasos presentes en los lípidos de las dos dietas experimentales aparecen en la tabla V.2. (Ver, en este mismo capítulo, Material y Métodos, sección 2.2). Como en las experiencias anteriores, los ácidos grasos con un único doble enlace presentaron porcentajes diferentes entre dietas. Así, los porcentajes de 20:1 y de 22:1 en la dieta enriquecida con aceite de pescado fueron de 11.5 % y de 15.6 %, respectivamente, mientras que en la dieta enriquecida con aceite de maíz estos ácidos grasos aparecieron en un porcentaje de aproximadamente la mitad, 4.9% y 7.3%, respectivamente. Por su parte, el porcentaje de ácido linoleico (18:2 n-6) en la dieta con aceite de maíz fue de 27.7%, reduciéndose este porcentaje a únicamente el 3.8% en la dieta enriquecida con aceite de pescado.

El porcentaje de AA (20:4 n-6) fue muy bajo en las dos dietas: 0.3% y 0.5%. En cambio los ácidos DHA (22:6 n-3) y EPA (20:5 n-3) sí que presentaron un porcentaje claramente mayor en la dieta con aceite de pescado, 8.1% y 8.8% respectivamente, frente a un 5.7% y un 4.9%, en la dieta enriquecida con aceite de maíz. Sin embargo, la relación DHA:EPA fue parecida en ambas dietas: 1.2 en la dieta enriquecida con aceite de pescado y 0.9 en la dieta enriquecida con aceite de maíz.

Considerando en conjunto todos los ácidos grasos de la serie n-3 se observó que su porcentaje fue mayor en la dieta que tenía aceite de pescado (22.0%) que en la dieta con aceite de maíz (14.0%). En el contenido en ácidos grasos de la serie n-6 la situación fue la inversa: 4.8% en la dieta de aceite de pescado frente a un 28.3% en la dieta

con aceite de maíz. Como resultado la relación n-3:n-6 fue mucho más elevada en la dieta enriquecida con aceite de pescado, 4.6, que en la dieta enriquecida con aceite de maíz, 0.5.

Clases de lípidos presentes en los huevos. Primera y segunda épocas de puesta.

El contenido lipídico de los huevos y los porcentajes correspondientes a las diferentes clases de lípidos para la primera época de puesta se muestran en la tabla V.6. Los datos de este parámetro correspondientes a la segunda época de puesta aparecen en la tabla V.7.

Los componentes más importantes de la fracción lipídica fueron los lípidos neutros, principalmente las ceras, cuyo porcentaje, en la primera época de puesta, osciló entre 40% y 45% y, en la segunda época de puesta, entre 50% y 55%. Después de las ceras, los lípidos más abundantes fueron los triglicéridos, con un porcentaje de entre 30% y 35%, en la primera época de puesta, y de entre 23% y 29%, en la segunda. El colesterol se encontró en un porcentaje más reducido: entre 5.6% y 5.9%, en la primera época de puesta, y entre 5.2% y 6%, en la segunda. Entre los lípidos polares el más abundante fue la fosfatidilcolina que constituyó entre un 10.8 y un 12.3% del total del contenido lipídico del huevo. Después de la fosfatidilcolina el fosfolípido más abundante fue la fosfatidiletanolamina, con un porcentaje de alrededor del 4%. Los otros dos lípidos polares tenidos en cuenta, el fosfatidilinositol y la esfingomiélna presentaron unos porcentajes de 0.8-1.3 y 0.3-0.5, respectivamente.

La administración de la dieta rica en EFA en diferentes estados de desarrollo ovárico no provocó ninguna diferencia en el contenido lipídico total de los huevos entre

los grupos en ninguna de las dos épocas de puesta. De un modo similar, tampoco se observaron diferencias entre las clases de fosfolípidos analizadas. Sin embargo, sí que aparecieron diferencias a nivel de las clases de lípidos neutros. En la primera época de puesta, los huevos procedentes de los reproductores que habían sido alimentados con la dieta rica en EFA durante la puesta (Feb-Abr) y previtelogénesis (Abr-Sep), mostraron unos niveles de triglicéridos significativamente más altos ($p < 0.05$) que los de los grupos que recibieron la dieta rica en EFA durante la época de vitelogénesis (Sep-Feb) y durante todo el año (Ene-Dic). En la segunda época de puesta se observó una reducción, en todos los grupos, del contenido en triglicéridos de los huevos, que fue más acusada en el grupo Ene-Dic. Ello hizo que los valores obtenidos en este grupo resultaran ser significativamente menores ($p < 0.05$) que los de los otros tres grupos experimentales.

Las diferencias observadas en el contenido de ceras en los huevos de los distintos grupos experimentales no llegaron a ser estadísticamente significativas, sin embargo hay que señalar que, de un modo inverso al caso de los triglicéridos, en la primera época de puesta aquellos grupos cuyos huevos presentaron un menor contenido en ceras fueron los mismos en los que la calidad de las puestas fue más baja: grupos Feb-Abr y Abr-Sep. En la segunda época de puesta fue el grupo Ene-Dic el que presentó los valores más elevados, correspondiéndose con los valores más reducidos en triglicéridos.

Tabla V.6. Clases de lípidos presentes en los lípidos totales extraídos de los huevos fertilizados correspondientes a los diferentes grupos experimentales en la primera época de puesta. Se representan como medias de 7 a 9 muestras \pm SEM. Superíndices diferentes en los valores de una misma fila indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$).

	Grupo Sep-Feb	Grupo Feb-Abr	Grupo Abr-Sep	Grupo Ene-Dic
Lípidos totales (μg / huevo)	39.8 \pm 2.1	39.1 \pm 0.8	37.3 \pm 0.9	37.3 \pm 2.8
Composición en clases de lípidos (% de los lípidos totales)				
Fosfatidilcolina	12.2 \pm 0.5	11.8 \pm 0.1	11.9 \pm 0.2	12.3 \pm 0.6
Fosfatidiletanolamina (+ ácido fosfatídico)	4.1 \pm 0.1	4.3 \pm 0.1	4.0 \pm 0.0	4.2 \pm 0.1
Fosfatidilinositol	1.3 \pm 0.0	1.3 \pm 0.0	1.2 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1
Esfingomielina	0.4 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0
Ésteres de ceras	44.8 \pm 0.6	41.7 \pm 0.6	42.0 \pm 0.7	44.1 \pm 1.1
Triglicéridos	31.4 \pm 0.9 ^a	34.4 \pm 0.3 ^b	34.5 \pm 0.4 ^b	31.3 \pm 0.8 ^a
Colesterol	5.7 \pm 0.0	5.6 \pm 0.1	5.8 \pm 0.1	5.9 \pm 0.2
Total de lípidos polares	18.0 \pm 0.6	18.1 \pm 0.1	17.7 \pm 0.2	18.6 \pm 0.8

Tabla V.7. Clases de lípidos presentes en los lípidos totales extraídos de los huevos fertilizados correspondientes a los diferentes grupos experimentales en la segunda época de puesta. Se representan como medias de 7 a 9 muestras \pm SEM. Superíndices diferentes en los valores de una misma fila indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$).

	Grupo Sep-Feb	Grupo Feb-Abr	Grupo Abr-Sep	Grupo Ene-Dic
Lípidos totales (μg / huevo)	25.9 \pm 1.9	31.5 \pm 2.4	27.5 \pm 1.3	30.7 \pm 1.3
Composición en clases de lípidos (% de los lípidos totales)				
Fosfatidilcolina	11.9 \pm 0.3	10.8 \pm 0.9	11.9 \pm 0.5	11.3 \pm 0.5
Fosfatidiletanolamina (+ ácido fosfatídico)	3.5 \pm 0.1	3.1 \pm 0.2	3.9 \pm 0.2	3.6 \pm 0.2
Fosfatidilinositol	1.0 \pm 0.0	0.8 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1
Esfingomielina	0.4 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0
Ésteres de ceras	50.7 \pm 1.8	51.2 \pm 2.6	50.6 \pm 2.0	55.0 \pm 1.9
Triglicéridos	26.9 \pm 1.6 ^a	29.0 \pm 1.3 ^a	26.6 \pm 1.1 ^a	22.7 \pm 1.1 ^b
Colesterol	5.2 \pm 0.1	4.6 \pm 0.4	5.4 \pm 0.3	6.0 \pm 0.3
Total de lípidos polares	16.8 \pm 0.6	15.1 \pm 0.1	17.3 \pm 0.2	16.2 \pm 0.8

Ácidos grasos presentes en los lípidos de los huevos. Primera época de puesta.

La tabla V.8 muestra los porcentajes de los ácidos grasos presentes en los huevos provenientes de los reproductores sometidos a los cuatro regímenes de alimentación en la primera época de puesta.

Los PUFA fueron los ácidos grasos más abundantes en los lípidos de los huevos de todos los grupos experimentales, con porcentajes que oscilaron entre el 40.5% (Grupo Ene-Dic) y el 47.6% (Grupo Feb-Abr). Los ácidos grasos con un único doble enlace, considerados en conjunto, aparecieron en un porcentaje algo menor que el de los PUFA: 32.8% a 37.0%. Por su parte, el porcentaje de ácidos grasos saturados fue mucho más bajo, 18.0% al 20.2%. Finalmente, los dienos mostraron una fuerte variación, y fueron más abundantes que los ácidos grasos saturados en los grupos Feb-Abr y Abr-Sep, 23.6% y 22.8%, respectivamente, pero presentaron un porcentaje mucho menor en los grupos Sep-Feb y Ene-Dic: 11.4% y 7.2%.

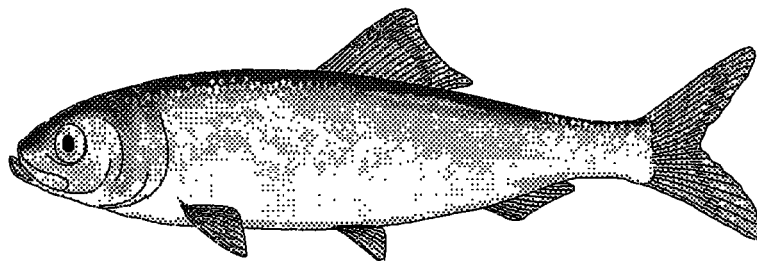
En este primer ciclo reproductivo, los ácidos grasos de la serie n-3 fueron mucho más abundantes que los de la serie n-6 en los grupos con buenos resultados de puestas, 30.1% y 32.5% en los grupos Sep-Feb y Ene-Dic, frente a unos porcentajes, correspondientes a la serie n-6, de 11.8% y de 8.0%, en los mismos grupos. La situación en los grupos con los peores resultados de puestas fue diferente: 23.3% y 23.7% para los ácidos grasos de la serie n-3 en los grupos Feb-Abr y Abr-Sep, y unos porcentajes similares para los ácidos grasos de la serie n-6, 24.3% y 23.4%. Los ácidos grasos de la serie n-9 presentaron en todos los grupos unos porcentajes similares, que oscilaron entre 26% y 27.1%.

Considerados individualmente, los ácidos grasos más abundantes en los lípidos totales de los huevos fueron los monoenos de 18 átomos de carbono (18:1s), el 18:2 n-6, el DHA y el 16:0. De estos el mayor porcentaje correspondió a los 18:1s, que constituyeron un 25% del total de los ácidos grasos presentes en los lípidos. En los grupos que produjeron huevos de buena calidad y con elevadas tasas de eclosión, grupos Sep-Feb y Ene-Dic, el ácido graso más abundante, después de los 18:1s fue el DHA, con porcentajes de 17.6% y 20.3%, respectivamente. A continuación, en estos mismos grupos el ácido graso más abundante fue el 18:2n-6: 10.3% y 6.3%, respectivamente. Ahora bien, la situación se invirtió en los grupos que produjeron huevos de mala calidad (grupo Abr-Sep y Feb-Abr), que poseyeron una mayor proporción de ácido 18:2 n-6 que de DHA. Así el contenido de ácido 18:2 n-6 en estos grupos fue de 21.7% y de 22.6 % mientras que el de DHA fue de solamente el 14.3% y 14.5%.

Las diferencias más importantes de las observadas en la primera época de puesta son aquellas que aparecieron en el contenido de ácidos grasos totales de la serie n-3. Los dos grupos con mejores resultados de puesta, grupos Sep-Feb y Ene-Dic, presentaron en sus huevos, una cantidad de ácidos grasos de la serie n-3 significativamente mayor ($p < 0.05$) que la encontrada en los huevos de los otros dos grupos experimentales, Feb-Abr y Abr-Sep, mientras que las cantidades de PUFA fueron significativamente menores ($p < 0.05$) en los grupos Sep-Feb y Ene-Di, que en los grupos Feb-Abr y Abr-Sep. Al mismo tiempo, el grupo Ene-Dic presentó una cantidad de ácidos grasos de la serie n-6 significativamente menor ($p < 0.05$) que la de los otros grupos experimentales y el grupo Sep-Feb una cantidad también significativamente menor ($p < 0.05$) que la de los grupos Feb-Abr y Abr-Sep. En el grupo Ene-Dic la proporción de ácidos grasos de la serie n-3 con respecto a los de la serie n-6 (relación n-3/n-6) significativamente más elevada

($p < 0.05$) que en los otros grupos. Por su parte, el grupo Sep-Feb mostró una relación n-3:n-6 significativamente menor ($p < 0.05$) que la del grupo Ene-Dic pero significativamente más elevada ($p < 0.05$) que la de los grupos Feb-Abr y Abr-Sep.

Los huevos procedentes de los grupos Feb-Abr y Abr-Sep tuvieron cantidades significativamente mayores ($p < 0.05$) de ácido 18:2 n-6 que los otros dos grupos. En los huevos de los grupos Sep-Feb y Ene-Dic aparecieron unas cantidades significativamente mayores ($p < 0.05$) de los ácidos grasos 18:4 n-3 y EPA que en los grupos Feb-Abr y Abr-Sep. El ácido graso DHA fue significativamente ($p < 0.05$) más abundante en los huevos del grupo Ene-Dic que en los de los otros tres grupos, alcanzando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Este mismo ácido graso apareció en una proporción significativamente mayor ($p < 0.05$) en el grupo Sep-Feb que en los grupos Feb-Abr y Abr-Sep. Las relaciones AA:EPA y DHA:EPA no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.



Arenque

Tabla V.8. Porcentajes de ácidos grasos de los lípidos de los huevos de los distintos grupos experimentales en la primera época de puesta. Medias de 5 a 8 muestras. SEM resultó menor del 5% del valor de la media en todos los casos. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$). *, señala la existencia de más de un monoeno.

	Grupo Sep-Feb	Grupo Feb-Abr	Grupo Abr-Sep	Grupo Ene-Dic
14:0	2.4	1.4	1.7	2.3
15:0	0.3	0.2	0.2	0.3
16:0	12.2	11.8	11.6	12.9
16:1*	7.9	5.5	6.0	8.2
18:0	3.7	4.2	4.4	4.0
18:1*	25.2	25.2	24.7	24.8
18:2 n-6	10.3 ^b	22.6 ^c	21.7 ^c	6.3 ^a
18:3 n-6	0.3	0.3	0.3	0.2
18:3 n-3	1.1 ^c	0.9 ^a	0.9 ^{ab}	1.0 ^{bc}
18:4 n-3	0.9 ^b	0.4 ^a	0.5 ^a	0.8 ^b
20:1*	2.9 ^c	1.6 ^a	1.8 ^{ab}	2.5 ^{bc}
20:4 n-6 (AA)	0.6	0.7	0.7	1.1
20:4 n-3	0.5	0.4	0.4	0.5
20:5 n-3 (EPA)	7.4 ^b	5.4 ^a	5.6 ^a	7.5 ^b
22:1*	0.8	0.4	0.4	0.7
21:5 n-3	0.2	0.1	0.2	0.2
22:5 n-6	0.1	0.1	nd	0.1
22:5 n-3	1.1	0.9	1.0	1.0
22:6 n-3 (DHA)	17.6 ^b	14.5 ^a	14.3 ^a	20.3 ^a
Total Saturados	19.1	18.0	18.3	20.2
Total Monoenos	36.9 ^b	32.8 ^a	33.1 ^a	37.0 ^b
Total Dienos	11.4 ^b	23.6 ^c	22.8 ^c	7.2 ^a
Total PUFA	41.9 ^a	47.6 ^b	47.1 ^b	40.5 ^a
Total n-3	30.1 ^b	23.3 ^a	23.7 ^a	32.5 ^b
Total n-6	11.8 ^b	24.3 ^c	23.4 ^c	8.0 ^a
Total n-9	27.1	26.3	26.0	27.0
n-3 n-6	2.6 ^b	1.0 ^a	1.0 ^a	4.1 ^c
AA EPA	0.1	0.1	0.1	0.1
DHA EPA	2.4	2.7	2.5	2.7

Ácidos grasos presentes en los lípidos de los huevos. Segunda época de puesta.

En la segunda época de puesta (tabla V.9), se observó un descenso generalizado del contenido de PUFA en los huevos de todos los grupos, oscilando sus valores entre el 35.8% del grupo Ene-Dic y el 44.6% del grupo Feb-Abr. No obstante, los PUFA siguieron siendo más abundantes que los ácidos grasos con un menor número de dobles enlaces, excepto en el grupo Ene-Dic, en el que los monoenos presentaron el porcentaje más alto, 32.6%. El contenido de monoenos, de dienos y de ácidos grasos saturados se mantuvo en valores similares a los de la época de puesta anterior.

Igual que en el primer ciclo reproductivo, la cantidad de ácidos grasos de la serie n-3 mostró una relación directa con la calidad de las puestas. Así, el grupo Ene-Dic, con un 28.9% de estos ácidos grasos, fue el que mejores resultados de puestas tuvo. Le siguieron el grupo Sep-Feb, 26.4%, el grupo Abr-Sep, 24.6% y el grupo Feb-Abr, 22.8%. La cantidad total de ácidos grasos de la serie n-6, en particular de ácido linoleico, se incrementó en el grupo Sep-Feb hasta un 14.7% y decreció en los grupos Feb-Abr y Abr-Sep hasta 21.6% y 19.2%, respectivamente. El grupo Ene-Dic el que presentó los valores más bajos de la cantidad total de ácidos grasos de la serie n-6: 6.5%.

Considerando los ácidos grasos individualmente, no se observan variaciones importante con respecto a la primera época de puesta. Conviene destacar, sin embargo, que el porcentaje de ácido 18:2 n-6 se elevó en el grupo Sep-Feb hasta 13.6%, después de que este grupo recibiera el pienso con aceite vegetal durante siete meses. En los otros tres grupos el contenido de este ácido graso descendió, oscilando sus valores entre el 5.2% del grupo Ene-Dic y el 20.2% del grupo Feb-Abr.

El contenido de PUFA observado en el grupo Ene-Dic fue significativamente menor ($p < 0.05$) que el de los otros tres grupos. Por su parte, el grupo Sep-Feb también presentó un valor significativamente menor ($p < 0.05$) que el de los grupos Feb-Abr y Abr-Sep. La cantidad de ácidos grasos de la serie n-3 detectada en los huevos de cada uno de los grupos fue significativamente distinta ($p < 0.05$) en todos ellos. En cuanto a los ácidos grasos de la serie n-6, el grupo Ene-Dic presentó un contenido significativamente menor ($p < 0.05$) que el de los grupos Feb-Abr y Abr-Sep, a la vez que el contenido del grupo Sep-Feb fue también significativamente menor ($p < 0.05$) que el del grupo Feb-Abr. Como resultado de estos cambios únicamente el grupo Ene-Dic presentó valores de la relación n-3/n-6 significativamente mayores ($p < 0.05$) que los de los grupos Feb-Abr y Abr-Sep, no apareciendo diferencias entre los grupos Sep-Feb, Feb-Abr y Abr-Sep.

Las diferencias observadas en la cantidad de ácidos grasos de la serie n-6 se debieron, básicamente, al ácido 18:2 n-6, entre cuyos porcentajes se dieron las mismas diferencias estadísticas que las descritas para los ácidos grasos n-6. Las diferencias observadas para el ácido graso EPA en la primera época de puesta se repitieron en la segunda. En cuanto al porcentaje de DHA, únicamente el grupo Ene-Dic presentó un valor significativamente mayor ($p < 0.05$) que el del grupo Feb-Abr. En la relación DHA:EPA sí que aparecieron ciertas diferencias en esta segunda época de puesta: el grupo Ene-Dic presentó unos valores significativamente menores ($p < 0.05$) que los de los grupos Feb-Abr y Abr-Sep, a la vez que los valores del grupo Sep-Feb fueron también significativamente menores ($p < 0.05$) que los del grupo Abr-Sep.

Tabla V.9. Porcentajes de ácidos grasos de los lípidos de los huevos de los distintos grupos experimentales en la segunda época de puesta. Medias de 5 a 8 muestras. SEM resultó menor del 5% del valor de la media en todos los casos. Para simplificar la tabla no se representó. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$). *, señala la existencia de más de un monoeno.

