

**EFECTOS DE LAS DIETAS  
EXPERIMENTALES EN LA RESPUESTA  
INMUNE DE LOS PECES**

**LÍLIAN BARANDICA CAÑON  
JULIO DEL 2010**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Biociencias  
Universidad Autónoma de Barcelona**





# **EFFECTOS DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES EN LA RESPUESTA INMUNE DE LOS PECES**

Memoria de la tesis doctoral para obtener el título de doctora de la Universidad Autónoma de Barcelona, en el programa de doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

El presente trabajo se ha realizado en el grupo de Inmunofisiología y acuicultura del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona, bajo la dirección del Dr. Lluís Tort.

Bellaterra, julio 2010

**Lílian Barandica Cañón**

**Lluís Tort Bardolet**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Biociencias  
Universidad Autónoma de Barcelona**





***“Stress is life and life is stress”***

Hans Selye 1956-1976

**“El estrés es la vida y la vida es estrés”**



## ÍNDICE

<b>*1. ABREVIATURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>*ESPECIES NOMBRADAS</b> .....	<b>7</b>
<b>2. INTRODUCCION GENERAL</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1. Los peces como grupo evolutivo</b> .....	<b>9</b>
<b>2.2. Especies en estudio</b> .....	<b>9</b>
<b>2.2.1. Dorada <i>Sparus aurata</i></b> .....	<b>9</b>
<b>2.2.1.1. Morfología:</b> .....	<b>9</b>
<b>2.2.1.2. Biología:</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2.1.3. Importancia:</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2.2. Lubina <i>Dicentrarchus labrax</i></b> .....	<b>10</b>
<b>2.2.2.1 Morfología:</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2.2.2. Biología:</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2.2.3. Importancia:</b> .....	<b>11</b>
<b>3. EL ESTRÉS EN LOS PECES</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1. Estrés y la activación del sistema de respuesta</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1.1. Respuestas primaria, secundaria y terciaria al estrés</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2. Factores estresantes</b> .....	<b>18</b>
<b>3.3.1. Indicadores neuroendocrinos (Adrenalina y cortisol)</b> .....	<b>19</b>
<b>3.3.2. Índices metabólicos de respuesta secundaria</b> .....	<b>19</b>
<b>3.3.3. Sistema inmunitario, estrés y respuesta inmunitaria</b> .....	<b>21</b>
<b>4. COMPONENTES NUTRICIONALES EN ACUICULTURA</b> .....	<b>21</b>
<b>4.1 Introducción</b> .....	<b>21</b>
<b>4.1.2. Componentes y efectos de las dietas</b> .....	<b>22</b>
<b>4.1.2.1. Ácidos grasos</b> .....	<b>22</b>
<b>4.1.2.2. Vitaminas:</b> .....	<b>33</b>
<b>4.1.2.3. Aminoácidos:</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1.2.4. Los carbohidratos</b> .....	<b>40</b>
<b>4.1.2.5. Los minerales</b> .....	<b>41</b>
<b>* OBJETIVOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>45</b>
<b>5. CAPÍTULO 1: EFECTO DEL ESTRÉS AGUDO POR MANEJO E INFECCION CON LPS EN DORADA <i>Sparus aurata</i></b> .....	<b>47</b>
<b>5.1. Introducción</b> .....	<b>47</b>
<b>5.1.1. El cortisol y el sistema inmune</b> .....	<b>47</b>
<b>5.1.2. Indicadores inmunitarios del estrés</b> .....	<b>48</b>
<b>5.1.3. Inmunosupresión inducida por estrés</b> .....	<b>49</b>
<b>5.2. Experimento 1</b> .....	<b>51</b>
<b>5.2.1. Objetivo</b> .....	<b>51</b>
<b>5.2.2. Materiales y métodos</b> .....	<b>51</b>
<b>5.2.2.1. Animales experimentales</b> .....	<b>51</b>
<b>5.2.2.2. Manipulación y captura</b> .....	<b>51</b>
<b>5.2.2.3. Infección experimental</b> .....	<b>52</b>
<b>5.2.3. Obtención de muestras</b> .....	<b>52</b>
<b>5.2.3.1. Obtención del suero</b> .....	<b>52</b>
<b>5.2.3.2.1. Técnicas analíticas</b> .....	<b>52</b>