	Grupo Sep-Feb	Grupo Feb-Abr	Grupo Abr-Sep	Grupo Ene-Dic
14:0	2.2	2.0	1.8	2.3
15:0	0.4	0.4	0.4	0.3
16:0	12.5	13.0	12.6	12.5
16:1*	7.4 ^a	6.5 ^b	6.4 ^b	8.0 ^a
18:0	3.6	3.5	3.7	2.8
18:1*	25.6	24.7	25.4	23.9
18:2 n-6	13.6 ^{ac}	20.2 ^b	17.9 ^{ab}	5.2 ^c
18:3 n-6	2.1	2.4	2.5	1.7
18:3 n-3	0.84	0.82	0.7	0.8
18:4 n-3	1.0	0.8	0.6	1.1
20:1*	3.1	2.2	2.1	3.2
20:4 n-6	0.6	0.5	0.6	0.8
20:4 n-3	0.4	0.4	0.4	0.5
20:5 n-3	6.8 ^a	5.6 ^b	5.8 ^b	7.6 ^a
22:1	0.9	0.6	0.6	1.1
21:5 n-3	0.3	0.2	0.2	0.3
22:5 n-6	0.1	0.1	0.1	0.1
22:5 n-3	1.3	1.0	1.2	1.2
22:6 n-3	16.1 ^{ab}	14.2 ^b	15.8 ^{ab}	17.7 ^a
Total Saturados	18.7	19.0	18.4	17.9
Total Monoenos	37.0 ^a	33.9 ^b	34.4 ^b	36.2 ^{ab}
Total Dienes	13.9 ^{ac}	20.7 ^b	18.4 ^{ab}	5.5 ^c
Total PUFA	41.5 ^a	44.6 ^b	44.0 ^b	35.8 ^c
Total n-3	26.4 ^a	22.8 ^b	24.6 ^c	28.9 ^d
Total n-6	14.7 ^{ac}	21.6 ^b	19.2 ^{ab}	6.5 ^c
Total n-9	23.2 ^{ac}	24.2 ^{ac}	24.7 ^a	22.0 ^{bc}
n-3 n-6	1.9 ^{ac}	1.1 ^b	1.3 ^{ab}	4.4 ^c
AA/EPA	0.1	0.1	0.1	0.1
DHA/EPA	2.4 ^{ac}	2.5 ^{ab}	2.7 ^b	2.3 ^c

3.4.- Análisis de 17 β -estradiol y de Vitelogenina.

Niveles plasmáticos de 17 β -estradiol.

Tal y como se ha explicado en la sección 2.3 del apartado Material y Métodos de este mismo capítulo, de los cuatro grupos experimentales utilizados únicamente se realizaron análisis de Vg y de E2 en los grupos Ene-Dic y Abr-Sep. Cada uno de estos dos grupos fue alimentado con una dieta diferente a lo largo de todo el primer ciclo reproductor. Por lo tanto, estos dos grupos resultaban ideales para observar el efecto de las distintas concentraciones de ácidos grasos de la dieta sobre los niveles plasmáticos de Vg y de E2. Los otros dos grupos, Sep-Feb y Feb-Abr, sin embargo, cambiaron de tratamiento durante la época de puesta.

Las hembras de los grupos Abr-Sep y Ene-Dic mostraron, a lo largo del primer ciclo reproductor, unos perfiles similares en la evolución de los niveles plasmáticos de E2 (Figura V.5). El E2 ya se detectó en plasma en el mes de octubre, aunque todavía en cantidades muy bajas, próximas a cero. Una fuerte elevación, estadísticamente significativa ($p < 0.05$), en la concentración plasmática de esta hormona fue detectada en el mes de noviembre en ambos grupos experimentales. Los valores alcanzados se mantuvieron en los meses de diciembre y enero, sin que se mostraran diferencias significativas a lo largo de este período. Durante los meses de febrero y marzo hubo una bajada estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de los niveles de E2, que ya alcanzaron concentraciones basales en los meses de mayo y junio.

El diferente contenido en EFA de las dietas no dio lugar a la aparición de diferencias estadísticas en los niveles plasmáticos de E2 entre el grupo Ene-Dic y el grupo Abr-Sep a lo largo de este primer período de puesta.

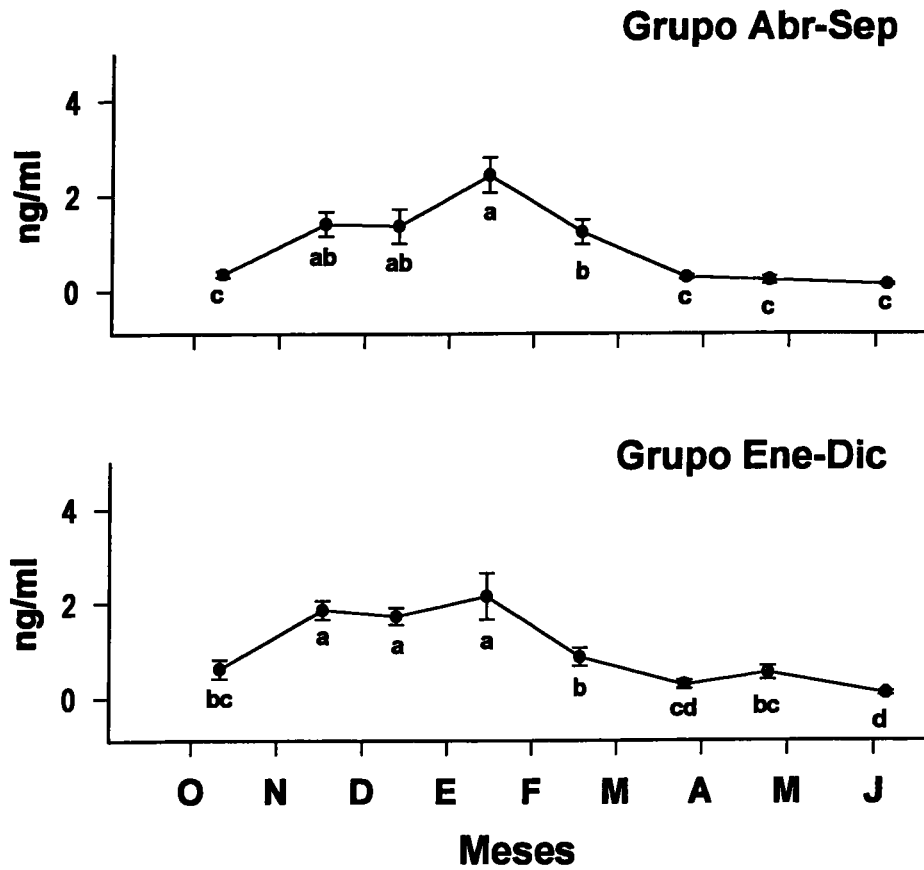


Figura V.5. Niveles plasmáticos de 17 β -estradiol observados en los grupos Abr-Sep y Ene-Dic a lo largo del primer año experimental. En cada punto se representa la media de 10 a 19 animales \pm SEM. Letras minúsculas diferentes señalan diferencias estadísticamente significativas en los niveles de 17 β -estradiol entre los diferentes meses para un mismo grupo. No se observaron diferencias entre los dos grupos ($p < 0.05$).

Niveles plasmáticos de vitelogenina.

Las concentraciones plasmáticas de Vg detectadas a lo largo del primer año experimental en los grupos Abr-Sep y Ene-Dic se representan en la figura V.6.

En el mes de octubre el contenido de Vg plasmática fue muy bajo en ambos grupos. La concentración de esta proteína se incrementó de un modo sostenido a partir de este mes y hasta enero, de modo que en los meses sucesivos, los valores obtenidos fueron significativamente más altos ($p < 0.05$) que en meses anteriores. En febrero y marzo en el grupo Abr-Sep se observaron valores similares a los del mes de enero, mientras que en el grupo Ene-Dic se produjo una disminución significativa ($p < 0.05$) de la concentración plasmática de Vg en febrero. La cantidad de Vg plasmática disminuyó drásticamente en el mes de abril existiendo diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a marzo. Los niveles de Vg continuaron disminuyendo hasta alcanzar, en junio, valores basales similares a los de octubre.

El análisis estadístico de los valores de concentración de Vg plasmática mostró algunas diferencias significativas entre los grupos. Así, el aumento sostenido de los niveles plasmáticos de Vg, del que hemos hablado anteriormente, entre noviembre y enero fue más fuerte en el grupo Ene-Dic, ya que tanto en el mes de noviembre como en el de enero alcanzó valores significativamente mayores ($p < 0.05$) que el grupo Abr-Sep. Sin embargo, en el mes de febrero fue el grupo Ene-Dic el que presentó una concentración de Vg plasmática significativamente menor ($p < 0.05$) que la del grupo Abr-Sep.

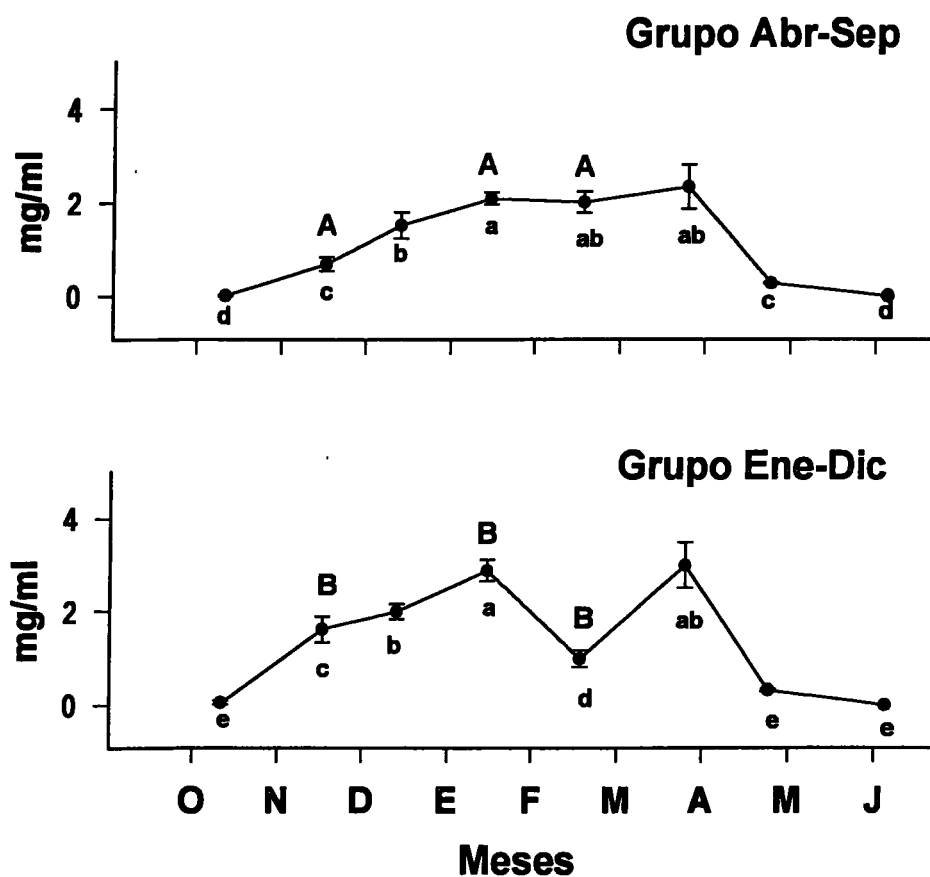


Figura V.6. Niveles de vitelogenina plasmática observados en los grupos Abr-Sep y Ene-Dic a lo largo del primer periodo experimental. En cada punto se representa la media de 10 a 19 animales \pm SEM. Letras minúsculas diferentes señalan diferencias estadísticamente significativas en los niveles de vitelogenina entre los diferentes meses para un mismo grupo. Letras mayúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos dentro de un mismo año ($p < 0.05$).

4.- DISCUSIÓN

4.1.- Resultados de puesta y frecuencia de estados de desarrollo oocitario.

Con la única excepción del grupo Feb-Abr todos los demás grupos exhibieron una clara elevación de la FT en años sucesivos, tal y como se ha observado en las experiencias anteriores. Como ya se ha comentado previamente, este aumento está asociado con incrementos en la edad y el tamaño de las hembras (Bromage *et al.*, 1995; Carrillo *et al.*, 1995a). Igualmente, esa elevación de la FT coincidió con una tendencia a la reducción del diámetro de los huevos con la edad de las hembras. En otras especies, como en los salmónidos (Bromage *et al.*, 1995) o en el pez gato africano (Richter *et al.*, 1995) el incremento de tamaño y fecundidad de las hembras conlleva un aumento del tamaño del huevo. En general estos huevos de mayor tamaño producen larvas también de mayor tamaño que tienen una mayor probabilidad de supervivencia que larvas de menor tamaño provenientes de huevos más pequeños (revisado por Springate y Bromage, 1985; Lagomarsino *et al.*, 1988; Monteleone y Houde, 1990; Chambers y Legget, 1996). También en la lubina se encontró una correlación directa entre el tamaño del huevo y el de la larva (Cerdá *et al.*, 1994b). Sin embargo, las larvas más grandes, al menos en condiciones de cautividad no presentaban una mayor tasa de supervivencia a los cuarenta días de edad que las larvas de un tamaño menor (Cerdá *et al.*, 1994b). Tal y como se apuntó en la experiencia 2 (ver capítulo IV, sección 4.1), es posible que la reducción del tamaño de los huevos esté permitiendo un aumento de la fecundidad, fenómeno que permitiría una mayor probabilidad de supervivencia en la descendencia.

El grupo Feb-Abr mostró una reducción de la FT en la segunda y tercera épocas de puesta con respecto a los otros tres grupos. La FR de este grupo fue también

menor que la de los otros grupos en la tercera época de puesta. Las reducciones de fecundidad han sido atribuidas en la lubina (Cerdá *et al.*, 1994b) así como en trucha arco iris (Washburn *et al.*, 1990) a reducciones en el crecimiento producidas por el bajo contenido proteico de las dietas (Bromage *et al.*, 1990). Sin embargo, en pargo japonés (Watanabe *et al.*, 1984b) se encontró que las reducciones de fecundidad fueron producidas por la calidad de la fuente de proteínas utilizada en la dieta, siendo especialmente importante el suministro de ácidos grasos (Luquet y Watanabe, 1986). En la lubina, Cerdá *et al.* (1995) encontraron que hembras alimentadas con una dieta natural rica en EFA presentaron una FT y FR mucho mayores que aquellas que habían sido alimentadas con dietas artificiales, igual que se ha observado en las experiencias previas del presente trabajo. Puesto que, en el experimento que se está discutiendo, la única diferencia entre las dos dietas utilizadas era su contenido lipídico se corrobora la idea de que deficiencias en la administración de ácidos grasos a los reproductores de lubina a través de la dieta pueden llevar a alteraciones no sólo en la viabilidad de los huevos sino también en la formación de los oocitos, provocando disminuciones de fecundidad.

Con la finalidad de confirmar la existencia de posibles diferencias entre los distintos grupos experimentales en el ritmo de desarrollo ovárico se sacrificaron varias hembras de cada grupo justo antes de la primera época de puesta y se estudió la distribución de frecuencias de tamaño oocitario en las partes anterior, media y posterior del ovario. Ello también sirvió para determinar si todas las partes del ovario se desarrollaban de modo homogéneo. Se encontró que el grupo Feb-Abr presentaba una proporción significativamente mayor ($p < 0.05$) de oocitos en estado de vitelogénesis avanzada junto a los menores porcentajes de oocitos en previtelogénesis e inicio de vitelogénesis. Sin embargo, la cantidad de oocitos en postvitelogénesis fue similar a la del

resto de los grupos. Todos estos datos indican que en el grupo Feb-Abr hay una mayor proporción de oocitos que detienen su desarrollo en el estado de vitelogénesis avanzada, y que, probablemente incrementarán, a posteriori, las tasas de atresia. El distinto ritmo de desarrollo del grupo Feb-Abr está en relación, probablemente, con la disminución de fecundidad observada respecto al resto de los grupos experimentales.

Los datos del análisis de imagen de los oocitos en las distintas partes del ovario mantenidas en fijador de Gilson no mostraron la existencia de un ritmo de desarrollo oocitario distinto a lo largo del ovario. La importancia de este dato radica en el hecho de que permite afirmar que las muestras de oocitos obtenidas mediante canulación intraovárica van a seguir unos patrones de distribución de frecuencias de tamaño o de desarrollo oocitario que reflejarán perfectamente los que aparecen en el conjunto del ovario.

Un aspecto a destacar es el de la elevada fecundidad total calculada a partir del conteo de los oocitos presentes en el ovario. Los valores observados fueron mucho mayores que los de fecundidad total registrada en el momento de las puestas. Este hecho indica que una buena parte de los oocitos que inician su desarrollo no llegan a ser liberados al exterior siendo reabsorbidos de nuevo. En los salmónidos, la atresia es el fenómeno responsable de la reducción masiva del número de oocitos entre el momento en que inician su desarrollo y la ovulación (Bromage y Cumaranatunga, 1988). Los resultados obtenidos en nuestro experimento indican que estas fuertes reducciones de fecundidad también tienen lugar en la lubina y que, muy probablemente, el proceso de atresia juegue un papel fundamental en el desarrollo ovárico.

En la aplicación de un tratamiento nutricional es muy importante tomar en consideración cual es el momento más adecuado, dentro del ciclo reproductivo, para administrar un determinado tipo de dieta a los reproductores. En la dorada la composición de los huevos y la calidad de las puestas se vieron afectadas por los niveles de ácidos grasos de las dietas después de solamente tres semanas de tratamiento (Fernández Palacios *et al.*, 1995). En el pargo japonés, con un período de vitelogénesis muy corto, la composición lipídica de la dieta afectó a la calidad de las puestas de manera inmediata cuando se administró justo antes del período de puesta (Watanabe *et al.*, 1985). Por el contrario, en el salmón coho, en el que el período de vitelogénesis es muy largo, la composición lipídica de los huevos reflejó la de las dietas tras dos meses de tratamiento (Harel *et al.*, 1992).

En la lubina la administración de una dieta rica en EFA entre septiembre y febrero dio lugar a puestas de la misma calidad que las del grupo que recibió esta dieta a lo largo de todo el año. Ello indica que el momento de administración de los ácidos grasos, dentro del ciclo anual de reproducción, es sumamente importante y que los ácidos grasos tomados a través de la dieta a lo largo del período de vitelogénesis pueden ser incorporados de una manera efectiva a los oocitos en formación. El grupo Abr-Sep, en el primer año, debido al momento del inicio del experimento, recibió la dieta rica en EFA durante un período de únicamente dos meses. En el segundo año, sin embargo, esta dieta le fue administrada durante cinco meses completos, aunque fuera del período de vitelogénesis y puesta. La mejora observada en la calidad de los huevos del grupo Abr-Sep en el segundo año, con respecto al primero, indica que los ácidos grasos pueden almacenarse en el cuerpo de las hembras para ser utilizados en la formación de los oocitos cuando resulte necesario. Desde el punto de vista económico, estos resultados suponen

que puede haber un ahorro importante en el coste de las dietas de los reproductores ya que sólo sería necesario administrar una dieta de buena calidad, que puede resultar más cara que otras dietas, durante un período de unos cinco meses, preferentemente durante la vitelogenénesis, para obtener huevos con porcentajes altos de viabilidad y de eclosión.

4.2.- Composición de lípidos y ácidos grasos de los huevos.

Composición lipídica de los huevos.

Los niveles totales de lípidos, así como los de lípidos neutros y los de fosfolípidos detectados en los huevos, en las dos épocas de puesta en las que se llevaron a cabo los análisis de lípidos, no se vieron influidos por el tratamiento alimenticio a que habían sido sometidos los reproductores. Como consecuencia aparecieron diferencias significativas entre todos los grupos experimentales en los resultados obtenidos.

El régimen alimenticio al que fueron sometidos los reproductores tampoco provocó la aparición de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales en las diferentes clases de lípidos polares analizadas. Además, estas clases de lípidos polares mostraron una abundancia relativa similar a la que se encontró en otras especies de peces (Henderson, 1982), siendo la fosfatidilcolina el fosfolípido más abundante seguido, por orden de abundancia, por la fosfatidiletanolamina y el fosfatidilinositol. El porcentaje de esfingomiélinea fue el más bajo resultando cercano a cero.

Un fenómeno que conviene mencionar es el de la aparente asociación que existe entre los niveles elevados de triacilglicerol de los huevos y las bajas tasas de

viabilidad observadas en los grupos Feb-Abr y Abr-Sep en la primera época de puesta y en el grupo Feb-Abr en la segunda época de puesta.

Contenido de ácidos grasos de los huevos.

Tal y como se observó en las dos experiencias anteriores la composición en ácidos grasos de los huevos se vio influida claramente por la de la dieta parental. No obstante los ácidos grasos más abundantes en los huevos fueron los mismos que los observados previamente.

El éxito del proceso reproductor en los peces marinos depende, como se ha mencionado previamente, de un suministro adecuado de ciertos ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) a través de la dieta (Revisado por March, 1992; Watanabe y Kiron, 1995). En particular, los PUFA de la serie n-3 son especialmente importantes, ya que contribuyen de un modo esencial al mantenimiento de la fluidez y estructura de la membrana plasmática (Bell *et al.*, 1986). Los peces marinos presentan en muy baja medida aquellas actividades enzimáticas encargadas de alargar y desaturar los ácidos grasos de 18 átomos de carbono, de modo que los ácidos grasos de 20 y 22 átomos de carbono de la serie n-3 resultan ser esenciales para estas especies y han de ser tomados en la dieta (March, 1992).