5.2.3.2.1.1. Bacteriolisis .....	52
5.2.3.2.1.2. Lisozima.....	53
5.2.3.2.1.3. Complemento.....	53
5.2.3.2.1.4. Osmolalidad .....	53
5.2.3.2.1.5. Cortisol.....	53
5.2.7. Análisis estadístico .....	53
5.2.8. Resultados .....	53
5.2.8.1. Manipulación y captura.....	53
5.2.8.1.1. Actividad bacteriolítica.....	53
5.2.8.1.2. Actividad de la Lisozima.....	54
5.2.8.1.3. Actividad del complemento .....	55
5.2.8.1.4. Osmolalidad .....	55
5.2.8.1.5. Cortisol .....	56
5.2.8.2. Infección experimental con LPS .....	56
5.2.8.2.1. Actividad bacteriolítica .....	56
5.2.8.2.2. Actividad de la Lisozima.....	57
5.2.8.2.3. Actividad del complemento .....	57
5.2.8.2.4. Osmolalidad .....	58
5.2.8.2.5. Cortisol .....	58
5.2.9. Conclusión .....	62
<b>6. CAPÍTULO 2: LOS INMUNOESTIMULANTES EN ACUICULTURA.....</b>	<b>63</b>
6.1. Introducción .....	63
6.2. Experimento 2 .....	66
<b>INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE UN INMUNO-ESTIMULADOR</b>	
<b>TIPO MANANO OLIGOSACÁRIDOS (MOS) EN LA DIETA DE LUBINAS</b>	
<b>JUVENILES (<i>Dicentrarchus labrax</i>).....</b>	<b>66</b>
6.2.1. Objetivo .....	66
6.2.2. Materiales y métodos .....	66
6.2.2.3. Animales experimentales.....	66
6.2.2.4. Diseño experimental .....	67
6.2.3. Preparación de muestras y recogida de sangre.....	67
6.2.3.1. Técnicas analíticas.....	68
6.2.3.2. Análisis estadístico .....	68
6.2.4. Resultados .....	68
6.2. Experimento 3 .....	70
<b>INFLUENCIA DEL INMUNO-ESTIMULADOR GLUCANO-MANANO EN LA</b>	
<b>DIETA DE DORADAS JUVENILES <i>Sparus aurata</i>.....</b>	<b>70</b>
6.2.1. Objetivo .....	70
6.2.2. Materiales y métodos .....	70
6.2.2.1. Dietas .....	70
6.2.2.2. Animales experimentales.....	70
6.2.2.3. Diseño experimental .....	71
6.2.4.4. Análisis estadístico .....	72
6.3. Resultados .....	72
6.4. Discusión.....	73
6.5. Conclusión.....	76

7.1. Introducción .....	77
7.2. Experimento 4 .....	79
<b>EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) EN LA DIETA SOBRE LA RESPUESTA INMUNITARIA DE LUBINAS JUVENILES <i>Dicentrarchus labrax</i> .....</b>	<b>79</b>
7.2.1. Objetivo .....	79
7.2.2. Materiales y métodos .....	79
7.2.2.1. Dietas .....	79
7.2.2.2. Animales experimentales.....	79
7.2.2.3. Diseño experimental .....	79
7.2.2.4. Preparación de muestras y recogida de sangre .....	80
7.2.2.4.1. Técnicas analíticas .....	80
7.2.2.4.1.1. Lisozima.....	80
7.2.2.4.1.2. Complemento .....	80
7.2.2.5. Análisis estadístico .....	80
7.2.3. Resultados .....	81
7.3. Experimento 5 .....	82
<b>EFFECTOS DE LA SUSTITUCIÓN TOTAL DE ACEITE DE PESCADO POR ACEITES VEGETALES EN LA DIETA DE DORADAS JUVENILES <i>Sparus aurata</i> .....</b>	<b>82</b>
7.3.1. Objetivo .....	82
7.3.2. Materiales y métodos .....	82
7.3.2.1 Dietas .....	82
7.3.2.2. Animales experimentales.....	82
7.3.2.3. Diseño experimental .....	83
7.3.2.4. Análisis estadístico .....	83
7.3.3. Resultados .....	84
7.4. Discusión .....	85
7.5. Conclusión.....	88
<b>8. CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>89</b>
8.1. Discusión general.....	89
8.2. Conclusiones generales.....	91
<b>9. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS .....</b>	<b>92</b>
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>95</b>
<b>11. AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>127</b>