En el presente experimento, los mejores resultados de puesta, observados en los grupos Sep-Feb y Ene-Dic, se correspondieron con unos porcentajes de ácidos grasos n-3, en particular DHA y EPA, y una proporción n-3:n-6 en los huevos, más altos que los de los otros grupos. En el segundo ciclo reproductivo el grupo Abr-Sep, después de haber

recibido la dieta rica en EFA durante cinco meses, en la época de previtelogénesis, mejoró los resultados de puesta con respecto al año anterior y con respecto al grupo Feb-Abr. Esta mejoría fue paralela a un incremento del contenido de los huevos en ácidos grasos de la serie n-3, que fue mayor que en el grupo Feb-Abr y a una ligera elevación de la relación n-3:n-6.

Todas estas observaciones son indicativas de que la buena calidad de los huevos de la lubina o de otros peces marinos va a depender no sólo de su contenido en ácidos grasos de la serie n-3 (revisado por March, 1992; Sargent, 1995; Sargent et al., 1995; Watanabe y Kiron, 1995) sino también de que la relación n-3:n-6 sea lo suficientemente elevada. Junto a estos dos factores hay que tomar en consideración las relaciones DHA:EPA y AA:EPA que, tal y como se ha observado en las dos experiencias previas, han de alcanzar los valores adecuados para permitir el normal desarrollo del embrión.

Las diferencias encontradas en la composición en ácidos grasos en los huevos de los diferentes grupos experimentales confirman la idea de que los ácidos grasos administrados a los reproductores durante la época de vitelogénesis pueden ser procesados e incorporados a los oocitos en formación, llegando a modificar la composición de los huevos obtenidos en la época de puesta inmediata. Por otra parte, la mejoría observada en el grupo Abr-Sep en el segundo período de puesta, con respecto al primero, indica que los ácidos grasos pueden acumularse en las reservas del cuerpo de los reproductores para ser desviados hacia la formación de los oocitos en el momento adecuado.

Cuando los resultados de puestas se compararon con los de las experiencias anteriores se observó que las tasas de viabilidad y de eclosión de los huevos se encontraron por debajo de las observadas en el grupo control en el segundo ciclo reproductivo de la experiencia 1 y en ambos periodos de puesta de la experiencia 2. Probablemente este hecho se halla asociado con la menor proporción DHA:EPA encontrada en el presente experimento en los huevos de los grupos alimentados con la dieta rica en EFA, con respecto a la observada en las experiencias 1 y 2 en los huevos de los animales alimentados con una dieta natural.

4.3.- Niveles plasmáticos de 17 β -estradiol y de vitelogenina.

Tal y como se ha explicado en el apartado de Material y Métodos de este mismo capítulo (sección 2.4) los análisis de 17 β -estradiol y de vitelogenina se realizaron únicamente en dos de los cuatro grupos utilizados en el presente experimento. Se eligieron los grupos Ene-Dic y Abr-Sep debido al hecho de que cada uno de ellos recibió, desde casi el comienzo del experimento hasta el final de la época de puesta, un tipo de alimentación diferente: al grupo Ene-Dic se le suministró la dieta rica en EFA, mientras que al grupo Abr-Sep se le dio la dieta pobre en EFA.

Niveles plasmáticos de 17 β -estradiol.

Tal y como se puede observar en las otras experiencias realizadas en este trabajo, los niveles plasmáticos de E2 fueron aumentando paulatinamente a partir del mes de noviembre y se mantuvieron elevados a lo largo de todo el proceso de vitelogénesis que se solapa, en parte, con el período de puesta. Este perfil de los niveles plasmáticos de E2 evidencia la función jugada por este esteroide en la estimulación de la síntesis de Vg en lubina (Mañanós *et al.*, 1994a, b, 1996a). Por otro lado los niveles altos de E2

encontrados durante el período de puesta se hallan en relación con el hecho de que la lubina presenta un ovario de tipo síncrono por grupos (Mayer *et al.*, 1988; Alvariño *et al.*, 1992a) lo que hace que el proceso de vitelogénesis, estimulado por el E2, coincida, en parte, con el período de puesta.

Las diferencias en el contenido en ácidos grasos de las dietas no ocasionaron variaciones en los niveles plasmáticos de E2 entre los grupos Ene-Dic y Abr-Sep. Las alteraciones provocadas por el régimen nutricional en la concentración plasmática de E2 han sido atribuidas, previamente, a la falta de un suministro adecuado de colesterol a través de la dieta (Cerdá *et al.*, 1994a). Esta idea se basa en el hecho de que el colesterol actúa como precursor de los esteroides, de modo que un suministro adecuado de esta sustancia es necesario para que el proceso de esteroideogénesis se desarrolle normalmente (Nagahama, 1983). En la presente experiencia las dos dietas utilizadas presentaron la misma cantidad de lípidos totales, de modo que no es probable que aparecieran diferencias en la cantidad de colesterol de las dietas. Tampoco aparecieron diferencias en los niveles plasmáticos de E2. Por lo tanto, nuestros resultados no contradicen la idea planteada por Cerdá *et al.* (1994) de que la cantidad de colesterol de las dietas está influyendo en los niveles plasmáticos de E2.

En las otras dos experiencias del presente trabajo también se ha tomado en consideración la hipótesis de que las diferencias en los niveles plasmáticos de E2 entre el grupo control y los grupos alimentados con dietas artificiales podrían estar causadas por los elevados porcentajes de ácidos grasos monoenoicos de 20 y 22 átomos de carbono presentes en las dietas artificiales. Niveles elevados de estos ácidos grasos en las dietas administradas a la trucha arco iris provocaron una proliferación de los peroxisomas a nivel

hepático (Henderson *et al.*, 1982; Henderson y Sargent, 1984, 1985). Estos peroxisomas derivan de las membranas del retículo endoplasmático y a sus membranas se asocian muchas de las actividades enzimáticas propias de las membranas del retículo endoplasmático (Berkaloff *et al.*, 1981). Entre estas actividades enzimáticas hay que señalar la de ciertas deshidrogenasas dependientes del citocromo P450 que llevan a cabo muchos de los procesos de síntesis de esteroides. Recientemente se ha demostrado la existencia de peroxisomas a nivel de las células foliculares de trucha arco iris y pez rojo, así como la intervención de estos peroxisomas en los procesos de esteroideogénesis (Mercure y Van der Kraak, 1995b). Elevados porcentajes de ácidos grasos monoenoicos de cadena larga en las dietas podrían provocar una proliferación peroxisomal no sólo en los hepatocitos sino también en las células foliculares, aunque este es un aspecto todavía no estudiado. Este fenómeno podría estar asociado con un aumento de la actividad enzimática encargada de la síntesis de E2 a partir de T y, por lo tanto, con una elevación de los niveles plasmáticos de E2.

En la presente experiencia, la dieta enriquecida con aceite de maíz (pobre en EFA) presentó aproximadamente el doble de ácidos grasos monoenoicos de 20 y 22 átomos de carbono que la dieta enriquecida con aceite de pescado (rica en EFA). Sin embargo, esta diferencia es mucho menor que la encontrada en las otras dos experiencias entre la dieta natural y las dietas artificiales en los niveles de estos dos ácidos grasos. En estas otras experiencias las dietas artificiales tenían valores hasta cinco veces mayores que la dieta natural de estos ácidos grasos. Además, los porcentajes observados en la dieta natural eran muy bajos, encontrándose siempre por debajo del 2%. Por lo tanto, la falta de diferencias entre los niveles plasmáticos de E2 entre el grupo que ingirió una dieta pobre en EFA (grupo Abr-Sep) y el grupo que tomó la dieta rica en EFA (grupo Ene-Dic)

no permite desechar la idea de que las variaciones en los niveles de monoenos de 20 y 22 átomos de carbono de la dieta puedan ocasionar alteraciones en los niveles plasmáticos de E2.

Niveles plasmáticos de Vitelogenina.

La concentración plasmática de Vg evolucionó a lo largo del proceso de vitelogénesis y al principio de la época de puesta de un modo similar a lo observado en las otras experiencias de este mismo trabajo. A partir de los niveles basales del mes de octubre fue aumentando paulatinamente hasta alcanzar la máxima concentración en el mes de enero. Este aumento es similar al que se ha observado en otros trabajos realizados con esta misma especie (Mañanós *et al.*, 1994a, 1996a; Cerdá *et al.*, 1994a). Además, el hecho de que el aumento en los niveles de Vg sea paralelo al del E2 evidencia el papel de este esteroide en la estimulación de la síntesis de Vg (Mañanós *et al.*, 1994a, b; Van Bohemen *et al.*, 1982; Mommsen y Walsh, 1988).

En el mes de febrero la concentración plasmática de Vg se mantuvo en el grupo Abr-Sep y disminuyó en el grupo Ene-Dic. Este descenso ha sido observado previamente y puede estar causado por una disminución de la producción de vitelogenina a nivel hepático (Cerdá *et al.*, 1994). Los elevados niveles que aparecieron en el mes de marzo en ambos grupos fueron debidos a la detección por el ELISA de Vg de las proteínas de vitelo que pasan a la corriente sanguínea durante el proceso de reabsorción de los oocitos que no han llegado a ser liberados al exterior (Mañanós *et al.*, 1996a).

Los niveles registrados fueron similares a los encontrados en la experiencia en la que se varió de manera inespecífica la cantidad de lípidos de la dieta. En las dos

experiencias se utilizaron lubinas de la misma edad, es decir animales que iban a iniciar su primer período de puesta. Además, estos valores fueron similares a los encontrados en otras experiencias en las que también se utilizaron lubinas que iban a iniciar su primer ciclo reproductivo (Mañanós *et al.*, 1994a, 1996a; Cerdá *et al.*, 1994a). Este hecho indica que los elevados niveles observados en la experiencia en la que se aumentó específicamente la cantidad de ácidos grasos ingeridos por los reproductores estuvieron asociados probablemente con una mayor capacidad de síntesis de Vg causada por la mayor edad de las hembras utilizadas, ya que estas últimas tenían dos años más que las de las otras experiencias.

Por otro lado, los niveles de Vg plasmática aumentaron más rápidamente en el grupo alimentado con una dieta rica en EFA, grupo Ene-Dic, que en el grupo que recibió la dieta pobre en EFA, grupo Abr-Sep. Como resultado se alcanzaron valores significativamente mayores ($p < 0.05$) en los meses de noviembre y enero en el grupo Ene-Dic. En la trucha arco iris se ha observado que un aporte deficitario de ácidos grasos esenciales de la serie n-3 provocaba una disminución de los niveles plasmáticos de Vg (Frémont *et al.*, 1984). En la presente experiencia el grupo Abr-Sep recibió a lo largo de este primer ciclo reproductivo una dieta con ciertas deficiencias en EFA, especialmente con una relación n-3:n-6 más baja que la de la dieta rica en EFA con que se alimentó al grupo Ene-Dic. Estas deficiencias se reflejaron en la composición de los huevos. Puesto que la mayor parte de los lípidos de reserva de los huevos son aportados por la Vg (Mellinger, 1995) probablemente la composición en ácidos grasos de la Vg también se vea influida por la de las dietas. Por lo tanto es muy posible que una proporción inadecuada de ácidos grasos influya en el proceso de síntesis de la Vg y, de esta manera, en los niveles plasmáticos de esta glicolipofosfoproteína.

VI

DISCUSIÓN GENERAL

1.- RESULTADOS DE PUESTA.

1.1.- Efecto de la ración.

En una de las experiencias realizadas en el presente trabajo se modificó, de manera inespecífica, la cantidad de lípidos ingerida por los reproductores (Capítulo III). Para ello, además de variar el tipo de dieta de los diferentes grupos de animales, también se redujo en los grupos A (9%, 1/4) y C (15%, 1/4) la ración a la que se administró el alimento, hasta una cuarta parte de la ración normal. Esta disminución de la ración no tuvo un efecto claro sobre la FT o la FR, que mostraron unos valores parecidos a los de los grupos alimentados a ración completa. De hecho, en la segunda época de puesta, uno de los grupos alimentados a 1/4 de ración, el grupo C (15%, 1/4) presentó la FT y la FR más altas de todas las recogidas.

En diversas especies de peces, tales como el bacalao (Kjesbu, 1988), la trucha arco iris (Bromage *et al.*, 1992), el *Melanogrammus aeglefinus* (Hislop *et al.*, 1978) o la platija (Horwood *et al.*, 1989), se ha observado que una fuerte restricción de la dieta, que a veces llegó a una eliminación completa del alimento, da lugar a una disminución de la fecundidad. En una experiencia previa realizada en lubina (Cerdá *et al.*, 1994 a) la reducción de la ración hasta un 0.5% de la biomasa no llegó a afectar a la fecundidad ni tampoco al peso de las hembras o al diámetro de los huevos. Probablemente ello se debió a que la restricción de la dieta no fue lo suficientemente fuerte. En el caso del presente trabajo la ración se redujo hasta un 0.3 % de la biomasa en invierno, pero en verano se mantuvo a los animales a una ración similar a la del experimento de Cerdá *et al.*, (1994 a). Hay que tener en cuenta que la lubina ingiere una gran cantidad de alimento en verano, durante la época de reposo sexual, mientras que en invierno, en la época de actividad

sexual, la ingestión de alimento es muy baja. Todo esto lleva a pensar que los animales acumularon durante el verano una cantidad suficientemente grande de reservas que, después, se utilizó en el momento más adecuado para que no afectara a la fecundidad.

La disminución de la ración no provocó alteraciones en el porcentaje de viabilidad de los huevos, que fue, de hecho, más elevado en los grupos alimentados a ración reducida que en los que se alimentaron a ración completa. El porcentaje de eclosión fue demasiado bajo en todos los grupos alimentados con dietas artificiales como para establecer un posible efecto debido a la ración. En una experiencia previa (Cerdá *et al.*, 1994 a) no se observó que la reducción de la ración provocara una disminución de la calidad de los huevos. En otras especies de peces la cantidad de alimento recibida por los reproductores tampoco tuvo un efecto claro sobre el tamaño de los huevos, su peso o su composición (revisado por Kjorsvik, 1990). Parece ser, por lo tanto, que la lubina y otras especies de peces son capaces de aprovechar los recursos de que disponen, desviándolos y utilizándolos en el momento más adecuado, de modo que la calidad de los huevos no se vea afectada (Cerdá *et al.*, 1994 a; Bromage *et al.*, 1992; Kjorsvik *et al.*, 1990).

1.2.- Efecto de la edad de los reproductores.

En las tres experiencias realizadas se observó un claro incremento de la FT en años sucesivos. En la experiencia en la que se elevó específicamente la cantidad de ácidos grasos esenciales ingerida por los reproductores (Capítulo IV), las FT fueron mayores que las observadas en la experiencia anterior, en la que se varió de manera inespecífica la cantidad de lípidos de la dieta (Capítulo III). Puesto que en ambas experiencias se utilizaron los mismos animales, el aumento de FT observado en la segunda experiencia con respecto a la primera se encuentra en relación con el aumento en el tamaño de las hembras

asociado con la edad. En la lubina ya se había observado que, igual que en otras especies de peces (Revisado por Bromage *et al.*, 1995) se producía un aumento de la FT asociado con la edad y el tamaño de las hembras (Cerdá *et al.*, 1995).

En la primera experiencia realizada (Capítulo III) la FR no solo no sufrió un aumento similar al de la FT sino que disminuyó en años sucesivos. En la siguiente experiencia (Capítulo IV), utilizando los mismos animales, se volvió a observar una disminución de la FR en el segundo año con respecto al primero. Sin embargo, si se tiene en cuenta que en las dos experiencias se utilizaron los mismos animales y siguiendo, en particular, la evolución del grupo control, que fue el mismo en las dos experiencias, se observa un aumento global de la FR en la segunda experiencia, al aumentar la edad y el tamaño de las hembras, con respecto a la primera. Es decir que en la tercera y cuarta épocas de puesta la FR fue mayor que en las dos primeras épocas de puesta en los mismos animales. En la tercera experiencia llevada a cabo, en la que se estudió el momento de administración de los ácidos grasos (Capítulo V), y se observaron los resultados de puesta en tres años consecutivos, hubo un claro aumento de la FR en el segundo año. En el tercer año esta variable presentó valores ligeramente superiores a los del segundo año. En la trucha arco iris se observó que la FR aumentaba de una manera mucho más moderada que la FT (Revisado por Bromage *et al.*, 1992; Bromage *et al.*, 1995). Este hecho llevó a sugerir que en las explotaciones piscícolas un determinado peso total de peces de pequeño tamaño podría producir un mayor número de huevos que el mismo peso total de reproductores más grandes, con los consiguientes beneficios económicos. Sin embargo, en el presente trabajo, el aumento global de la FR observado con la edad parece indicar que, en la lubina, los reproductores de un mayor tamaño resultan los idóneos para conseguir un mayor número de huevos con el menor gasto posible.

1.3- Relación entre el diámetro de los huevos y los valores de fecundidad.

En la primera experiencia realizada (Efecto de la variación inespecífica de la cantidad de lípidos de la dieta, Capítulo III) la elevación de la FT en años sucesivos estuvo acompañada de un aumento global del diámetro de los huevos que, sin embargo, no llegó a ser estadísticamente significativo. Los animales de esta experiencia se utilizaron en la siguiente (Efecto del aumento específico de EFA en la dieta, Capítulo IV), observándose una FT mayor que en la experiencia previa y un aumento de esta FT en años sucesivos. Simultáneamente el diámetro de los huevos fue menor que en la experiencia previa y, además, disminuyó en el segundo año experimental con respecto al primero. En la experiencia sobre el momento de administración de ácidos grasos (Capítulo V) el aumento de la fecundidad también estuvo acompañado de una disminución del diámetro de los huevos.

En otras especies de peces como en los salmónidos (Bromage *et al.*, 1995) o en el pez gato africano (Richter *et al.*, 1995) el aumento de tamaño y fecundidad con la edad está asociado con incrementos en el tamaño de los huevos. En general los huevos grandes producen larvas de mayor tamaño (Cerdá *et al.*, 1994 b; Springate y Bromage, 1985; Lagomarsino *et al.*, 1988; Monteleone y Houde, 1990) que los huevos más pequeños. Las larvas grandes tienen una ventaja inicial a la hora de capturar el alimento y evitar a los depredadores sobre las larvas de menor tamaño (Chambers y Legget, 1996).

En la lubina, bajo condiciones de cautividad (Cerdá *et al.*, 1994 b), no se observaron diferencias asociadas al tamaño en los porcentajes de viabilidad o de eclosión de los huevos, ni tampoco en la supervivencia larvaria a los cuarenta días. Por lo tanto la

reducción del diámetro de los huevos en años sucesivos puede ser un mecanismo que permita un aumento de la fecundidad sin que la viabilidad inicial de huevos y larvas se vea afectada. Un mecanismo similar parece operar también en otras especies de peces (Hayashizaki *et al.*, 1995; Springate y Bromage, 1985).

1.4.- Efecto de la composición de las dietas.

La calidad de las dietas tuvo un efecto claro tanto sobre la FT y la FR como sobre los porcentajes de viabilidad y de eclosión de los huevos. En las dos primeras experiencias llevadas a cabo (Capítulos III y IV, respectivamente) se observó que la dieta natural administrada al grupo control daba lugar a fecundidades mayores y a puestas de mejor calidad que las dietas artificiales. En la lubina ya se ha observado, previamente, una reducción de la calidad de las puestas provocada por la administración de dietas artificiales a los reproductores (Cerdá *et al.*, 1994 a, b; 1995). Los experimentos realizados en pargo japonés (Watanabe *et al.*, 1984 b, c, d, e, g, h; 1989 a, b; 1991 a, b) o en dorada (Fernández-Palacios *et al.*, 1985; Zohar *et al.*, 1995) pusieron de manifiesto la necesidad de que las dietas de los peces marinos presenten unas cantidades de ácidos grasos de la serie n-3 suficientemente altas y, además, en proporciones adecuadas, para que el proceso reproductor se desarrolle normalmente. Estos antecedentes sirvieron para sugerir que el efecto negativo causado por las dietas artificiales en los resultados de puesta de las lubinas podría ser debido a una concentración insuficiente en ácidos grasos de la serie n-3 (Cerdá *et al.*, 1995).

En el presente trabajo los malos resultados de puesta asociados a las dietas artificiales, en las dos primeras experiencias, no parecen ser debidos a un bajo contenido proteico de la dieta, ya que el porcentaje de proteínas en los piensos estuvo por encima

del valor que se considera que no debe afectar a los resultados de puesta en esta especie (Cerdá *et al.*, 1994 b). Por otro lado, las variaciones en la cantidad total de lípidos de las dietas artificiales tampoco provocaron diferencias en la fecundidad o en la calidad de los huevos. La dieta natural presentó una composición en ácidos grasos muy diferente a la de las dietas artificiales, entre las que no se observaron variaciones importantes. Todo ello apunta hacia la composición en ácidos grasos de la fracción lipídica de las dietas como la responsable de las diferencias observadas en los resultados de puesta entre las dietas artificiales y la dieta natural, tal y como señalaron previamente Cerdá *et al.*, (1995).

En la tercera experiencia llevada a cabo (Efecto del momento de administración de EFA, Capítulo V) se observó que la administración de una dieta rica en EFA de la serie n-3 durante un período de tiempo lo suficientemente largo provocaba una clara mejoría de la calidad de los huevos y de los valores de fecundidad obtenidos con respecto a otra dieta con un menor contenido en ácidos grasos de la serie n-3 y una relación n-3/n-6 más baja. Esta experiencia confirmó la influencia positiva, sobre los resultados de puesta, de la administración a los reproductores de lubina de unas cantidades lo suficientemente elevadas y en las proporciones adecuadas de los ácidos grasos de la serie n-3.

1.5.- Efecto del momento de administración de una dieta rica en EFA.

Un aspecto fundamental a tomar en consideración en cualquier tratamiento nutricional es el del momento más adecuado para administrar un cierto tipo de dieta a los reproductores. En trucha arco iris se observó que la fecundidad en el primer ciclo reproductivo se veía afectada cuando al reducir la ración de los reproductores durante los cuatro primeros meses del año anterior al inicio de las puestas (Bromage *et al.*, 1992). La

reducción de la ración en otros períodos del año no tuvo ningún efecto sobre la fecundidad. Del mismo modo que en el caso de la cantidad de alimento las necesidades de un determinado tipo de nutriente, como por ejemplo algunos EFA, también varían, dependiendo del momento del ciclo reproductor en el que se encuentre el animal. Así, por ejemplo, en el salmón coho, que tiene un período de vitelogénesis muy largo, la composición lipídica de los huevos reflejó la de las dietas tras dos meses de tratamiento (Harel *et al.*, 1992). En el caso de la dorada la composición y calidad de los huevos se vieron afectados por los niveles de ácidos grasos de las dietas a las tres semanas de tratamiento (Fernández-Palacios *et al.*, 1995).

En la experiencia acerca del momento de administración de una dieta rica en EFA (Capítulo V) se observó que el grupo que había recibido la dieta rica en EFA entre septiembre y febrero, es decir durante la época de vitelogénesis e inicio de las puestas, dio lugar a puestas de calidad similar a las del grupo que recibió esta dieta a lo largo del año. Este hecho indica que la administración de los EFA durante el período de vitelogénesis permite una incorporación efectiva de estos ácidos grasos a los oocitos en desarrollo con la consiguiente mejora de la calidad de las puestas.

Por otra parte, el grupo Abr-Sep, en el primer año de experimentación no recibió la dieta rica en EFA mientras que en el segundo año se le administró esta dieta durante cinco meses, pero fuera del período de vitelogénesis y puesta. La mejoría observada en la calidad de los huevos de este grupo en el segundo año, con respecto al primero, indica que los ácidos grasos de la dieta pueden pasar a formar parte de las reservas corporales de las hembras para ser utilizados en la formación de los oocitos en el momento más adecuado.

2.- COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LOS HUEVOS.

2.1.- Clases de lípidos presentes en los huevos.

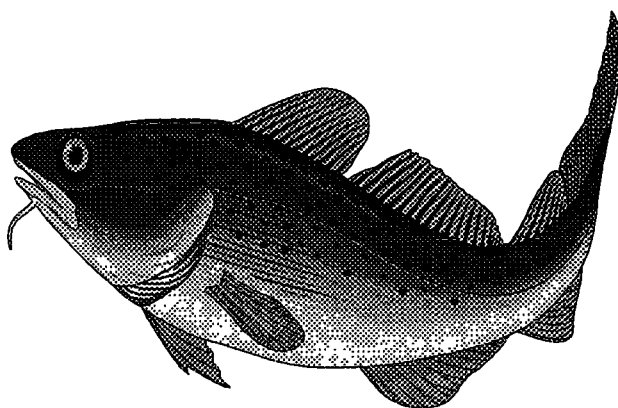
En las tres experiencias realizadas se observó que los huevos de lubina, igual que los de otras especies de aguas cálidas, como el pargo japonés (Watanabe *et al.*, 1984 d, f) o la dorada (Mourente y Odriozola, 1990), presentan unas cantidades mayores de lípidos neutros que de fosfolípidos. Este hecho contrasta con lo observado en especies de aguas frías como el fletán atlántico (Falk Petersen *et al.*, 1989; Bruce *et al.*, 1993) o el bacalao (Tocher y Sargent, 1984).

El orden de abundancia de los fosfolípidos fue el mismo que el observado en otras especies de peces (Revisado por Henderson y Tocher, 1987). El fosfolípido más abundante fue la fosfatidilcolina, seguido por la fosfatidiletanolamina. Los otros lípidos polares observados fueron, por orden de abundancia, el fosfatidilinositol, la esfingomielinea y la fosfatidilserina, pero ya con porcentajes mucho menores.

El porcentaje más alto de lípidos neutros correspondió a los ésteres de ceras, cuya concentración fue más del doble que la de triglicéridos. La principal función de estos ésteres de cera, igual que la de los triglicéridos, es la de servir de fuente de energía (Sargent *et al.*, 1989). Sin embargo el porcentaje de este tipo de lípidos en los huevos varía enormemente de unas especies a otras. Así, por ejemplo, los huevos de algunas especies como el fletán atlántico (Ronnestad *et al.*, 1995), el bacalao, el arenque, el *Gadus virens*, el *Melanogrammus aeglefinus* y el *Ammoytes lanceolatus* (Tocher y Sargent, 1984) carecen de ellos. En otras especies sí que están presentes, como en el mágil (Spener y Sand, 1970) o el rodaballo (Finn *et al.*, 1995). Sin embargo el elevado porcentaje de

estos lípidos en los huevos de lubina es una característica propia de esta especie, en la que los ésteres de cera deben de jugar un papel muy importante en el suministro de la energía necesaria para el desarrollo inicial del embrión y de la larva de la lubina.

La variación de la cantidad total de lípidos de la dieta o de su composición en ácidos grasos solamente provocó la aparición de diferencias en los niveles de los distintos tipos de lípidos polares o de lípidos neutros en la experiencia acerca del efecto de la elevación específica de la cantidad de EFA ingerida por los reproductores (Capítulo IV). En esta experiencia aparecieron diferencias en los niveles de fosfatidilcolina y de esfingomiélinas en los huevos de los diferentes grupos experimentales. Sin embargo no se observó una relación directa entre la composición en fosfolípidos y la calidad de los huevos ya que los mayores porcentajes de fosfatidilcolina y esfingomiélinas correspondieron, indistintamente, a los huevos con los porcentajes más altos, grupo control, o más bajos, grupo A (9%) de viabilidad y de eclosión. Por lo tanto, el efecto causado por las diferentes clases de dietas sobre los resultados de puesta no puede atribuirse a una modificación del contenido de las distintas clases de lípidos en los huevos.



Bacalao

2.2.- Contenido en ácidos grasos de los huevos.

En los huevos obtenidos de los diferentes grupos experimentales en los tres experimentos llevados a cabo los ácidos grasos más abundantes fueron siempre los mismos: 18:1, 16:1, 16:0 y 22:6 n-3 (DHA). Estos ácidos grasos fueron también los más abundantes en los huevos de otras especies marinas como el fletán atlántico (Falk Petersen *et al.*, 1989; Bruce *et al.*, 1993) o la dorada (Izquierdo *et al.*, 1984; Mourente y Odriozola, 1990 a; Fernández-Palacios *et al.*, 1995).

Los porcentajes de ácidos grasos observados en la fracción lipídica de los huevos estuvieron influidos por los porcentajes encontrados en las dietas administradas a los reproductores. En otras especies como el pargo japonés (revisado por Watanabe y Kiron, 1995) o la dorada (Zohar *et al.*, 1995) también se ha observado que el perfil de ácidos grasos de los huevos venía dado, en gran medida, por el de las dietas administradas a los reproductores. En el presente trabajo, además, se vio que este efecto no estuvo influido por la cantidad de lípidos de la dieta. Así, en la experiencia acerca del aumento específico de EFA en las dietas (Capítulo IV) las dietas con el 7% o el 28% de lípidos presentaron el mismo perfil de ácidos grasos, el cual se repitió en los lípidos de los huevos. Por lo tanto el contenido y proporciones de ácidos grasos de los huevos depende, únicamente, de las concentraciones en ácidos grasos presentes en la dieta de los reproductores y no de la cantidad total de lípidos administrada a los reproductores.

Los ácidos grasos de la serie n-3, en particular el DHA y el EPA (20:5 n-3), juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la fluidez y permeabilidad de la membrana plasmática (Bell *et al.*, 1986). Sin embargo, en los peces marinos, los enzimas necesarios para sintetizar el ácido linolénico, 18:3 (n.-3), y para alargar y desaturar este

ácido y formar EPA y DHA o no aparecen o su actividad es muy baja (Sargent *et al.*, 1989). Como resultado estos PUFA han de ser tomados en la dieta y resultan esenciales para estas especies.

Las experiencias llevadas a cabo por Watanabe y sus colaboradores en pargo japonés pusieron de manifiesto que la calidad de los huevos y de las larvas estaba relacionada con su contenido en ácidos grasos de la serie n-3 y, en particular, con el contenido en DHA y EPA (revisado por Watanabe y Kiron, 1995; Luquet y Watanabe, 1986). Sin embargo, recientemente, se ha observado que en dorada no existe una relación directa entre la calidad de los huevos y su contenido en ácidos grasos de la serie n-3, ya que para concentraciones altas de estos ácidos grasos se producía una reducción de la tasa de eclosión (Fernández-Palacios *et al.*, 1995). Este hecho lleva a pensar que la cantidad total de ácidos grasos de la serie n-3 presente en los huevos no puede ser tomado como un criterio único de su calidad.

Además de las cantidades absolutas de ácidos grasos presente en los huevos hay otro factor que algunos autores han señalado como sumamente importante en la determinación de la calidad de huevos y larvas: las proporciones DHA:EPA y n-3:n-6 (Sargent *et al.*, 1995).

Los dos HUFA de la serie n-3, el DHA y el EPA, poseen una estructura muy parecida. Sin embargo diversos trabajos han evidenciado que el DHA tiene una mayor importancia funcional que el EPA. Experiencias llevadas a cabo en larvas de dorada (Koven *et al.*, 1993), pargo japonés (Watanabe *et al.*, 1989 a) y *Pseudocaranx dentex* (Watanabe *et al.*, 1989 b) mostraron que en los lípidos había una incorporación preferente

del DHA sobre el EPA. Este mismo efecto también se observó en el contenido lipídico total de los huevos de trucha arco iris que habían sido mantenidas con una dieta deficiente en ácidos grasos de la serie n-3 (Frémont *et al.*, 1984). La importancia del DHA también se pone de manifiesto por el hecho de que en los huevos de los peces marinos el DHA es más abundante que el EPA (Watanabe, 1993). El DHA es especialmente abundante en los tejidos neuronales, retina y cerebro de los peces marinos (Bell y Dick, 1991). Puesto que los ojos y el tejido neuronal forman una parte importante de la masa inicial del embrión, probablemente una deficiencia en este ácido graso puede dar lugar a problemas en el desarrollo del embrión o de la larva. La importancia del DHA es debida muy posiblemente a la estabilidad conformacional que el alto número de dobles enlaces proporciona a su molécula (Sargent *et al.*, 1993), la cual aparece formando una estructura helicoidal compacta con una longitud total incluso menor que la de un ácido saturado como el 18:0 (Applegate y Glomsett, 1986).

En la experiencia consistente en la variación inespecífica de la cantidad de lípidos administrados a los reproductores (Capítulo III) se observó en las dos épocas de puesta estudiadas una clara relación entre la proporción DHA:EPA de los huevos y su calidad. En el grupo B (rico en n-3) de la segunda experiencia llevada a cabo (aumento específico de la cantidad de EFA en la dieta) se elevó la cantidad de DHA de la dieta hasta niveles muy altos. Ello produjo, en los huevos de este grupo, niveles de DHA similares a los de los huevos del grupo control. Sin embargo la tasa de eclosión de estos huevos fue muy baja, en asociación con una baja relación DHA:EPA. Todos estos resultados indican que en la lubina el desarrollo embrionario normal depende, en gran medida, de una relación DHA:EPA adecuada.

Como se ha mencionado antes, los ácidos grasos de la serie n-3 juegan, en los peces marinos, un papel muy importante en el mantenimiento de la funcionalidad de la membrana plasmática (Bell *et al.*, 1986). La importancia de estos ácidos grasos queda patente por el hecho de que su proporción aumenta en los órganos de los peces a medida que se eleva la salinidad (Borlongan y Benítez, 1992) o bien a medida que disminuye la temperatura (March, 1992). Estos ácidos grasos compiten con los de la serie n-6 por entrar a formar parte de los fosfolípidos. Por lo tanto, además de la cantidad total de ácidos grasos de la serie n-3 es necesario tomar en consideración la relación n-3:n-6.

En la primera experiencia llevada a cabo (efecto del aumento inespecífico de la cantidad de lípidos de la dieta) se observó un fuerte aumento de la tasa de eclosión en el grupo control en el segundo año con respecto al primero. Esta elevación fue, en parte, debida a una mejora del método de trabajo, pero también estuvo acompañada por un incremento de la relación n-3:n-6. En la tercera experiencia (efecto del momento de administración de EFA) la dieta rica en EFA presentó una relación n-3:n-6 más alta que la dieta pobre en EFA. Los grupos que recibieron la dieta rica en EFA durante el período de vitelogénesis- inicio de puestas (grupo Sep-Feb) o durante todo el año (grupo Ene-Dic) produjeron huevos con una tasa de viabilidad y de eclosión mayores que las de los otros dos grupos. La mayor calidad de los huevos de estos grupos estuvo asociada con un mayor contenido de ácidos grasos de la serie n-3 y con un valor mayor de la relación n-3:n-6. En la segunda época de puesta de esta tercera experiencia, el grupo Abr-Sep, después de haber recibido la dieta rica en EFA durante cinco meses, presentó unas tasas de viabilidad y de eclosión mayores que las del año anterior y que las del grupo Feb-Abr. Este efecto estuvo asociado con un mayor contenido de ácidos grasos de la serie n-3. Además, la cantidad media de estos ácidos grasos fue mayor en los grupos con mayores

tasas de viabilidad y eclosión, es decir, por orden creciente, en los grupos Sep-Feb y Ene-Dic. La mejoría de la calidad de los huevos del grupo Abr-Sep fue también simultánea a un ligero aumento de la relación n-3:n-6 y a una clara elevación de la relación DHA:EPA que alcanzó valores significativamente diferentes ($p < 0.05$) de los observados en los otros tres grupos. Todos estos hechos sugieren que la cantidad de ácidos grasos de la serie n-3 junto con las relaciones n-3:n-6 y DHA:EPA de la fracción lipídica de los huevos juegan un papel muy importante en la determinación de su calidad.

En repetidas ocasiones se ha hecho referencia a la necesidad de la administración a los reproductores de una cantidad de ácidos grasos de la serie n-3 lo suficientemente elevada y en la proporción adecuada para obtener puestas de buena calidad (Watanabe, 1993; March 1992; Watanabe y Kiron, 1995; Sargent, 1989, 1994). Sin embargo, se ha profundizado muy poco en el estudio de las necesidades de los ácidos grasos de la serie n-6. De entre estos ácidos grasos el ácido araquidónico, (AA, 20:4 n-6) resulta sumamente importante, ya que es el precursor de algunos eicosanoides, en concreto de los leucotrienos de la serie 4 y de los prostanoïdes de la serie 2. Por su parte el EPA es el precursor de la leucotrienos de la serie 5 y de los prostanoïdes de la serie 3. Sin embargo los eicosanoides derivados del EPA son biológicamente mucho menos activos que los derivados del AA. Puesto que el EPA y el AA compiten por los mismos enzimas en la formación de los eicosanoides, una proporción inadecuada entre ellos podría dar lugar a una inhibición competitiva de los eicosanoides más activos derivados del AA y a una depresión de las funciones celulares ejercidas por estas sustancias (Sargent *et al.*, 1995).

La administración de una cantidad demasiado pequeña de AA puede tener un efecto negativo sobre la formación de prostaglandinas como se vio en juveniles de rodaballo alimentados con dietas con un bajo contenido en AA (Bell *et al.*, 1995). Los autores sugirieron que, dado el amplio rango de funciones llevadas a cabo por estas sustancias, la fisiología general del individuo podría verse afectada.

En las dos primeras experiencias realizadas existía una clara diferencia en el contenido en AA y en la relación AA:EPA entre la dieta natural del grupo control y las dietas artificiales administradas al resto de los grupos experimentales. En ambos experimentos se observó que la cantidad de AA de los huevos y la relación AA:EPA estaba directamente relacionada con lo observado en la dieta, lo que confirmó la esencialidad de este ácidos graso. Además, los mejores resultados de puesta encontrados en el grupo control estuvieron asociados con un porcentaje de AA y una proporción AA:EPA mayores.

En conjunto, los resultados obtenidos en las tres experiencias del presente trabajo indican que el contenido en ácidos grasos de la fracción lipídica de los huevos va a estar fuertemente influido por la proporción de ácidos grasos administrados a los reproductores de lubina a través de la dieta. Además, la calidad de los huevos va a depender de la presencia en su fracción lipídica de unas cantidades de ácidos grasos de la serie n-3, así como de unas relaciones n-3:n-6, DHA:EPA y AA:EPA lo suficientemente altas.

3.- NIVELES PLASMÁTICOS DE GtHII, DE 17 β -ESTRADIOL Y DE VITELOGENINA.

3.1.- Niveles plasmáticos de GtHII.

La variación de la concentración plasmática de GtHII a lo largo del ciclo reproductivo en peces ha sido establecida únicamente en algunas especies de salmónidos (Prat *et al.*, 1996; Sumpter *et al.*, 1991; Swanson, 1991) y en el pez rojo (Kobayashi *et al.*, 1988). En el presente trabajo se describen, por primera vez, los niveles plasmáticos de GtHII a lo largo del ciclo reproductivo en una especie con un ovario de tipo sincrono por grupos, como es la lubina.

Los niveles plasmáticos de GtHII se mantuvieron bajos durante la época de vitelogénesis y hasta el comienzo de la época de puesta, es decir, de octubre a diciembre. Los niveles de esta hormona fueron aumentando desde el inicio de la época de puesta y alcanzaron los máximos valores en el punto medio del período de puesta. En los salmónidos (Suzuki *et al.*, 1988; Swanson, 1991; Kobayashi *et al.*, 1987 a; Sumpter y Scott, 1989) y en el pez rojo (Kobayashi *et al.*, 1987 b; 1988) el crecimiento de los oocitos tiene lugar con unos niveles plasmáticos de GtHII bajos, que se elevan claramente en el momento de la ovulación para descender después. La lubina tiene un ovario de tipo sincrono por grupos (Mayer *et al.*, 1988; Alvaríño *et al.*, 1992 a) en el que pueden aparecer oocitos en estados de desarrollo muy diferentes. Como resultado, en un grupo de hembras, el punto medio del período de puestas será el momento en el que un mayor número de oocitos coincidan en el estado de maduración. Los niveles bajos de GtHII observados antes del inicio de las puestas, la elevación de los niveles de esta hormona cuando las puestas comenzaron, es decir en el momento en que algunos grupos de oocitos

iniciaron la maduración y la ovulación, y el pico observado en el punto medio del período de puesta apoyan la idea de que la GtHII tiene una función fundamental en el control del proceso final de maduración oocitaria y de ovulación, de un modo similar a lo descrito en otras especies de peces (Swanson, 1991; Swanson *et al.*, 1991; Sumpter y Scott, 1989).

Los niveles bajos iniciales de GtHII estuvieron asociados con una paulatina elevación de la concentración de E2 que se hizo especialmente patente en los grupos alimentados con dietas artificiales. Es posible que el E2 estuviera ejerciendo un efecto de retroalimentación negativa sobre la secreción de GtHII, lo que ocasionaría los bajos niveles detectados. La desensibilización de las células secretoras de GtHII ocasionaría la secreción repentina de esta hormona en el momento de la maduración. Un mecanismo similar ha sido descrito previamente en mamíferos (Schwartz, 1995; Goodman *et al.*, 1980). En los peces existen evidencias de que opera un mecanismo similar. Así, por ejemplo, en salmón coho, inyecciones intraperitoneales de E2 dieron lugar a niveles hipofisarios de GtHII más elevados que en los controles, inyectados con suero salino, mientras que los niveles plasmáticos de GtHII fueron significativamente ($p < 0.05$) menores que en los animales controles (Benfey *et al.*, 1989). Los autores atribuyeron este efecto a una inhibición de la liberación de GtHII desde la pituitaria por los estrógenos. Diversos estudios llevados a cabo en individuos inmaduros de salmónidos y anguila europea han mostrado que el E2 y la T estimulan la síntesis de GtHII a nivel de la pituitaria pero que no tienen ningún efecto sobre su liberación (Revisado por Peter, 1982; Kah, 1986). En el pez rojo el efecto negativo de los esteroides sobre la secreción de GtHII se debe a una estimulación de la recuperación de dopamina, lo que favorece su acción inhibidora de la secreción de GtHII (Trudeau *et al.*, 1991 a; 1993).

Una vez que el efecto inhibitor ha desaparecido los esteroides pueden jugar un papel estimulador de la secreción de GtHII. Así, en la lubina los implantes de E2 y T provocaron un incremento de los niveles hipofisarios de GnRH (Zanuy, Carrillo, Mateos, Trudeau, Kah, 1997. Resultados sin publicar). El E2 y la T favorecieron la secreción de la GtH estimulada por la GnRH en el pez rojo (Trudeau *et al.*, 1991 b) y la T tuvo este mismo efecto en carpa y en *Paramisgurnus dabryanus* (Trudeau *et al.*, 1991 c).