## \*1. ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
A	Adrenalina
AA	Ácido araquidónico
ACTH	Hormona adrenocorticotropina
ACP	Vía alternativa del complemento
APP	Proteínas de fase aguda
APR	Respuesta de fase aguda
CA	Catecolaminas
CLA	Ácido linoléico conjugado
COX	Ciclooxigenasa
CPO	Aceite crudo de palma
CRF	Factor liberador de la corticotropina
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
CRP	Proteína C reactiva
DHA	Ácido docosahexaenoico
DHGLA	Ácido dihomogammalinolénico
EFA	Ácido graso esencial
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FA	Ácido graso
FFA	Ácido graso libre
FO	Aceite de pescado
GAS	Síndrome de adaptación general
GCs	Glucocorticoides
GLA	Ácido gammalinolénico
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HPA	Hipotálamo pituitaria adrenal
HPI	Hipotálamo pituitaria interrenal
HSC	Hipotálamo simpático cromafín
HSI	Índice hepatosomático
HSP	Proteínas de choque térmico
SNC	Sistema nervioso central
HUFAs	Ácidos grasos altamente insaturados
IDL	Lipoproteínas intermedias
Igs	Inmunoglobulinas
IL	Interleucina
IROs	Intermediarios reactivos del oxígeno
LA	Ácido linoleico
ALA	Ácido alfa linolénico
LCAT	Enzima colesterol transferasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LNA	Ácido linolénico
LO	Aceite de linaza
LOX	Lipooxigenasa
LPS	Lipopolisacárido
LT	Leucotrienos
LX	Lipoxinas
MOS	Manano oligosacárido
MSH	Hormona estimulante de los melanocitos

MUFAs	Ácidos grasos monoinsaturados
NA	Noradrenalina
NBT	Nitro azul tetrazolio
NL	Lípidos neutros
PA2	Fosfolipasa A2
PC	Fosfatidilcolina
PFDA	Ácido graso destilado de palma
PGs	Prostaglandinas
POMC	Pro-opiomelanocortina
PUFAs	Ácidos grasos Poliinsaturados
RO	Aceite de colza
SAP	Proteína sérica amiloide
SFAs	Ácidos grasos saturados
SO	Aceite de soja
TAG	Triacilglicerol
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRH	Hormona liberadora de la tiroides
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
VO	Aceite vegetal
α-T	Alfa-tocoferol o vitamina E