Los datos obtenidos en el presente trabajo sugieren que en los reproductores de lubina los esteroides ejercen una acción inhibitora sobre la secreción de GtHII, para favorecer, finalmente su liberación. La elevación de los niveles de E2, al comienzo del ciclo estudiado coincide con los niveles bajos de GtHII, lo que indicaría una acción inhibitora inicial del E2. En la lubina se ha observado que los niveles hipofisarios de GnRH descienden durante la época de puesta (Kah *et al.*, 1994). Este hecho está relacionado con una liberación de la GnRH que tiene un efecto positivo sobre la secreción de GtHII. Los niveles elevados de E2 detectados en el momento medio del período de puesta estarían favoreciendo la secreción de GtHII estimulada por la GnRH lo que explicaría la fuerte elevación de los niveles de GtHII en este momento.

El efecto estimulante del E2 sobre la secreción de GtHII explicaría las diferencias observadas entre el grupo control y los grupos A (9% de lípidos) y B (rico en n-3) alimentados con dietas artificiales. Los mayores niveles de E2 observados en estos dos últimos grupos provocarían una mayor secreción de GtHII en el momento de la maduración, lo que originaría las diferencias entre estos grupos y el grupo control en los niveles plasmáticos de GtHII. En el caso del grupo C (28 % de lípidos) es posible que los altos niveles de E2 estén provocando también un aumento de la síntesis de GtHII pero que

su liberación no tenga lugar de un modo puntual como en los grupos A y B sino que, por algún tipo de factor, se esté provocando un retraso en la liberación de esa GtHII lo que originaría el segundo pico observado en este grupo.

3.2.- Niveles plasmáticos de 17 β -estradiol.

En las tres experiencias llevadas a cabo los niveles plasmáticos de E2 aumentaron a partir del mes de noviembre hasta, aproximadamente, el punto medio del período de puesta, para disminuir a continuación. El incremento de la concentración plasmática de E2 se produjo durante el proceso de vitelogénesis y fue paralelo al aumento de los niveles de vitelogenina plasmática. Este hecho denota el papel fundamental que el E2 juega en la estimulación de la síntesis de la Vg en la lubina (Mañanós *et al.*, 1994 a, b) de modo similar a otras especies de vertebrados ovíparos (revisado por Mommsen y Walsh, 1988).

La lubina presenta un ovario de tipo sincrónico por grupos en el que aparecen oocitos en diversos estados de desarrollo (Mayer *et al.*, 1990; Alvariño *et al.*, 1992). Por lo tanto, dado el papel jugado por el E2 en el mantenimiento del proceso de vitelogénesis, los niveles medios de E2 detectados en un grupo de lubinas se han de mantener elevados a lo largo de toda la época de puesta. Los perfiles observados en el presente trabajo corroboran este planteamiento y son similares a los observados previamente en la lubina europea (Prat *et al.*, 1990; Cerdá *et al.*, 1994 a) o en la lubina americana, que también presenta un ovario de tipo sincrónico por grupos (Blythe *et al.*, 1994).

En las dos primeras experiencias realizadas (Capítulos III y IV) se observó que, a lo largo del proceso de vitelogénesis, el grupo control presentó valores más bajos de E2 en plasma que los grupos alimentados con dietas artificiales llegando a alcanzarse diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Cerdá *et al.*, (1994 a) encontraron que la reducción de la ración con la que se administraba una dieta natural a reproductores de lubina estaba asociada con una disminución de los niveles plasmáticos de E2. Puesto que, para la síntesis de los esteroides es necesario un aporte adecuado de colesterol (Nagahama, 1983), Cerdá *et al.* (1994 a) supusieron que, en el grupo alimentado a ración reducida, una deficiencia nutricional podría causar unos bajos niveles de colesterol que, a su vez, ocasionaría una reducción de los niveles plasmáticos de E2. En nuestras experiencias, dada la menor cantidad de lípidos ingerida por los animales del grupo control, una explicación similar podría ser válida. Sin embargo, los mejores resultados de puesta y los niveles de Vg plasmática suficientemente altos del grupo control sugieren que la concentración de E2 de este grupo es fisiológicamente normal y que debe de existir algún factor que determine en los otros grupos la elevación observada de la concentración plasmática de E2.

Las dietas artificiales presentaron una concentración de ácidos grasos monoenoicos de 20 y 22 átomos de carbono hasta diez veces mayores que en la dieta natural. En la trucha arco iris (Henderson y Sargent, 1984, 1985; Henderson *et al.*, 1982) se ha observado que la situación fisiológica anormal provocada por la elevada concentración de los ácidos grasos erúcico (20:1 n-9) y cetoleico (22:1 n-11) en las dietas administradas a los reproductores daba lugar a una proliferación peroxisomal a nivel hepático.

Los peroxisomas se producen a partir de las membranas del retículo endoplasmático liso y mantienen en sus membranas muchas de las actividades enzimáticas asociadas a las membranas del retículo endoplasmático (Berkaloff et al., 1981). Entre estas enzimas aparecen las reductasas dependientes del citocromo P450 que llevan a cabo buena parte de las reacciones del metabolismo de esteroides. Recientemente se ha observado que los peroxisomas también aparecen en las células foliculares de los teleósteos y que intervienen en el proceso de esteroideogénesis (Mercure y Van der Kraak, 1995 b). Dados todos estos precedentes la elevación de los niveles de E2 observada en las hembras de los grupos alimentados con dietas artificiales podría estar causada por una proliferación peroxisomal a nivel de las células de la granulosa ocasionada por la elevada concentración de ácidos monoenoicos de cadena larga administrados a través de las dietas.

3.3.- Niveles plasmáticos de Vg.

Los valores de Vg detectados en plasma fueron elevándose a lo largo de toda la época de vitelogénesis. Comenzaron a aumentar a partir del mes de noviembre y alcanzaron los máximos valores en los meses de enero-febrero, en el período de vitelogénesis que se solapa con la época de puesta. Un incremento similar ha sido observado previamente en grupos de lubina mantenidos en cautividad (Mañanós *et al.*, 1994 b; Cerdá *et al.*, 1994 a).

En la primera experiencia realizada (variación inespecífica de la cantidad de lípidos ingerida por los reproductores, Capítulo III) se observó que el grupo alimentado con una dieta natural presentó valores de Vg plasmática significativamente mayores ($p < 0.05$) que los de los grupos alimentados con dietas artificiales. En la trucha se vio que una deficiencia en la administración de ácidos grasos de la serie n-3 a través de la dieta

provocaba una disminución significativa de los niveles plasmáticos de Vg (Frémont *et al.*, 1984). En nuestra experiencia, la dieta natural presentó una mayor cantidad de ácidos grasos de la serie n-3 así como una mayor relación DHA:EPA que las dietas artificiales. Puesto que la composición en ácidos grasos de los huevos reflejó la de las dietas y la Vg es el principal precursor del vitelo, muy probablemente la variación de la concentración de ácidos grasos en la dieta también afectó a la composición en ácidos grasos de la Vg. Particularmente la relación DHA:EPA debe de influir fuertemente en la composición de la Vg puesto que en cuatro especies diferentes de teleósteos se ha observado que el DHA y el EPA constituyen alrededor del 50% del total de ácidos grasos de la Vg (Silversand *et al.*, 1995). Por lo tanto, los reducidos niveles plasmáticos de Vg de los grupos alimentados con dietas artificiales pudieron ser debidos a un suministro deficiente a través de las dietas de los ácidos grasos de la serie n-3 y, en particular, a una relación DHA:EPA inadecuada.

Esta hipótesis se vio corroborada en la tercera experiencia realizada, consistente en la variación del momento de administración de ácidos grasos. En esta tercera experiencia se utilizaron lubinas de la misma edad que en la experiencia citada y estuvieron sometidas a las mismas condiciones de cultivo. Las diferencias más importantes entre las dietas utilizadas fueron su contenido en EFA, particularmente de la serie n-3 y la relación n-3:n-6, que fueron mayores en la dieta rica en EFA, mientras que el contenido en otros nutrientes fue exactamente el mismo en las dos dietas. El grupo que recibió la dieta rica en EFA durante todo el año presentó valores de Vg plasmática mayores que los del grupo alimentado con la dieta pobre en EFA. Todos estos hechos indican que la administración de cantidades bajas o en proporciones inadecuadas de los ácidos grasos de la serie n-3 puede dar lugar a una disminución de los niveles de Vg detectados en plasma.

En la segunda experiencia (elevación de la cantidad de ácidos grasos esenciales ingerida por los reproductores) se alcanzaron valores de Vg plasmática mucho mayores que los de las otras experiencias de este trabajo o que los observados por otros autores (Mañanós *et al.*, 1994 a, 1996 a; Cerdá *et al.*, 1994 a). Este hecho probablemente estuvo relacionado con el elevado tamaño de los animales utilizados en esta experiencia, que eran dos años más viejos que los de las otras experiencias realizadas. Además, los elevados niveles de Vg debieron de estar asociados con la necesidad de un aporte adecuado de reservas que permitiera el desarrollo necesario del ovario para alcanzar las altas fecundidades registradas en los distintos grupos de esta experiencia.

En este segundo experimento, la dieta natural no provocó una elevación clara de la Vg plasmática con respecto a las dietas artificiales. De hecho, al contrario de lo observado en las otras experiencias, el grupo A (9%) llegó a presentar en diciembre valores significativamente mayores que los del grupo control. Este fenómeno podría ser debido a que las mayores concentraciones plasmáticas de E2 observadas en este grupo dieran lugar a la movilización de las reservas acumuladas de las que carecían los reproductores de años más jóvenes que también eran de menor tamaño. Por otra parte, los elevados niveles de Vg plasmática no estuvieron asociados con una mejora sustancial de las puestas. Ello indica que la calidad de los huevos depende en gran medida de la calidad y composición de las reservas acumuladas, de modo que incluso niveles altos de Vg que, probablemente, estuvieron asociados con la acumulación de una cantidad suficiente de reservas, no dieron lugar a huevos de buena calidad.

4.- ESQUEMA FINAL.

Como colofón final a este trabajo aparece un esquema (figura VI.I) en el que se pretende representar todo el conjunto de factores que han sido estudiados en la presente memoria y que parecen tener un efecto modulador sobre el proceso reproductor. Los resultados obtenidos en nuestros experimentos evidencian la influencia de la composición en ácidos grasos de las dietas sobre los factores hormonales que regulan el proceso reproductor y sobre el número y calidad de los huevos obtenidos. A su vez, la edad de los reproductores y la duración y época de administración afectan de una manera general a todo el conjunto de mecanismos que intervienen en la reproducción.

Dentro de la composición en ácidos grasos de la fracción lipídica de las dietas se ha visto que en particular las relaciones DHA:EPA, AA:EPA y n-3:n-6 influyen fuertemente en la síntesis hepática de Vg y su composición en ácidos grasos. A través de la Vg que entra en los oocitos los ácidos grasos de la dieta modulan la composición en ácidos grasos de los huevos. A su vez, la fecundidad y las tasas de viabilidad y de eclosión de los huevos parecen depender de que en la fracción lipídica de estos huevos las relaciones DHA:EPA, AA:EPA y n-3:n-6 sean lo suficientemente elevadas. El AA, como precursor de ciertos eicosanoides, de una manera generalizada, regula la secreción hormonal tanto a nivel cerebral como hipofisario y gonadal. Los ácidos grasos monoenoicos de cadena larga podrían estar estimulando la producción de E2 en los folículos ováricos. Este E2 estimula la síntesis de Vg en los hepatocitos y tiene un efecto bifásico sobre la secreción de GtHII ya que estimula la producción de GtHII a la vez que inhibe su liberación desde la hipófisis. La desensibilización de las células de la hipófisis frente al efecto inhibitorio del E2 provocaría la liberación masiva de la GtHII. Por su parte, la GtHII estimula la maduración oocitaria y la ovulación en los ovarios.

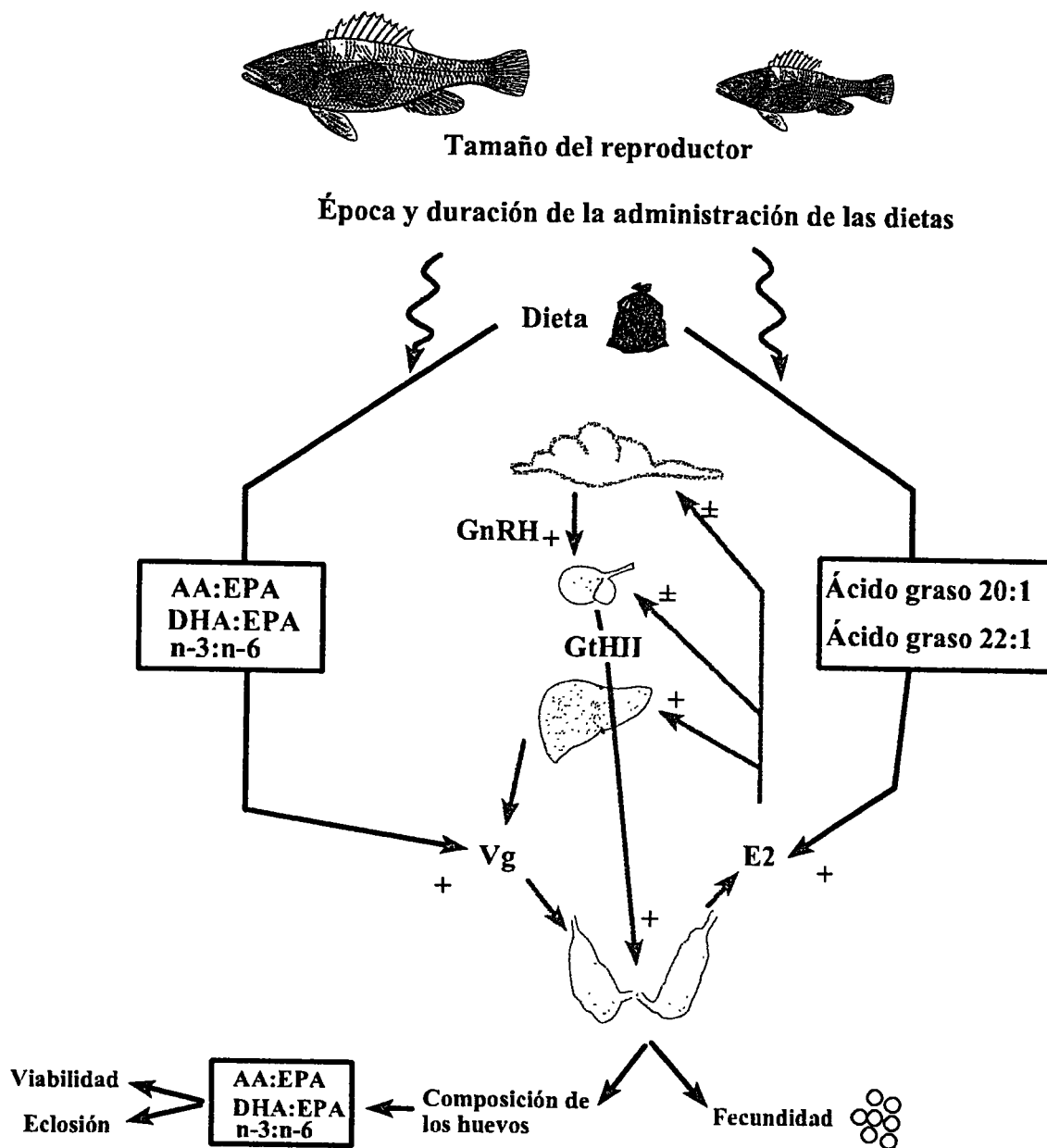


Figura VI.1. Esquema de los efectos e interacciones observadas en el presente trabajo entre el tamaño del reproductor, la época y duración de la administración de las dietas y la composición de las mismas sobre los mecanismos hormonales que regulan la reproducción y sobre los resultados de puesta. Signo + indica estimulación y el signo -, inhibición.

VII

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

1. Las proporciones de ácidos grasos de la dieta y, en particular, unas relaciones DHA:EPA, AA:EPA y n-3: n-6 inadecuadas pueden provocar alteraciones del desarrollo ovárico que den lugar a una reducción de la fecundidad. Esto se deduce del hecho de que los valores de fecundidad observados mostraron una fuerte variación de unos grupos a otros dependiendo de la calidad de las dietas administradas. A su vez, la calidad de las dietas, estuvo determinada, en gran medida, por la composición en ácidos grasos.
2. En la lubina, como en otras especies de peces, la fecundidad total se eleva de modo paralelo al aumento del tamaño de las hembras que se produce con la edad. La fecundidad relativa también se incrementa globalmente con la edad de las hembras, si bien de un modo más moderado que la fecundidad total.
3. La cantidad total de lípidos del huevo de la lubina, así como las proporciones de los diferentes tipos de lípidos polares y de lípidos neutros son independientes de la cantidad total de lípidos administrados a través de la dieta o de su composición en ácidos grasos.

4. El perfil de concentraciones de ácidos grasos observado en la fracción lipídica de los huevos y, en particular, las relaciones DHA: EPA, AA: EPA y n-3: n-6 están fuertemente influidas por las concentraciones de ácidos grasos presentes en los lípidos de las dietas.
5. En la lubina, la calidad de los huevos, medida como las tasas de viabilidad y de eclosión, está determinada, en gran medida por las proporciones DHA: EPA, AA: EPA y n-3: n-6. Un equilibrio inadecuado entre todos estos ácidos grasos, de modo que las relaciones citadas alcancen valores demasiado bajos, da lugar a la aparición de huevos de mala calidad.
6. Los ácidos grasos administrados a los reproductores de lubina a lo largo del proceso de vitelogénesis pueden ser procesados e incorporados a los oocitos en formación. Como consecuencia, un tratamiento nutricional que esté basado en la alteración de la concentración de ácidos grasos de la dieta, aplicado durante el período de vitelogénesis va a tener un efecto claro sobre la composición en ácidos grasos de los huevos y sobre su calidad, en la época de puesta inmediatamente posterior.

7. La administración de ácidos grasos a través de la dieta a los reproductores de lubina durante un período de cinco meses, previamente al inicio del proceso de vitelogénesis, permite el almacenaje de estos ácidos grasos y su incorporación a los oocitos en formación durante el proceso de vitelogénesis, de modo que llega a afectar a la composición en ácidos grasos y a la calidad de los huevos obtenidos en la época de puesta siguiente.

8. La GtHII tiene, en la lubina, probablemente una función básicamente reguladora de los procesos de maduración oocitaria y de ovulación. Los bajos valores observados en los niveles plasmáticos de esta hormona a lo largo del proceso de vitelogénesis y la elevación de su concentración en plasma a partir del inicio de las puestas, para alcanzar el máximo en el punto medio del período de puesta son acordes con esta idea.

9. El incremento de los niveles plasmáticos de 17β -estradiol observados a lo largo del período de vitelogénesis coincidieron con unas concentraciones reducidas de GtHII en plasma. La fuerte elevación de la concentración de GtHII coincidió con los máximos valores de 17β -estradiol que, después, descendieron bruscamente. Estos hechos sugieren que el 17β -estradiol en la lubina, igual que se ha observado en otras especies de peces, ejerce una función reguladora de la secreción de GtHII, probablemente inhibiendo su liberación a través de un mecanismo de retroalimentación negativo durante el proceso de vitelogénesis, a la vez que se favorece su producción por un mecanismo de retroalimentación positivo.

10. La calidad de las dietas administradas a los reproductores de lubina puede llegar a afectar a la secreción de GtHII, seguramente por un efecto indirecto, al provocar alteraciones en la secreción de 17β -estradiol.
11. Los niveles plasmáticos de 17β -estradiol están influidos por el tipo de dieta administrado a los reproductores de lubina. Es posible que niveles elevados de ácidos grasos monoenoicos de 20 y 22 átomos de carbono en la dieta tengan un efecto estimulador sobre la secreción de 17β -estradiol por las células de la granulosa.
12. Los niveles plasmáticos de vitelogenina dependen de un aporte adecuado de ácidos grasos durante la síntesis de esta glicolipofosfoproteína. Unas proporciones DHA: EPA o bien n-3: n-6 inadecuadas pueden provocar en la lubina la aparición de niveles plasmáticos de vitelogenina anormalmente bajos con los consiguientes efectos negativos sobre la formación del vitelo en el conjunto del ovario en desarrollo.

VIII

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Ali, M.A., Boujard, T. y Gerkema, P. 1992.** Terminology in biological rhythms. En: *Rhythms in Fishes* (M.A. Ali, Edr.). NATO ASI Series. Vol.: 236. Pp:7-10. Plenum Press, New York and London.
- Alok, D., Krishnan, T., Talwar, G.P. y Garg, L.C. 1993.** Induced spawning of catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), using D-Lys 6 salmon gonadotropin-releasing hormone analog. *Aquaculture*. 115:159-167.
- Alvariño, J.M.R., Carrillo, M., Zanuy, S., Prat, F. y Mañanós, E. 1992a.** Pattern of sea bass oocyte development after ovarian stimulation by LHRHa. *J. Fish Biol.* 41:965-970.
- Alvariño, J.M.R., Zanuy, S., Prat, F., Carrillo, M. y Mañanós, E. 1992b.** Stimulation of ovulation and steroid secretion by LHRHa injection in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of time of day. *Aquaculture*. 102:177-186.
- Applegate, K.R. y Glomset, J.A. 1986.** Computer-based modelling of the conformation and packing properties of docosahexaenoic acid. *J. Lipid Res.* 27:658-680.
- Barnabé, G. 1980.** Esposé synoptique des données biologiques sur le loup ou Bar-*Dicentrarchus labrax* (Linné. 1758). *Synopsis FAO sur les pêches*. 126:1-70.
- Bell, J.G., Farndale, B.M., Bruce, M.P., Navas, J.M. y Carrillo, M. 1997.** Effects of broodstock dietary lipid on fatty acid compositions of eggs from sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*. En prensa.
- Bell, M.V. y Dick, J.R. 1991.** Molecular species composition of major diacyl glycerophospholipids from muscle, liver, retina and brain of cod (*Gadus morhua*). *Lipids*. 26:565-573.
- Bell, M.V., Henderson, R.J. y Sargent, J.R. 1985.** Changes in the fatty acid compositions from turbot (*Scophthalmus maximus*) in relation to dietary polyunsaturated fatty acid deficiencies. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 81:193-198.

- Bell, M.V., Henderson, R.J. y Sargent, J.R. 1986.** The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 83:711-719.
- Benfey, T.J., Dye, H.M. y Donaldson, E.M. 1989.** Estrogen-induced vitellogenin production by triploid coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), and its effect on plasma and pituitary gonadotropin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 75:83-87.
- Bergendahl, M., Perheentupa, A. y Huhtaniemi, I. 1991.** Starvation-induced suppression of pituitary-testicular function in rats is reversed by pulsatile gonadotropin-releasing hormone substitution. *Biol. Reprod.* 44:413-419.
- Berndtson, A.K., Goetz, F.W. y Duman, P. 1989.** In vitro ovulation, prostaglandin synthesis, and proteolysis in isolated ovarian follicles of the yellow perch, *Perca flavescense*: effect of $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one and phorbol ester. *Gen. Comp. Endocrinol.* 75:454-465.
- Billar, R. y Breton, B. 1978.** Rhythms of reproduction in teleost fish. En: *Rhythmic activity in fishes* (J.E. Thorpe, Edr.). Pp.31-53. Academic Press, London.
- Bjornsson, B.T. y Haux, C. 1985.** Distribution of calcium, magnesium and inorganic phosphate in plasma of 17β -oestradiol treated rainbow trout. *J. Comp. Physiol. B.* 155:347-352.
- Blázquez, M. 1996.** Estudio del proceso de diferenciación sexual mediante manipulación hormonal y ambiental en la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.). *Tesis Doctoral*. Universidad de Valencia. P.283
- Blom, J.H. y Dabrowski, K. 1995.** Dietary ascorbyl phosphate results in high ascorbic acid content in eggs of rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.A.* 112:75-79.
- Blythe, W.G., Helfrich, L.A. y Sullivan, C.V. 1994.** Sex steroid hormone and vitellogenin levels in striped bass (*Morone saxatilis*) maturing under 6-, 9-, and 12-month photothermal cycles. *Gen. Comp. Endocrinol.* 94:122-134.

- Bohemen, C.G.v., Lambert, J.G.D., Goos, H.J.T. y Oordt, P.G.W.J.v. 1982.** Estrone and estradiol participation during exogenous vitellogenesis in the female rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. *Gen. Comp. Endocrinology*. 46:81-92.
- Bommelaer, M.C., Billard, R. y Breton, B. 1981.** Changes in plasma gonadotropin after ovariectomy and estradiol supplementation at different stages at the end of the reproductive cycle in the rainbow trout (*Salmo gairdnerii* R.). *Reproduction, Nutrition and Development*. 21:989-997.
- Bonin, J.P. 1979.** Variations saisonnières de la testostérone plasmatique chez un poisson téléostéan, *Gobius niger* L. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D*. 288:627-630.
- Borg, B. 1994.** Androgens in teleosts fishes. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 109:219-245.
- Bowers, A.B. y Holliday, F.G.T. 1961.** Histological changes in the gonad associated with the reproductive cycle of the herring *Clupea harengus*. *Mar. Res.* 5:5-10.
- Breder, C.M.J. and Rosen, D.E. 1966.** Modes of Reproduction in Fishes (C. M. J. Breder y D.E. Rosen, Eds.). Natural History Press, New York.
- Breton, B., Motin, A., Billard, R., Kah, O., Geoffre, S. y Precigoux, G. 1986.** Immunoreactive gonadotrophin-releasing hormone-like material in the brain and the pituitary gland during the periovulatory period in the brown trout (*Salmo trutta*): relationship with the plasma and pituitary gonadotrophin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 61:109-119.
- Breton, B., Sambroni, E. y Gillet, C. 1987.** Gonadotropin releasing hormone (GnRH) and gonadotropin (GtH) variations around the spawning period in a wild population of roach (*Rutilus rutilus*) from Lemman lake. I. The female. *Aquat. Living. Resources*. 1:93-99.
- Bromage, N.R. 1995.** Broodstock management and seed quality-general considerations. En: *Broodstock management and egg and larval quality* (N.R. Bromage y R.J. Roberts, Eds.). Pp.1-24. Blackwell Science, Edinburgh.

- Bromage, N.R. y Cumaranatunga, R. 1988.** Egg production in the rainbow trout. En: *Recent Advances in Aquaculture*. Vol 3. (J.F. Muir y R.J. Roberts, Eds.). Pp.63-138. Timber Press, Portland, Oregon.
- Bromage, N., Hardiman, P., Jones, J., Springate, J. y Bye, V. 1990.** Fecundity, egg size and total egg volume differences in 12 stocks of rainbow trout. *Aquaculture and Fisheries Management*. 21:269-284.
- Bromage, N., Jones, J., Randall, C., Thrush, M., Davies, B., Springate, J., Duston, J. y Barker, G. 1992.** Broodstock management fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 100:141-166.
- Bruce, M., Shields, R., Bell, M. y Bromage, N. 1993.** Lipid class and fatty acid composition of eggs of Atlantic halibut, *Hipoglossus hippoglossus* (L.), in relation to egg quality in captive broodstock. *Aquaculture and Fisheries Management*. 24:417-422.
- Burke, M.G., Leatherland, J.F. y Sumpter, J.P. 1984.** Seasonal changes in serum testosterone, 11-ketotestosterone, and 17 β -estradiol levels in the brown bullhead, *Ictalurus nebulosus* Lesueur. *Can. J. Zool.* 62:1195-1199.
- Burr, G.O. y Burr, M.M. 1929.** A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *J. Biol. Chem.* 82:345-367.
- Burr, G.O. y Burr, M.M. 1930.** On the nature and role of the fatty acids essential nutrition. *J. Biol. Chem.* 86:587-621.
- Burzawa-Gerard, E. 1982.** Chemical data on pituitary gonadotropins and their implication to evolution. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39:80-91.
- Bye, V.J. 1990.** Temperate marine teleost. En: *Reproductive seasonality in teleosts: environmental influences* (A.D. Munro, A.P. Scott, y T.J. Lam, Eds.). Pp.126-143. CRC Press, Boca Raton, Florida.

- Calderer, A. y Cardona, L. 1993.** Cría intensiva de la dorada (*Sparus aurata*) y la lubina (*Dicentrarchus labrax*). En: *Acuicultura Marina*. Pp.389-420. Universidad de Barcelona, Barcelona.
- Campbell, C.M. e Idler, D.R. 1980.** Characterization of an estradiol-induced protein from rainbow trout serum as vitellogenin by the composition and radioimmunological cross reactivity to ovarian yolk fractions. *Biol. Reprod.* 22:605-617.
- Carrillo, M. y Zanuy, S. 1995.** Manipulación de la reproducción de los teleósteos y calidad de las puestas. En: *Actas del Vº Congreso Nacional de Acuicultura* (F. Castelló y A. Calderer, Eds.). Pp.1-9. Universidad de Barcelona, Sant Carles de la Ràpita.
- Carrillo, M., Bromage, N., Zanuy, S., Serrano, R. y Prat, F. 1989.** The effect of modifications in photoperiod on spawning time, ovarian development and egg quality in the sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture*. 81:351-365.
- Carrillo, M., Zanuy, S., Prat, F., Serrano, R. y Bromage, N. 1993.** Environmental and hormonal control of reproduction in sea bass. En: *Recent advances in Aquaculture*. Vol. IV (J.F. Muir y R.J. Roberts, Eds.). Pp.43-54. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Carrillo, M., Zanuy, S., Prat, F., Cerdá, J., Mañanós, E., Bromage, N., Ramos, J. y Kah, O. 1995.** Nutritional and photoperiodic effects on hormonal cycles and quality of spawning in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Netherlands Journal of Zoology*. 45:204-209.
- Carrillo, M., Zanuy, S., Oyen, F., Sorbera, L., Ramos, J. y Asturiano, J. 1996.** Informe número 1 sobre el proyecto "Egg quality in Teleost Fishes". Informe EC.
- Castell, J.D., Sinnhuber, R.O., Lee, D.J. y Wales, J.H. 1972a.** Essential fatty acids in the diet of rainbow trout (*Salmo gairdnerii*): physiological symptoms of EFA deficiency. *J. Nutr.* 102:87-92.

- Castell, J.D., Sinnhuber, R.O., Wales, J.H. y Lee, D.J. 1972b. Essential fatty acids in the diet of rainbow trout (*Salmo gairdnerii*): growth, feed conversion and some gross deficiency symptoms. *J. Nutr.* 102:77-86.
- Cerdá, J. 1993. Nutrición de reproductores de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.): efecto del nivel de ingesta y de la administración de diferentes dietas sobre el metabolismo intermediario del reproductor y la calidad de la progenie. *Tesis Doctoral*. Universidad de Barcelona.
- Cerdá, J., Carrillo, M., Zanuy, S. y Ramos, J. 1994a. Effect of food ration on estrogen and vitellogenin plasma levels, fecundity and larval survival in captive sea bass, *Dicentrarchus labrax*: preliminary observations. *Aquatic Living Resources*. 7:255-256.
- Cerdá, J., Carrillo, M., Zanuy, S., Ramos, J. y de la Higuera, M. 1994b. Influence of nutritional composition of diet on sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., reproductive performance and egg and larval quality. *Aquaculture*. 128:345-361.
- Cerdá, J., Zanuy, S., Carrillo, M., Ramos, J. y Serrano, R. 1995. Short- and long-term dietary effects on female sea bass (*Dicentrarchus labrax*): seasonal changes in plasma profiles of lipids and sex steroids in relation to reproduction. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 111:83-91.
- Chambers, R.C. y Leggett, W.C. 1996. Maternal influences on variation in egg sizes in temperate marine fishes. *Amer. Zool.* 36:180-196.
- Chang, J.P., Yu, K.L., Wong, A.O.L. y Peter, R.E. 1990. Differential actions of dopamine receptor subtypes on gonadotropin and growth hormone release in vitro in goldfish. *Neuroendocrinology*. 51:664-674.
- Chang, J.P., Wildman, B. y Van Goor, F. 1991. Lack of involvement of arachidonic acid metabolism in chicken gonadotropin-releasing hormone-II (cGnRH-II) stimulation of gonadotropin secretion in dispersed pituitary cells of goldfish, *Carassius auratus*. Identification of a major difference in salmon GnRH and cGnRH-II mechanisms of action. *Mol. Cell. Endocrinol.* 79:75-83.

- Chen, T.T. 1983.** Identification and characterization of oestrogen-responsive gene products in the liver of rainbow trout. *Biochem. Cell. Biol.* 61:802-810.
- Christie, W.W. 1982.** *Lipid analysis*. Pergamon Press, Oxford.
- Conover, W.J. 1980.** *Practical nonparametric Statistics*. Pp.: 493. Jon Wiley and Sons, New York.
- Copeland, P.A. y Thomas, P. 1989.** Control of gonadotropin release in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*): evidence for lack of dopaminergic inhibition. *Gen. Comp. Endocrinol.* 74:474-483.
- Cowey, C.B. y Sargent, J.R. 1979.** Nutrition. En: *Fish Physiology. Vol VIII. Bioenergetics and Growth* (W.S. Hoar, D.J. Randall, y J.R. Brett, Eds.). Pp. 1-69. Academic Press, New York.
- Crim, L.W. y Evans, D.M. 1983.** Influence of testosterone and/or luteinizing hormone releasing hormone analogue on precocious sexual development in the juvenile rainbow trout. *Biol. Reprod.* 29:137-142.
- Dabrowski, K. y Blom, J.H. 1994.** Ascorbic acid deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs and survival of embryos. *Comp. Biochem. Physiol. A* 108:129-135.
- Day, M.L., Imikawa, K., Zalesky, D.D., Kittok, R.J. y Kinder, J.E. 1986.** Effects of restriction of dietary energy intake during the prepubertal period of secretion of luteinizing hormone and responsiveness of the pituitary to luteinizing hormone-releasing hormone in heifers. *J. Animal Sci.* 62:1641-1648.
- Dickhoff, W.W., Yan, L., Plisetskaya, E.M., Sullivan, C.V., Swanson, P., Hara, A. y Bernard, M.G. 1989.** Relationship between metabolic and reproductive hormones in salmonid fish. *Fish Physiol. Biochem.* 7:147-155.
- Ding, J.L., Hee, P.L. y Lam, T.J. 1989.** Two forms of vitellogenin in the plasma and gonads of male *Oreochromis aureus*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 93:363-370.

- Dodd, J.M. y Sumpter, J.P. 1984.** Fishes. En: *Marshall's physiology of Reproduction, Vol.1 Reproductive cycles of vertebrates* (G.E. Lamming, Edr.). Pp.1-126. Edinburgh, Churchill Livingstone.
- Dufour, S., Delerue-LeBelle, N. y Fontaine, Y.A. 1983.** Effects of steroid hormones on pituitary immunoreactive gonadotropin in European freshwater eel, *Anguilla anguilla* L. *Gen. Comp. Endocrinology*. 52:190-197.
- Eberhardt, I. y Kiesel, L. 1992.** Role of arachidonic acid and lipooxygenase products in the mechanism of gonadotropin secretion: an update. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 47:239-246.
- Elizur, A., Zmora, N., Rosenfeld, H., Meiri, I., Hassin, S., Gordin, H. y Zohar, Y. 1996.** Gonadotropins β -GtHI and β -GtHII from the gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 102:39-46.
- Emerson, L.S., Walker, M.G. y Witthames, P.R. 1990.** A stereological method for estimating fish fecundity. *J. Fish Biol.* 36:721-730.
- Falk-Petersen, S., Sargent, J.R., Fox, C., Falk-Petersen, I.B., Haug, T. y Kjorsvik, E. 1989.** Lipids in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs from planktonic samples in Northern Norway. *Northern Norway Marine Biology*. 101:553-556.
- Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M.S., Robaina, L., Valencia, A., Salhi, M. y Vergara, J.M. 1995.** Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*. 132:325-337.
- Fewster, M.E., Burns, B.J. y Mead, J.F. 1969.** Quantitative densitometric thin layer chromatography of lipids using copper acetate reagent. *Journal of Chromatography*. 43:120-126.
- Folch, J., Lees, M. y Sloane-Stanley, G.H. 1957.** A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biological Chemistry*. 276:497-509.

- Fostier, A., Weil, C., Terqui, M., Breton, B. y Jalabert, B. 1978.** Plasma estradiol-17 and gonadotropin during ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdnerii* R.). *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.* 18:929-936.
- Fostier, A., Billar, R., Breton, S., Legendre, M. y Marlot, S. 1982.** Plasma 11-oxotestosterone and gonadotropin during the beginning of spermiation in rainbow trout (*Salmo gairdnerii* R.). *Gen. Comp. Endocrinol.* 46:428-434.
- Frémont, L., Léger, C., Petridou, B. y Gozzelino, M.T. 1984.** Effects of a (n-3) polyunsaturated fatty acid-deficient diet on profiles of serum vitellogenin and lipoprotein in vitellogenic trout (*Salmo gairdnerii*). *Lipids.* 19:522-528.
- Gissis, A., Levavi-Sivan, B., Rubin-Kedem, H., Ofir, M. y Yaron, Z. 1991.** The effect of gonadotropin releasing hormone superactive analog and dopamine antagonists on gonadotropin level and ovulation in hybrid tilapia. *Isr. J. Aquacult. - Bamidgeh.* 43:123-136.
- Goodman, R.L., Legan, S.J., Ryan, K.D., Foster, D.L. y Karsch, F.J. 1980.** Two effects of estradiol that normally contribute to the control of tonic LH secretion in the ewe. *Biol. Reprod.* 23:415-422.
- Gore-Langton, R.E. y Armstrong, D.T. 1988.** Follicular steroidogenesis and its control. En: *The Physiology of Reproduction* (E. Knobil y J. Neill, Eds.). Pp.331-385. Raven Press, New York.
- Gothilf, Y., Elizur, A., y Zohar, Y. 1995.** Three forms of gonadotropin-releasing hormone in gilthead seabream and striped bass: physiological and molecular studies. En: *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish* (F.W. Goetz y P. Thomas, Eds.). Pp.52-54. Fish Symposium 95, Austin, Texas.
- Gothilf, Y., Muñoz-Cueto, J.A., Sagrillo, C.A., Selmanoff, M., Chen, T.T., Kah, O., Elizur, A. y Zohar, Y. 1996.** Three forms of gonadotropin-releasing hormone in a perciform fish (*Sparus aurata*): complementary deoxyribonucleic acid characterization and brain localization. *Biol. Reprod.* 55:636-645.

- Gruenewald, D.A. y Matsumoto, A.M. 1993.** Reduced gonadotropin-releasing hormone gene expression with fasting in the male rat brain. *Endocrinology*. 132:480-482.
- Guraya, S.S. 1986.** The cell and molecular biology of fish oogenesis: follicular wall. *Karger, Basel*. 110-154.
- Gutiérrez, J., Fernández, J., Carrillo, M., Zanuy, S. y Planas, J. 1987.** Annual cycle of plasma insulin and glucose of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Fish Physiology Biochem.* 4:137-141.
- Habibi, H.R., Peter, R.E., Sokolowska, M., Rivier, J.E. y Vale, W.W. 1987.** Characterization of gonadotropin releasing hormone (GnRH) binding to pituitary receptors in goldfish (*Carassius auratus*). *Biol. Reprod.* 36:844-853.
- Habibi, H.R., Marchant, T.A., Nahorniak, C.S., Van der Loo, H., Peter, R.E., Rivier, J.E. y Vale, W.W. 1989.** Functional relationship between receptor binding and biological activity for analogs of mammalian and salmon gonadotropin-releasing hormones in the pituitary of goldfish. *Biol. Reprod.* 40:1152-1161.
- Hara, A. e Hirai, H. 1978.** Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Comp. Biochem. Physiol.B.* 59:339-343.
- Hara, A., Sullivan, C.V. y Dickhoff, W.W. 1993.** Isolation and some characterization of vitellogenin and its related egg yolk proteins from coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Zool. Sci.* 10:245-256.
- Harel, M., Tandler, A., and Kissil, G.W. 1992.** The kinetics of nutrient incorporation into body tissues of gilthead sea bream *S. aurata* females and subsequent effects on egg composition and egg quality. *Isr. J. Aquacult-Bamidgeh.* 44:127
- Hassin, S., Elizur, A. y Zohar, Y. 1995.** Molecular cloning and sequence analysis of striped bass (*Morone saxatilis*) gonadotrophin-I and -II subunits. *J. Mol. Endocrinol.* 15:23-35.

- Hayashizaki, K., Hirohashi, M. y Ida, H. 1995.** Effect of egg size on the characteristics of embryos and alevins of chum salmon. *Fisheries Science*. 61:177-180.
- Henderson, R.J., Sargent, J.R. y Pirie, B.J.S. 1982.** Peroxisomal oxidation of fatty acids in livers of rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) fed diets of marine zooplankton. *Comp. Biochem. Physiol.* 73:565-570.
- Henderson, R.J. y Sargent, J.R. 1984.** Lipid metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) fed diets containing partially hydrogenated fish oil. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 78:557-564.
- Henderson, R.J. y Sargent, J.R. 1985.** Chain-length specificities of mitochondrial and peroxisomal β -oxidation of fatty acids in livers of rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 82:79-85.
- Henderson, R.J. y Tocher, D.R. 1987.** The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog. Lipid. Res.* 26:281-347.
- Hislop, J.R.G., Robb, A.P. y Gauld, J.A. 1978.** Observations on effects of feeding level on growth and reproduction in haddock, *Melanogrammus aeglefinus* (L.) in captivity. *J. Fish Biol.* 13:85-98.
- Hoar, W.S. 1969.** Reproduction. En: *Fish Physiology Vol III. Reproduction and Growth. Bioluminescence, Pigments, and Poisons.* (W.S. Hoar y D.J. Randall, Eds.). Pp.1-72. Academic Press, New York.
- Hoffman, L.C. y Prinsloo, J.F. 1995.** The influence of different dietary lipids on the growth and body composition of the african sharptooth catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *South African Journal of Science.* 91:315-320.
- Horwood, J.W., Greer Walker, M. y Witthames, P. 1989.** The effect of feeding levels on the fecundity of plaice (*Pleuronectes platessa*). *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 69:81-92.