## \*ESPECIES NOMBRADAS

N. COMÚN INGLES	N. CIENTÍFICO	N. COMÚN ESPAÑOL
Lake sturgeon	<i>Acipenser fulvescens</i>	Esturión de lago
Wolffish	<i>Anarhichas lupus</i>	Pez lobo
Japanese eel	<i>Anguilla japonica</i>	Anguila japonesa
Asian Catfish	<i>Clarias batrachus</i>	Gato de río asiático
African Catfish	<i>Clarias gariepinus</i>	Gato de río africano
Herring	<i>Clupea harengus</i>	Arenque Atlántico
Lumpsucker	<i>Cyclopterus lumpus</i>	Lumpo
Common carp	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa común
European Seabass	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Lubina
Sharpsnout seabream	<i>Diplodus puntazzo</i>	Sargo picudo
Grouper	<i>Epinephelus malabaricus</i>	Mero
Atlantic Cod	<i>Gadus morhua</i> ,	Bacalao
Atlantic Halibut	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Halibut
Channel Catfish	<i>Ictalurus punctatus</i>	Gato de río
Barramundi	<i>Lates calcarifer</i>	Barramundi
Haddock	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	Róbalo
Striped bass	<i>Morone saxatilis</i>	Lubina estriada
Dogfish	<i>Mustelus canis</i>	Pintarroja
Golden shiner	<i>Notemigonus crysoleucas</i>	Sardinilla de quilla
Blue tilapia	<i>Oreochromis aureus</i>	Tilapia azul
Chum salmon	<i>Oncorhynchus keta</i>	Salmón chum
Mozambique tilapia	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Tilapia de mozambique
Rainbow trout	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trucha arco iris
Red tilapia	<i>Oreochromis sp.</i>	Tilapia roja
Chinook salmon	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Salmón boquinegro
Red seabream	<i>Pagellus bogaraveo</i>	Besugo
Red porgy	<i>Pagrus pagrus</i>	Pargo común
Yellowtail catfish	<i>Pangasius pangasius</i>	Gato de río amarillo
Japanese flounder	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Platija japonesa
Yellow perch	<i>Perca flavescens</i>	Perca amarilla
Plaice	<i>Pleuronectes platessa</i>	Platija
Turbot	<i>Psetta maxima</i>	Rodaballo
Yellow croaker	<i>Pseudosciaena crocea</i>	Corvina amarilla
Atlantic Salmon	<i>Salmo salar</i>	Salmón Atlántico
Artic char	<i>Salvelinus alpinus</i>	Trucha alpina
Brown trout	<i>Salmo trutta</i>	Trucha marrón o común
Brook trout	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Trucha de arroyo
Brill	<i>Scophthalmus rhombus</i>	Rémol
Turbot	<i>Scophthalmus maximus</i>	Rodaballo
Dogfish	<i>Scyliorhinus canicula</i>	Pintarroja
Senegalese sole	<i>Solea senegalensis</i>	Lenguado senegalense
Gilthead Seabream	<i>Sparus aurata</i>	Dorada



## 2. INTRODUCCION GENERAL

### 2.1. Los peces como grupo evolutivo.

Los peces son considerados como la base evolutiva vertebrada tras su radiación en el devónico y constituyen en la actualidad el grupo más exitoso y diversificado de los vertebrados. Son organismos heterogéneos y representan una aparente encrucijada entre la respuesta inmunitaria innata y la aparición de una respuesta inmunitaria adaptativa (Tort, *et al.* 2003). Además son ampliamente divergentes representado aproximadamente por 24.600 especies que ocupan distintos habitats (Nelson, *et al.* 1999).

### 2.2. Especies en estudio

#### 2.2.1. Dorada *Sparus aurata*

Peces teleósteos: Clase: Actinopterigios (peces con aletas radiadas)  
Orden: Perciforme  
Familia: Sparidae



(Figura tomada Provincia di Venezia)

#### 2.2.1.1. Morfología:

De cuerpo ovalado alto y comprimido. Perfil dorsal convexo, ojos pequeños, cabeza con escamas; preopérculo desnudos; labios gruesos; boca baja y muy poco inclinada; tiene de 4 a 6 dientes caniformes anteriores en cada mandíbula, seguido por otros más pequeños que pasan a ser molariformes, en la parte delantera formando de 2 a 4 hileras. De 11 a 13 branquiespinas sobre el primer arco branquial. La línea lateral consta de 73 a 85 escamas. Poseen una sola aleta dorsal con una parte espinosa y otra formada por radios blandos. Las pectorales son grandes y en forma de cuña. Las ventrales torácicas con una espina y cinco radios blandos. La aleta caudal es bifurcada. Su color es gris plateado, una gran mancha negra entre el opérculo y el origen de la línea lateral. Se caracterizan por una banda dorada entre los ojos y enmarcada de negro y una línea oscura

longitudinal en la dorsal. La aleta caudal es en horquilla y las puntas de los bordes negros. Su Talla máxima 70cm.

#### **2.2.1.2. Biología:**

Es una especie de hábitos costeros solitarios o en pequeños grupos (ocasionalmente en bancos voluminosos) sobre fondos rocosos y arenosos. Los jóvenes se encuentran en prados de fanerógamas entre los 2 y 150 m. Son carnívoros, se alimentan de peces, crustáceos y moluscos. En algunas ocasiones son herbívoros. La reproducción es hermafrodita proterándrica (primero son machos y después hembras) y sucede en invierno. Se extienden a lo largo del Mediterráneo pero rara vez en el mar Negro. En el Atlántico Oriental desde las islas Británicas hasta el Senegal, incluidas islas de la macaronesia como las islas Canarias y el archipiélago de Cabo Verde.