- Idler, D.R. y Ng, T.B. 1983.** Teleost gonadotropins: isolation, biochemistry, and function. En: *Fish physiology* (W.S. Hoar, D.J. Randall, y E.M. Donaldson, Eds.). Pp.187-212.
- Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M.G. y Sumpter, J.P. 1995.** A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health. Perspectives.* 103:582-587.
- Josupeit, H. 1995.** Marketing of farmed seabass, seabream and turbot. *FAO Aquaculture Newsletter, FAN.* 10:17-22.
- Kadmon, G., Yaron, Z. y Gordin, H. 1985.** Sequence of gonadal events and oestradiol levels in *Sparus aurata* (L.) under two photoperiod regimes. *J. Fish Biol.* 26:609-620.
- Kagawa, H., Young, G. y Nagahama, Y. 1983a.** Changes in plasma steroid hormone levels during gonadal maturation in goldfish *Carassius auratus*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 49:1783-1787.
- Kagawa, H., Young, G. y Nagahama, Y. 1983b.** Relationship between seasonal plasma estradiol-17 β and testosterone levels and in vitro production by ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biol. Reprod.* 29:301-309.
- Kah, O. 1986.** Central regulation of reproduction in teleosts. *Fish Physiol. Biochem.* 2:25-34.
- Kah, O., Dubourg, P., Onteniente, B., Geffard, M. y Calas, A. 1986.** The dopaminergic innervation of the goldfish pituitary. An immunocytochemical study at the electron-microscope level using antibodies against dopamine. *Cell Tissue Res.* 244:577-582.
- Kah, O., Zanuy, S., Mañanós, E., Anglade, I. y Carrillo, M. 1991.** Distribution of salmon gonadotrophin releasing-hormone in the brain and pituitary of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Cell Tiss.Res.* 266:129-136.

- Kah, O., Anglade, I., Leprêtre, E., Dubourg, P. y de Monbrison, D. 1993.** The reproductive brain in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 11:85-98.
- Kah, O., Zanuy, S., Pradelles, P., Cerdá, J. y Carrillo, M. 1994.** An enzyme immunoassay for salmon gonadotropin-releasing hormone and its application to the study of the effects of diet on brain and pituitary GnRH in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95:464-474.
- Kamler, E., Zuromska, H. y Nissinen, T. 1982.** Bioenergetical evaluation of environmental and physiological factors determining egg quality and growth in *Coregonus albula* (L.). *Polskie Archiwum Hydrobiologie.* 29:71-121.
- Kaneko, T., Aida, K. y Hanyu, I. 1983.** Changes in ovarian activity and fine structure of pituitary gonadotrophs during spawning cycle of the chi-chibu-goby *Tridentiger obscurus*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 52:1923-1928.
- Kawauchi, H., Itoh, H., y Koide, Y. 1991.** Additional evidence for duality of fish gonadotropins. En: *Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, Norwich, U.K. 7-12 July (A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime, y M.S. Rolfe, Eds.). Pp.19-21. FishSymp 91, Sheffield.
- Kawauchi, H., Suzuki, K., Itoh, H., Swanson, P., Naito, N., Nagahama, Y., Nozaki, M., Nakai, Y. y Itoh, S. 1989.** The duality of teleosts gonadotropins. *Fish Physiol. Biochem.* 7:29-38.
- Kjesbu, O.S. 1988.** Aspects of the reproduction in cod (*Gadus morhua*): oogenesis, fecundity, spawning, in captivity and stage of spawning. *Tesis Doctoral*. Universidad de Bergen, Noruega. P: 147.
- Kjorsvik, E., Mangor-Jensen, A. y Holmefjord, I. 1990.** Egg quality in fishes. *Advances in Marine Biology.* 26:71-113.
- Kobayashi, M., Aida, K., Skai, H., Kaneki, T., Asahina, K., Hanyu, I. y Ishii, S. 1987a.** Radioimmunoassay for salmon gonadotropin. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 53:995-1003.

- Kobayashi, M., Aida, K. y Hanyu, I. 1987b.** Hormone changes during ovulation and effects of steroid hormones on plasma gonadotropin levels and ovulation in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 67:24-32.
- Kobayashi, M., Aida, K. y Hanyu, I. 1988.** Hormone changes during the ovulatory cycle in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 69:301-307.
- Kobayashi, M. y Stacey, N.E. 1990.** Effects of ovariectomy and steroid hormone implantation on serum gonadotropin levels in female goldfish. *Zoological Science.* 7:721715-721.
- Konaopacka, B. 1935.** Recherches histochimiques sur le développement des poissons. I. La vitellogenèse che le goujon (*Gobius fluviatilis*) et la carpe (*Cyprinus carpio*). *Bull. Int. Acad. Pol Sci. Let. Ser. B.* 163-182.
- Koven, W.M., Kissil, G.W. y Tandler, A. 1989.** Lipid and n-3 requirement of *Sparus aurata* larvae during starvation and feeding. *Aquaculture.* 79:185-191.
- Koven, W.M., Tandler, A., Kissil, W.G. y Sklan, D. 1992.** The importance of n-3 highly unsaturated fatty acids for growth in larval *Sparus aurata* and their effect on survival, lipid composition and size distribution. *Aquaculture.* 104:91-104.
- Koven, W.M., Tandler, A., Sklan, D. y Kissil, G.W. 1993.** The association of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the main phospholipids of different-age *Sparus aurata* larvae with growth. *Aquaculture.* 116:71-82.
- Lagomarsino, I.V., Francis, R.C. y Barlow, G.W. 1988.** The lack of correlation between size of eggs and size of hatching in the midas cichlid, *Cichlasoma citrinellum*. *Copeia.* 4:1086-1089.
- Lamming, G.E. 1984.** *Marshall's physiology of reproduction.* 4th edition. (G.E. Lamming, Edr.). Churchill Livingstone, New York.
- Lazarow, P.B. 1977.** Three hypolipidemic drugs increase hepatic palmitoyl-CoA oxidatin in the rat. *Science.* 197:580-581.

- Leatherland, J.F. y Sonstegard, R.A. 1980.** Seasonal changes in thyroid hyperplasia serum thyroid hormone and lipid concentrations, and pituitary gland structure in lake Ontario coho salmon *Oncorhynchus kisutch* Walbaum and a comparison with coho salmon from lakes Michigan and Erie. *J. Fish Biol.* 16:539-562.
- Leatherland, J.F., Farbridge, K.J. y Boujard, T. 1992.** Lunar and semi-lunar rhythms in fishes. En: *Rhythms in Fishes* (M.A. Ali, Edr.). NATO ASI Series. Vol.: 236. Pp:83-108. Plenum Press, New York and London.
- Le Menn, F. y Nuñez-Rodríguez, J. 1991.** Receptors mediate endocytosis of vitellogenin in fish follicles. En: *Proceedings of the fourth International symposium on the reproductive physiology of fish*, Norwich, U.K., 7-12 July 1991 (A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime, y M.S. Rolfe, Eds.). Pp.300-302. Fish Symp 91, Sheffield.
- Lee, D.J., Rochm, J.J., Yu, T.C. y Sinnhuber, R.O. 1967.** Effect of w3 fatty acids on the growth rate of rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. *J. Nutr.* 92:92-98.
- Licht, P., Papkoff, H., Framer, S.W., Muller, C.H., Tsu, H.W. y Crews, D. 1977.** Evolution of gonadotropin structure and function. *Rec. Prog. Hormone Res.* 33:169-248.
- Lin, Y.-W.P., Rupnow, B.A., Price, D.A., Greenberg, R.M. y Wallace, R.A. 1992.** *Fundulus heteroclitus* gonadotropins. III. Cloning and sequencing of gonadotropic hormone (GTH) I and II β subunits using the polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Endocrinol.* 85:127-139.
- Lin, H.R., Lu, M., Lin, X.W., Zhang, W.M., Sun, Y., y Chen. L.X. 1995.** Effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogs and sex steroid on growth hormone (GH) secretion and growth in common carp (*Cyprinus carpio*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture.* 135:173-184.
- Luquet, P. y Watanabe, T. 1986.** Interaction "nutrition-reproduction" in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 2:121-129.

- Mañanós, E. 1993.** Estudio del proceso vitelogénico de la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) y los factores que le influyen. *Tesis Doctoral*. Universidad de Valencia.
- Mañanós, E., Zanuy, S., Le Menn, F., Carrillo, M. y Núñez, J. 1994a.** Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. I- Induction, purification and partial characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* 107B:205-216.
- Mañanós, E., Zanuy, S., Nuñez, J., Carrillo, M. y Le Menn, F. 1994b.** Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin II. Validation of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Comp. Biochem. Physiol.* 107B:217-223.
- Mañanós, E., Núñez Rodríguez, J., Le Menn, F., Zanuy, S. y Carrillo, M. 1997a.** Identification of vitellogenin receptors in the ovary of a teleost fish, the Mediterranean sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Reprod. Nutr. Dev.* En prensa.
- Mañanós, E.L., Swanson, P., Stubblefield, J. y Zohar, Y. 1997b.** Purification of gonadotropin II from a teleost fish, the hybrid striped bass, and development of a specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Gen. Comp. Endocrinol.* En prensa.
- Mañanós, E., Zanuy, S. y Carrillo, M. 1997c.** Photoperiodic manipulations of the reproductive cycle of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and their effects on gonadal development and plasma 17β -estradiol and vitellogenin levels. *Fish Physiol. Biochem.* En prensa.
- March, B.E. 1992.** Essential fatty acids in fish physiology. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71:684-689.
- Martínez, G., Amores, A., Thode, G., y Álvarez, M.C. 1990.** Diferencias genéticas entre poblaciones de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) mediante electroforesis de isoenzimas. En: *Actas del III Congreso Nac. Acuicult.* (A. Landín y A. Cerviño, Eds.). Pp.313-315. Santiago de Compostela.
- Marza, V.D. 1938.** Histophysiologie de l'ovogenese. Pp.81. Herman and Cie, Paris.

- Masters, C.N. y Crane, D. 1984.** The role of peroxisomes in lipid metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 9:314-317.
- Masui, H., Urade, R. y Krro, M. 1995.** Selective incorporation of n-3 and n-6 unsaturated fatty acids into animal cell phospholipids. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59:644-647.
- Matsubara, T. y Sawano, K. 1995.** Proteolytic cleavage of vitellogenin and yolk proteins during vitellogenin uptake and oocyte maturation in barfin flounder (*Verasper moseri*). *J. Exp. Zool.* 272:34-45.
- Mayer, I., Rosenquist, G., Borg, B., Ahnesjö, I., Berglund, A. y Schulz, R.W. 1993.** Plasma levels of sex steroids in three species of pipefish (Syngnathidae). *Can. J. Zool.* 71:1903-1907.
- Mayer, I., Shackley, S.E. y Ryland, J.S. 1988.** Aspects of the reproductive biology of the bass, *Dicentrarchus labrax* L. I. An histological and histochemical study of oocyte development. *J. Fish Biol.* 33:609-622.
- Mayer, I., Shackley, S.E. y Witthames, P.R. 1990.** Aspects of the reproductive biology of the bass, *Dicentrarchus labrax*, L. II. Fecundity and pattern of oocyte development. *J. Fish Biol.* 36:141-148.
- McBride, J.R., Faberlund, U.H.M., Dye, H.M. y Bagshaw, J. 1986.** Changes in structure of tissues and in plasma cortisol during the spawning migration of pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha* (Walbaum). *J. Fish Biol.* 29:153-166.
- McBride, J.R., Fagerland, U.H.M., Dye, H.M. y Bagshaw, J. 1986.** Changes in structure of tissues of pink salmon, *Oncorhynchus gorbusch* (Walbaum). *J. Fish. Biol.* 29:153-166.
- McEvoy, L.A. 1984.** Ovulatory rhythms and over-ripening of eggs in cultivated turbot, *Scophthalmus maximus* L. *J. Fish Biol.* 24:437-448.

- Mercure, F. y Van der Kraak, G. 1995a.** Inhibition of gonadotropin-stimulated ovarian steroid production by polyunsaturated fatty acids in teleosts fish. *Lipids*. 30:547-554.
- Mercure, F. y Van der Kraak, G. 1995b.** Evidence for peroxisomal involvement in ovarian steroidogenesis in teleosts. En: *Proceedings of the fifth International symposium on reproductive physiology of fish* (F.W. Goetz y P. Thomas, Eds.). Pp.321 Fish Symp 95, Austin, Texas.
- Mercure, F. y Van der Kraak, G. 1996.** Mechanisms of action of free arachidonic acid on ovarian steroid production in the goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 102:130-140.
- Mikolajczyk, T., Weil, C. y Breton, B. 1993.** Nicotine stimulates maturational gonadotropin (GTH2) release from carp (*Cyprinus carpio* L.) pituitary cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 105 C:83-88.
- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H. y Nagahama, Y. 1991.** Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:5774-5778.
- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H. y Nagahama, Y. 1992.** The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish. *J. Exp. Zool.* 261:359-363.
- Mommsen, T.P. y Walsh, P.J. 1988.** Vitellogenesis and oocyte assembly Vol. XI A. En: *Fish Physiology* (W.S. Hoar y D.J. Randall , Eds.). Pp.347-406. Academic Press, New York.
- Monteleone, D.M. y Houde, E.D. 1990.** Influence of maternal size on survival and growth of striped bass *Morone saxatilis* Walbaum eggs and larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 140:1-11.
- Morisawa, S. y Morisawa, M. 1986.** Acquisition of potential for sperm motility in rainbow trout and chum salmon. *J. Exp. Biol.* 126:89-96.

- Moser, H.G. 1967.** Seasonal histological changes in the gonads of *Sebastes paucispinis* (Ayers), an ovoviviparous teleost (Family Scorpaenidae). *J. of Morphology*. 123:324-354.
- Mourente, G. y Odriozola, J.M. 1990a.** Effect of broodstock diets on lipid classes and their fatty acid composition in eggs of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 8:93-101.
- Mourente, G. y Odriozola, J.M. 1990b.** Effect of broodstock diets on total lipids and fatty acid composition of larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) during yolk sac stage. *Fish Physiol. Biochem.* 8(2):103-110.
- Mourente, G., Tocher, D.R. y Sargent, J.R. 1991.** Specific accumulation of docosahexaenoic acid (22:6 n-3) in brain lipids during development of juvenile turbot *Scophthalmus maximus* L. *Lipids* 26
- Mourente, G. y Tocher, D.R. 1993a.** Incorporation and metabolism of ¹⁴C-labelled polyunsaturated fatty acids in juvenile gilthead sea bream *Sparus aurata* L. *in vivo*. *Fish Physiol. Biochem.* 10:443-453.
- Mourente, G. y Tocher, D.R. 1993b.** Incorporation and metabolism of ¹⁴C-labelled polyunsaturated fatty acids in wild-caught juveniles of golden grey mullet, *Liza aurata*, *in vivo*. *Fish Physiol. Biochem.* 12:119-130.
- Mourente, G. y Vázquez, R. 1996.** Changes in the content of total lipid, lipid classes and their fatty acids of developing eggs and unfed larvae of the Senegal sole, *Solea senegalensis* Kaup. *Fish Physiol. Biochem.* 15:221-235.
- Mourente, G., Tocher, D.R. y Sargent, J.R. 1991.** Specific accumulation of docosahexaenoic acid (22:6 n-3) in brain lipids during development of juvenile turbot *Scophthalmus maximus* L. *Lipids*. 26:871-877.
- Murdoch, W.J., Hansen, T.R. y McPherson, L.A. 1993.** A review- role of eicosanoids in vertebrate ovulation. *Prostaglandins*. 46:85-115.

- Nagahama, Y. 1983.** The functional morphology of teleost gonads. En: *Fish Physiology*, Vol. IX. (W.S. Hoar, D.J. Randall, y E.M. Donaldson, Eds.). Pp.223-275. Academic Press, Orlando,Florida.
- Nagahama, Y. 1987 .** $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one: a teleost maturation-inducing hormone. *Dev. Growth. Differ.* 29:1-12.
- Nagahama, Y., Yoshikuni, M., Yamashita, M., Sakai, N. y Tanaka, M. 1993.** Molecular endocrinology of oocyte growth and maturation in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 11:3-14.
- Naito, N., Suzuki, K., Nozaki, M., Swanson, P., Kawauchi, H. y Nakai, Y. 1993.** Ultrastructural characteristics of two distinct gonadotropes (GtH-I and GtH-II cells) in the pituitary of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol. Biochem.* 11:241-246.
- Ng, T.B. e Idler, D.R. 1983.** Yolk formation and differentiation in teleost fishes. En: *Fish Physiology*, Vol IX (W.S. Hoar, D.J. Randall y E.M. Donaldson, Eds). Pp: 373-404. Academic Press, New York.
- Norgberg, B. y Haux, C. 1985.** Induction, isolation and characterization of the lipid content of plasma vitellogenin from two *Salmo* species, rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) and sea trout (*Salmo trutta*). *Comp. Biochem. Physiol.B.* 81:869-876.
- Nozaki, M., Naito, N., Swanson, P., Dickhoff, W.W., Nakai, Y., Suzuki, K. y Kawauchi, H. 1990a.** Salmonid pituitary gonadotrophs. I. Distinct cellular distributions of two gonadotropins, GTH-I and GTH-II. *Gen. Comp. Endocrinol.* 77:318-357.
- Nozaki, M., Naito, N., Swanson, P., Dickhoff, W.W., Nakai, Y., Suzuki, K. y Kawauchi, H. 1990b.** Salmonid pituitary gonadotrophs. II. Ontogeny of GtH-I and GtH-II cells in the rainbow trout (*Salmo gairdnerii irideus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 77:358-367.

- Núñez Rodríguez, J., Suzuki, K., Peter, R.E. y Kawauchi, H. 1992.** Effects of common carp GTH I and GTH II in vitellogenesis and uptake in goldfish (*Carassius auratus*). En: *Abstracts, Second International Symposium on Fish Endocrinology*, Saint Malo, June 1-4. L51
- Olsen, R.E. y Henderson, R.J. 1989.** The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double development HPTLC and scanning densitometry. *J. Exp. Marine Biol. Ecol.* 129:189-197.
- Onitake, K. y Iwamatsu, T. 1986.** Immunocytochemical demonstration of steroid hormones in the granulosa cells of the medaka, *Oryzias latipes*. *J. Exp. Zool.* 239:97-103.
- Oppen-Berntsen, D.O., Helvik, J.V. y Walther, B.T. 1990.** The major structural proteins of cod (*Gadus morhua*) eggshells and protein crosslinking during teleost egg hardening. *Developmental Biology.* 137:258-265.
- Oppen-Berntsen, D.O., Hyllner, S.J., Haux, C., Helvik, J.V. y Walther, B.T. 1992 a.** Eggshell zona radiata-proteins from cod (*Gadus morhua*). Extra-ovarian origin and induction by estradiol-17 β . *J. Dev. Biol.* 36:247-254.
- Oppen-Berntsen, D.O., Gram-Jensen, E. y Walther, B.T. 1992b.** Zona radiata proteins are synthesized by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes in response to oestradiol-17 β . *J. Endocrinol.* 135:293-302.
- Oppen-Berntsen, D.O., Olsen, S.E., Rong, C.J., Taranger, G.L., Swanson, P. y Walther, B.T. 1994.** Plasma levels of eggshell Zr-proteins, estradiol-17 β , and gonadotropins during an annual reproductive cycle of atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Exp. Zool.* 268:59-70.
- Osumi, T. y Hashimoto, T. 1978.** Enhancement of fatty acyl CoA oxidizing activity in rat liver peroxisomes by di-(2-ethylhexyl)phthalate. *J. Biochem.* 83:1361-1365.

- Pankhurst, N.W. y Carragher, J.F. 1991.** Steroids levels in marine fish. En: *Proceedings of the fourth international symposium on the reproductive physiology of fish*. Norwich, U.K., 7-12 July 1991 (A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime, y M.S. Rolfe, Eds.). Pp.131-134. FishSymp'91, Sheffield.
- Patiño, R. y Thomas, P. 1990.** Effects of gonadotropin on ovarian intrafollicular processes during the development of oocyte maturational competence in a teleost, the Atlantic croaker: evidence for two distinct stages of gonadotropic control of final oocyte maturation. *Biol. Reprod.* 43:818-827.
- Peter, R.E. 1982.** Neuroendocrine control of reproduction in teleosts. *Canad. J. Fish. Aquat. Sci.* 39:48-55.
- Peter, R.E. 1983.** The brain and neurohormones in teleost production. En: *Fish Physiology (Reproduction Part A)*. (D.J. Randall y E.M. Donaldson, Eds.). Pp.97-135.
- Peter, R.E., Chang, J.P., Nahorniak, C.S., Omeljaniuk, R.J., Solowska, M., Shih, S.H. y Billard, R. 1986.** Interactions of catecholamines and GnRH in regulation of gonadotropin secretion in teleost fish. *Recent Progr. Horm.* 42:513-548.
- Peter, R.E., Trudeau, V.L., Sloley, B.D., Peng, C., y Nahorniak, C.S. 1991.** Actions of catecholamines, peptides and sex steroids in regulation of gonadotropin II in the goldfish. En: *Proceedings of the fourth international symposium on the reproductive physiology of fish*. Norwich, U.K., 7-12 July 1991 (A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime, y M.S. Rolfe, Eds.). Pp.30-34. FishSymp 91, Sheffield.
- Petrino, T.R., Greeley, J.M.S., Selman, K., Lin, Y. y Wallace, R.A. 1989.** Steroidogenesis in *Fundulus heteroclitus*. II Production of 17α -hydroxy- 20β -dihydroxyprogesterone, testosterone and 17α -estradiol by various components of the ovarian follicles. *Gen. Comp. Endocrinol.* 76:230-240.

- Peyon, P., Baloche, S., and Burzawa-Gerard, E. 1992.** Induction of vitellogenin synthesis by 17β -estradiol and testosterone in silver eel hepatocytes maintained in primary culture. En: *Abstracts. Second International Symposium on Fish Endocrinology*. Pp.58. Saint Malo, June 1-4.
- Pickering, A.D. y Christie, P. 1981.** Changes in the concentrations of plasma cortisol and thyroxine during sexual maturation of the hatchery-reared brown trout, *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 44:487-496.
- Plisetskaya, E.M., Leibush, B.N., y Bondareva, V. 1976.** The secretion of insulin and its role in cyclostomes and fishes. En: *The Evolutions of Pancreatic Islet* (A. Grillo, L. Leibson, y A. Epple, Eds.). Pp.251-269. Pergamon Press, Oxford.
- Pöschl, J.M.B., Leray, C., Groscolas, R., Ruef, P. y Linderkamp, O. 1996.** Dietary docosahexaenoic acid improves red blood cell deformability in rats. *Thrombosis research.* 81:283-288.
- Prat, F. 1991.** Control del ciclo reproductor de la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) Por manipulación hormonal y ambiental. *Tesis doctoral*. Universidad de Barcelona.
- Prat, F., Carrillo, M. y de Mones, A. 1986.** Validación del radioinmunoensayo para la estimación de testosterona, 11-cetotestosterona y 17β -estradiol en plasma de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.). *Inv. Pesq.* 50:279-295.
- Prat, F., Zanuy, S., Carrillo, M., de Mones, A. y Fostier, A. 1990a.** Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 78:361-373.
- Prat, F., Zanuy, S., Carrillo, M. y Bromage, N. 1990b.** Efecto de fotoperíodos constantes en los niveles de esteroides sexuales y época de puesta de la lubina (*Dicentrarchus labrax*). En: *Actas III Congreso Nac. Acuicult.* (A. Landín y A. Cerviño Eds.). Pp: 81-86.
- Ridelman, J., Hardy, R. y Brannon, E. 1984.** The effect of short-term starvation on ovarian development and egg viability in rainbow trout. *Aquaculture.* 37:133-140.

- Rutter, L.M. y Manns, J.G. 1987.** Hypoglycemia alters pulsatile luteinizing hormone secretion in the postpartum beef cow. *J. Animal Sci.* 64:479-488.
- Sandnes, K. y Waagbo, R. 1991.** Enzymatic hydrolysis of ascorbate-2-monophosphate and ascorbate 2-sulphate *in vitro*, and bioactivity of ascorbate-2-monophosphate in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fisk. Dir. Skr. Ser. Ernoering.* 4:33-39.
- Sargent, J., Henderson, R.J., y Tocher, D.R. 1989.** The Lipids. En: *Fish Nutrition*. Pp.153-218. Academic Press, Inc.
- Sargent, J.R., Bell, J.G., Bell, M.V., Henderson, R.J. y Tocher, D.R. 1993.** The Metabolism of phospholipids and polyunsaturated fatty acids in fish. En: *Aquaculture: fundamental and applied research* (B. Lahlou y P. Vitiello, Eds.). American Geophysical Union, Washington D.C.
- Sargent, J.R. 1995.** Origins and functions of egg lipids: nutritional implications. En: *Broodstock management and egg and larval quality* (N.R. Bromage y R.J. Roberts, Eds.). Pp.353-372. Blackwell Science Ltd. Cambridge.
- Sargent, J.R., Bell, J.G., Bell, M.V., Henderson, R.J. y Tocher, D.R. 1995.** Requirement criteria for essential fatty acids. *J. Appli. Ichthyol.* 11:183-189.
- Schultz, R., Bosma, P.T., Zandbergen, M.A., Van der Sanden, C.A., Van Dijk, W., Peute, J., Bogerd, J. y Goos, H.J. 1993.** Two gonadotropin-releasing hormones in the African catfish, *Clarias gariepinus*: localization, pituitary receptor binding, and gonadotropin release activity. *Endocrinology.* 133:1569-1577.
- Schwartz, N.B. 1994.** The 1994 Stevenson Award Lecture. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone: a tale of two gonadotropins. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73:675-684.
- Scott, A.P. y Sumpter, J.P. 1989.** Seasonal variations in testicular germ cell stages and in plasma concentrations of sex steroids in male rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) maturing at 2 years old. *Gen. Comp. Endocrinol.* 73:46-58.

- Scott, A.P., Sumpter, J.P. y Hardiman, P.A. 1983.** Hormone changes during ovulation in the rainbow trout (*Salmo gairdnerii* Richardson). *Gen. Comp. Endocrinol.* 49:128-134.
- Selman, K. y Wallace, R.A. 1989.** Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zool. Sci.* 6:211-231.
- Serrano, R. 1990.** Efecto de la manipulación ambiental y hormonal sobre la calidad de la progenie en lubina (*Dicentrarchus labrax* L.). *Tesis Doctoral*. Universidad de Valencia.
- Sherwood, N.M. y Coe, I.R. 1991.** Neuropeptides and their genes in fish. En: *Proceedings of the fourth international symposium on the reproductive physiology of fish*. Norwich, U.K., 7-12 July 1991 (A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime y M.S. Rolfe, Eds.). Pp.38-40. FishSymp 91, Sheffield.
- Sherwood, N.M., Parker, D.B., McRory, J.E., y Lescheid, D.W. 1994.** Molecular evolution of GHRH and GnRH. En: *Molecular Endocrinology of Fish. Fish Physiology Vol. XIII* (N.M. Sherwood, C.L. Hew, A.P. Farrel, y D.J. Randall, Eds.). Academic Press, New York.
- Shibata, N., Yoshikuni, M. y Nagahama, Y. 1993.** Vitellogenin incorporation into oocytes of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in vitro: effects of hormones on denuded oocytes. *Dev. Growth. Differ.* 35:115-121.
- Shimizu, A., Aida, K. y Hanyu, I. 1985.** Endocrine profiles during the short reproductive cycle of an autumn/spawning bitterling. *Acheilognathus rhombea*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 60:361-371.
- Silversand, C. y Haux, C. 1995.** Fatty acid composition of vitellogenin from four teleost species. *J. Comp. Physiol.B.* 164:593-599.
- Sorbera, L.A., Mylonas, C.C., Zanuy, S., Carrillo, M. y Zohar, Y. 1996.** Sustained administration of GnRH increases milt volume without altering sperm counts in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Exp. Zool.* 276:361-368.

- Sprecher, H. 1993.** A reevaluation of the pathway for biosynthesis of 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid. *Omega-3 News*. 7:1-3.
- Springate, J.R.C., Bromage, N. y Cumaranatunga, P.R.T. 1995.** The effects of different ration on fecundity and egg quality in the rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). En: *Nutrition and feeding in fish* (C.B. Cowey, A.M. Mackie, y J.A. Bell, Eds.). Pp.371-393. Academic Press, London.
- Springate, J.R.C. y Bromage, N.R. 1985.** Effects of egg size on early growth and survival in rainbow trout (*Salmo gairdnerii* R.). *Aquaculture*. 47:163-172.
- Springate, J.R.C., Bromage, N.R., Elliot, J.A.K. y Hudson, D.L. 1984.** The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertiization and survival to eyeing, hatching and swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdnerii* R.). *Aquaculture*. 43:313-322.
- Styfhan, S., Le Menn, F., Nunez-Rodriguez, J. y Schneider, W.J. 1990.** Regulation of oogenesis: the piscine receptor for vitellogenin. *Biochim. Biophys. Acta*. 1045:271-279.
- Sumpter, J.P. y Scott, A.P. 1989.** Seasonal variations in plasma and pituitary levels of gonadotrophin in males and females of two strains of rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Gen. Comp. Endocrinology*. 75:376-388.
- Sumpter, J.P., Tyler, C.R., y Kawauchi, H. 1991.** Actions of GT I and GTH II on ovarian steroidogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. En: *Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, Norwich, U.K., 7-12 July 1991 (A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime, y M.S. Rolfe, Eds.). Pp.27 FishSymp91, Sheffield.
- Suzuki, K., Kawauchi, H. y Nagahama, Y. 1988a.** Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71:292-301.

- Suzuki, K., Kawauchi, H. y Nagahama, Y. 1988b.** Isolation and characterization of subunits from two distinct salmon gonadotropins. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71:302-306.
- Suzuki, K., Nagahama, Y. y Kawauchi, H. 1988c.** Steroidogenic activities of two distinct salmon gonadotropins. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71:452-458.
- Swanson, P. 1991.** Salmon gonadotropins: reconciling old and new ideas. En: *Proceedings of the fourth international symposium on the reproductive physiology of fish*. Norwich, U.K., 7-12 July 1991 (A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime, y M.S. Rolfe, Eds.). Pp.2-7. Fish Symp 91, Sheffield.
- Takeuchi, T., Ishii, S. y Ogino, T. 1981a.** *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.* 104:111
- Takeuchi, T., Watanabe, F.T., Ogino, C., Saito, M., Nishimura, K. y Nose, T. 1981b.** Effects of low protein-high calorie diets and deletion of trace elements from a fish meal diet on reproduction of rainbow trout. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 47:645-654.
- Tanaka, H., Kagawa, H., Okuzawa, K. y Hirose, K. 1993.** GtH.Purification of gonadotropin (Pm GTH I and II) from red sea bream (*Pagrus major*) and development of a homologous radioimmunoassay for Pm GTHII. *Fish Physiol. Biochem.* 10:409-418.
- Tocher, D.R. y Sargent, J.R. 1984.** Analysis of lipids and fatty acids in ripe roes of some northwest European marine fish. *Lipids.* 19(7):492-499.
- Tocher, D.R., Fraser, A.J., Sargent, J.R. y Gamble, J.C. 1985.** Fatty acid composition of phospholipids and neutral lipids during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids.* 20:84-89.
- Tokarz, R.R. 1978.** Oogonial proliferation, oogenesis and folliculogenesis in non mammalian vertebrates. En: *The vertebrate ovary* (R.E. Jones, Edr.). Pp.145-179. Plenum Press, New York.

- Tortonese, E. 1986a.** Moronidae (included in Serranidae by earlier authors, and in Percichthyidae sensu Gosline, 1966 by some recent authors). En: *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*, vol. 2. (P.J.P. Whitehead, M.L. Bauchot, J.C. Hureau, J. Nielsen y E. Tortonese, Eds.). Pp.793-796. UNESCO, Paris.
- Tortonese, E. 1986b.** Serranidae (including Anthiidae of some recent authors).En: *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*, Vol.2. (P.J.P. Whitehead, M.L. Bauchot, J.C. Hureau, J. Nielsen y E. Tortonese, Eds.). Pp.780-792. UNESCO, Paris.
- Trant, J.M. y Thomas, P. 1988.** Structure-activity relationship of steroids in inducing germinal vesicle breakdown of atlantic croaker oocytes *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71:307-317.
- Trant, J.M. y Thomas, P. 1989.** Isolation of a novel maturation-inducing steroid produced *in vitro* by ovaries of atlantic croaker. *Gen. Comp. Endocrinol.* 75:397-404.
- Trudeau, V.L., Sloley, B.D., Wong, A.O.L., y Peter, R.E. 1991a.** Mechanisms of sex steroid negative and positive feedback control of gonadotropin (GTH) secretion in teleosts. En: *Proceedings of the fourth international symposium on the reproductive physiology of fish*, Norwich,U.K., 7-12 July 1991 (A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime y M.S. Rolfe, Eds.). Pp.224-226. FishSymp91, Sheffield.
- Trudeau, V.L., Peter, R.E. y Sloley, B.D. 1991b.** Testosterone and estradiol potentiate the serum gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in goldfish. *Biology of Reproduction.* 44:951-960.
- Trudeau, V.L., Lin, H.R. y Peter, R.E. 1991c.** Testosterone potentiates the serum gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in the common carp (*Cyprinus carpio*) and chinese loach (*Paramisgurnus dabryanus*). *Can. J. Zool.* 69:2480-2484.

- Trudeau, V.L., Murthy, C.K., Habibi, H.R., Sloley, B.D. y Peter, R.E. 1993.** Effects of sex steroid treatments on gonadotropin-releasing hormone-stimulated gonadotropin secretion from the goldfish pituitary. *Biol. Reprod.* 48:300-307.
- Truscott, B., Idler, D.R., So, Y.P. y Walsh, J.M. 1986.** Maturation steroids and gonadotropin in upstream migratory sockeye salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 62:99-110.
- Tyler, C. 1991.** Vitellogenesis in salmonids. En: *Proceedings of the fourth international symposium on the reproductive physiology of fish*. Norwich, U.K., 7-12 July 1991 (A.P. Scott, D.E. Kime y J.P. Sumpter, Eds.). Pp.295-299. Fish Symp 91, Sheffield.
- Tyler, C.R., Sumpter, J.P. y Bromage, N.R. 1988.** Selectivity of protein sequestration by the vitellogenic oocytes of the rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. *J. Exp. Zool.* 248:199-206.
- Tyler, C.R., Sumpter, J.P., Kawachi, H. y Swanson, P. 1991.** Involvement of gonadotropin in the uptake of vitellogenin into vitellogenic oocytes of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 84:291-299.
- Van der Kraak, G., Donaldson, E.M. y Chang, J.P. 1986.** Dopamine involvement in the regulation of gonadotropin secretion in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Can. J. Zool.* 66:1245-1248.
- Vera, J. 1992.** Diccionario multilingüe de especies marinas para el mundo hispano. (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Edr.). Ediciones Gráficas Ortega, Madrid
- Viola, S. y Arieli, Y. 1982.** Nutrition study with high protein pellet for carp and *Sarotherodon* spp. (Tilapia). *Bamidgeh.* 34:39-46.
- Viola, S. y Arieli, Y. 1983.** Nutrition studies with tilapia (*Sarotherodon*). 1. Replacement of fish meal by soybean meal in feeds for intensive tilapia culture. *Bamidgeh.* 35:9-17.

- Viola, S., Mokadi, S., Rappaport, V. y Arieli, Y. 1981.** Partial and complete replacement of fish meal by soybean meal in feeds for intensive culture of carp. *Aquaculture*. 26:223-236.
- Von Bayer, H. 1950.** A method for measuring fish eggs. *Prog. Fish-Cult.* 2:105-107.
- Voss, A., Reinhardt, M., Sankarappa, S. y Sprecher, H. 1991.** The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4 desaturase. *J. Biol. Chem.* 266:19995-20000.
- Wallace, R.A. 1985.** Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. En: *Developmental biology Vol. I* (L.W. Browder, Edr.). Pp. 127-177. Plenum Press, New York.
- Wallace, R.A. y Selman, K. 1990.** Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J. Electr. Microsc. Tech.* 16:175-201.
- Warnhoff, M., Dorsch, G. y Pirke, K.M. 1983.** Effect of starvation on gonadotrophin secretion and on in vitro release of LHRH from the isolated median eminence of the male rat. *Acta Endocrinol.* 103:293-301.
- Washburn, B.S., Frye, D.J., Hung, S.S.O., Doroshov, F.S. y Conte, F.S. 1990.** Dietary effects on tissue composition, oogenesis and the reproductive performance of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 90:179-195.
- Watanabe, T. 1993.** Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *Journal of the World Aquaculture Society*. 24:152-161.
- Watanabe, T., Itoh, A., Kitajima, C. y Fujita, S. 1984a.** Effect of dietary protein levels on reproduction of red sea bream. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 50:1015-1022.
- Watanabe, T., Arakawa, T., Kitajima, C. y Fujita, S. 1984b.** Effect of nutritional quality of broodstock diets on reproduction of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 50:495-501.

- Watanabe, T., Itoh, A., Murakami, A., Tsukashima, Y., Kitajima, C. y Fujita, S. 1984c.** Effect of nutritional quality of diets given to broodstock on the verge of spawning on reproduction of red sea bream. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 50:1023-1028.
- Watanabe, T., Ohhashi, S., Itoh, A., Kitajima, C. y Fujita, S. 1984d.** Effect of nutritional quality of broodstock diets on chemical components of red sea bream broodstock and eggs produced. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 50:503-515.
- Watanabe, T., Takeuchi, T., Saito, M. y Nishimura, K. 1984e.** Effect of low protein-high calory or essential fatty acid deficiency diet on reproduction of rainbow trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 50:1027-1215.
- Watanabe, T., Ohhashi, S., Itoh, A., Kitajima, C. y Fujita, S. 1984f.** Effect of nutrtrional composition of diets on chemical components of red seabram broodstock and eggs produced. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 50:1015-1022.
- Watanabe, T., Itoh, A., Satoh, S., Kitajima, C. y Fujita, F. 1985.** Effect of dietary protein levels on chemical components of eggs produced by red sea bream broodstock. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 51:1501-1509.
- Watanabe, T., Izquierdo, M.S., Takeuchi, T., Satoh, S. y Kitajima, C. 1989a.** Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficacy in larval red seabream. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 55:1635-1640.
- Watanabe, T., Arakawa, T., Takeuchi, T. y Shuichi, S. 1989b.** Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficacy in larval juvenil striped jack *Pseudocaranx dentex*. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 55:1989-1995.
- Watanabe, T., Fujimura, T., Lee, M., Fukusho, K., Satoh, S. y Takeuchi, T. 1991a.** Effect of polar and nonpolar lipids from krill on quality of eggs of red seabream *Pagrus major*. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 57:695-698.

- Watanabe, Y., Lee, M., Mizutani, J., Yamada, T., Satoh, S., Takeuchi, T., Yoshida, N., Kitada, T. y Arakawa, T. 1991b. Effective components in cuttlefish meal and raw krill for improvement of quality of red seabream *Pagrus major* eggs. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 57:681-694.
- Watanabe, T. y Kiron, V. 1995. Red Sea Bream (*Pagrus major*). En: *Broodstock management and egg and larval survival* (N.R. Bromage y R.J. Roberts, Eds.). Pp.398-413. Blackwell Science, Oxford.
- Wiegand, M.D. y Idler, D.R. 1982. Synthesis of lipids by the rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) ovary in vitro. *Can. J. Zool.* 60:2683-2693.
- Witthames, P.R. y Greer Walker, M. 1987. An automated method for counting and sizing fish eggs. *J. Fish Biol.* 30:225-235.
- Yamamoto, K. 1956. Studies on the formation of fish egg I. Annual cycle in the development of ovarium eggs in the flounder, *Liopsetta obscura*. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univers. S. VI.* 12:362-373.
- Yamamoto, K. y Yamazai, F. 1959. A preliminary report on the formation of the egg of the trout (*Oncorhynchus masou*). *Bull. Hokkaido. Reg. Fish. Res. Lab.* 20:109-116.
- Yamamoto, K. y Yamazai, F. 1961. Rhythms of development in the oocyte of the *Carassius auratus*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univer.* 12:93-110.
- Yaron, Z. 1995. GnRH Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture*. 129:49-73.
- Yoshikuni, M., Shibata, N. y Nagahama, Y. 1993. Specific binding of [³H] 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one to oocyte of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish. Physiol. Biochem.* 11:15-24.

- Yu, K.L., Nahorniak, C.S., Peter, R.E., Coorigan, A., Rivier, J.E. y Vale, W.W. 1987.** Brain distribution of radioimmunoassayable gonadotropin-releasing hormone in female goldfish: seasonal variation and periovulatory changes. *Gen. Comp. Endocrinology*. 67:234-246.
- Zanuy, S. y Carrillo, M. 1973.** Estudio histológico del ovario de cabrilla (*Paracentropristis cabrilla*) (L.) en relación con la ovogénesis. *Investigación Pesquera*. 37:147-165.
- Zanuy, S. y Carrillo, M. 1987.** La reproducción de los teleósteos y su aplicación en acuicultura. En: *Reproducción en Acuicultura* (J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta, Eds). CAICYT. Industrias Gráficas España, S.L., Madrid.
- Zanuy, S., Carrillo, M. y Ruiz, F. 1986.** Delayed gametogenesis and spawning of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L) kept under different photoperiod and temperature regimes. *Fish Physiol. Biochem.* 2:53-63.
- Zanuy, S., Prat, F., Bromage, N., Carrillo, M. y Serrano, R. 1989.** Photoperiodic effects on vitellogenesis, steroid hormone levels and spawning time in the female sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 74:253
- Zanuy, S., Prat, F., Carrillo, M. y Bromage, N.R. 1995.** Effects of constant photoperiod on spawning and plasma 17 β -oestradiol levels of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquat. Living Resour.* 8:147-152.
- Zastrow, C.E., Houde, E.D. y Saunders, E.H. 1990.** Quality of striped bass (*Morone saxatilis*) eggs in relation to river source and female weight. *Rapp. P. -V Réun. Cons. Int. Explor. Mer.* 91:34-42.
- Zelinski-Wooten, M.B., Hutchison, J.S., Hess, D.L., Wolf, D.P. y Stouffer, R.L. 1995.** Follicle stimulating hormone alone supports follicle growth and oocyte development in gonadotrophin-releasing hormone antagonist-treated monkeys. *Human Reproduction*. 10:1658-1666.

Zohar, Y., Billard, R. y Weil, C. 1984. La reproduction de la daurade (*Sparus aurata*) et du bar (*Dicentrarchus labrax*): connaissances du cycle sexuel et contrôle de la gamétogenèse et de la ponte. *L'Aquaculture du bar et des Sparidés*.3-24.

Zohar, Y., Elizur, A., Sherwood, N.M., Powell, J.F.F., Rivier, J.E. y Zmora, N. 1995. Gonadotropin-releasing activities of the three native forms of gonadotropin-releasing hormone present in the brain of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 97:289-299.

Zohar, Y., Harel, M., Hassin, S., y Tandler, A. 1995. Gilt-Head Sea Bream (*Sparus aurata*). En: *Broodstock management and egg and larval quality* (N.R. Bromage y R.J. Roberts, Eds.). Pp.94-117. Blackwell Science, Oxford.