#### **2.2.1.3. Importancia:**

Su carne es muy apreciada. Se capturan por diferentes artes (arrastre y trasmallo) o aperos de anzuelo (palangres, caña, al volante). También es presa de los submarinistas recreativos. Su talla mínima de captura legal es 20 cm (Lloris, *et al.* 2002).

#### **2.2.2. Lubina *Dicentrarchus labrax***

Clase: Actinopterygios (peces con aletas radiadas)

Orden: Perciforme

Familia: Moronidae



(Figura tomada de Pesca Áreas de aguas Cabildo de Tenerife / agricultura/pesca)

#### **2.2.2.1 Morfología:**

La lubina es un pez de cuerpo robusto y un poco comprimido, pedúnculo caudal bastante alto. Tiene escamas pequeñas y la línea lateral es simple con 62 a 80 escamas. La cabeza es cónica, el espacio interorbital con escamas cicloides (lisas). La boca es relativamente grande, terminal y ligeramente protráctil. Los dientes son pequeños, presentes en el vómer que es dentado en su parte anterior. Los opérculos tienen dos espinas planas. El preopérculo es dentado con las espinas dirigidas hacia adelante. Las dos aletas son dorsales, la primera espinosa y la segunda formada por una espina y radios blandos. La aleta anal es corta con espinas y radios blandos. Las aletas ventrales están cerca de las pectorales. La

caudal es ligeramente forzada. La coloración del dorso gris plateado con irisado azulado, los flancos argentados, la región ventral con irisados amarillos. Los jóvenes frecuentemente presentan pequeñas manchas negras sobre el cuerpo. Tiene una mancha negra generalmente poco visible, sobre el margen superior del opérculo. Su talla máxima 103 cm. Es una especie demersal, vive en aguas costeras hasta los 100 m, pero es común encontrarlas en los fondos rocosos y arenosos de menos de 50 m. Puede arribar a remontar ríos y vive en las lagunas litorales.

#### **2.2.2.2. Biología:**

Los adultos son solitarios, mientras que los jóvenes forman pequeños grupos. Es una especie carnívora que se alimenta de peces, crustáceos y cefalópodos. La reproducción tiene lugar de enero a marzo. Se encuentra en todo el mediterráneo incluso en el mar Negro, en el Atlántico oriental, desde el sur de Noruega hasta el Senegal y también en las islas Canarias.

#### **2.2.2.3. Importancia:**

Su carne es muy apreciada, es objeto de cultivo y engorde en jaulas marinas. Su captura forma parte de la pesca artesanal y deportiva. Se captura con artes claro, cercamiento, arrastre trasmallo, palangres, caña, al volante, curricanes y arpón.

### **3. EL ESTRÉS EN LOS PECES**

Los organismos requieren una buena comunicación entre sus sistemas inmune, nervioso y endocrino para responder adecuadamente a los cambios en su ambiente. En este sentido se comprueba la existencia de un importante número de interconexiones, constituyendo una compleja red de transmisores entre los tres sistemas (Tort, *et al.* 1998). Esta comunicación bi-direccional es posible gracias a que las señales moleculares sintetizadas por células y tejidos de los tres sistemas son similares (Turnbull, *et al.* 1999; Baigent, *et al.* 2001). Dicha comunicación involucra una compleja red de señales, cuyos mensajeros (hormonas y citocinas de los sistemas neuroendocrinos e inmune) parecen interactuar en íntima colaboración (Engelsma, *et al.* 2002).

Esta intercomunicación es determinante en los cambios psicológicos y fisiológicos necesarios para que el organismo pueda dar una respuesta adecuada a las variaciones ambientales y mantener así su homeostasis (Engelsma, *et al.* 2002).

En los vertebrados en general se ha llamado a este proceso de ajuste continuo de su fisiología a los cambios en el medio ambiente o de **estrés ambiental** (“respuestas de adaptación”), como homeostasia, que tiene lugar por medio de un repertorio de respuestas fisiológicas, endocrinas e inmunológicas que les permiten, hacer frente a los cambios físicos, químicos y biológicos (Flik, *et al.* 2006). En el caso de los animales e incluso en los humanos sometidos a estrés ambiental, coinciden igualmente los cambios de su comportamiento además de los de su fisiología (Flik, *et al.* 2006; Overli, *et al.* 2001).

En el caso concreto de los peces, fueron los primeros vertebrados en desarrollar una respuesta al estrés, que incluye, interrelaciones entre los ejes relacionados con el sistema nervioso y el sistema endocrino (Engelsma, *et al.* 2002; Flik, *et al.* 2006). En peces teleósteos se conoce el efecto neuro-endocrino en el sistema inmune (Weyts, *et al.* 1999; Harris, *et al.* 2000). Sin embargo se conoce poco acerca de las señales de las células inmunes hacia el sistema neuroendocrino en peces. Aunque el rápido descubrimiento de las secuencias de las citocinas, ha hecho posible investigar esta interacción (Engelsma, *et al.* 2002).

Las investigaciones sobre la fisiología del estrés se basaron en los trabajos de Cannon (Cannon, *et al.* 1929) que describió los cambios en las funciones corporales durante “las situaciones que estimulan las emociones”. Por ejemplo: el aumento del ritmo cardiaco, ritmo respiratorio, presión sanguínea y azúcar en la sangre, como la disminución de la función gástrica e intestinal, atribuidas por el incremento de la actividad del sistema nervioso simpático. Además, Canon concluye que todos estos efectos sirven para aumentar la capacidad de un individuo a reaccionar activamente a situaciones críticas, para preparar “la lucha o la huida”.

Pocos términos son tan frecuentemente utilizados en biología, medicina, psicología y sociología como “estrés”. La definición ha cambiado a lo largo de la historia (Selye, *et al.* 1950; Engel, *et al.* 1998; Levine, *et al.* 1991). El endocrinólogo Hans Selye, introdujo el término estrés y estresante dentro de la investigación biomédica; señaló que frente a cualquier agente agresor al organismo, se producen simultáneamente una serie de reacciones típicas, en función del estímulo agresor (estresante), y otros grupos de reacciones atípicas (siempre las mismas), independientemente de la naturaleza de los estímulos. Estas reacciones suponen: aumento de la actividad suprarrenal, atrofia del sistema metabólico de las grasas, otras como pérdida o aumento del peso, aumento del cortisol en sangre, etc, así como incremento de la actividad del córtex adrenal, dato particularmente importante.

El síndrome de adaptación general (GAS) engloba los cambios que se producen como respuesta al “estrés” ambiental (Roberts, *et al.* 1981). Este conjunto de manifestaciones atípicas reciben diferentes nombres: Síndrome de Estrés, o también Ley de Selye. El GAS tiene distintas etapas según la duración del agente estresante: a) reacción de alarma inicial, b) fase de resistencia, y c) fase de agotamiento (Cannon, *et al.* 1929; Roberts *et al.* 1981; Maule, *et al.* 1989). En la tabla 1, se enumeran las características más importantes del síndrome de adaptación general.

Tabla 1. Síndrome de adaptación general o Ley de Selye.

SINDROME DE ADAPTACIÓN GENERAL O LEY DE SELYE 1963		
Reacción de alarma inicial	Fase de resistencia	Fase de agotamiento
<p>La primera reacción del animal, es intentar huir o enfrentar el peligro, lo cual activa un amplio rango de funciones fisiológicas:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Activación motora, ritmo cardíaco, flujo sanguíneo hacia los órganos más activos: cerebro corazón y músculos esqueléticos.</li> <li>2. Flujo sanguíneo hacia las branquias y estímulo de la captación de oxígeno.</li> <li>3. Aumento de la tasa metabólica basal e intermedia</li> </ol>	<p>Continúa el estrés, el animal trata de adaptarse a la nueva situación y los niveles de las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) volverían a valores normales y se libera el cortisol</p>	<p>Se mantiene la situación de estrés y los niveles de cortisol durante un largo período y la activación del metabolismo interfieren con los demás procesos fisiológicos y pueden llegar a ser letales para el animal.</p>

De esta manera el estrés se puede definir como una situación en la cual el equilibrio homeostático es modificado como consecuencia de la acción de un estímulo (intrínseco o extrínseco) al organismo, denominado agente estresante (Tort, *et al.* 1998; Overli, *et al.* 2001, 2004; Wendelaar Bonga, *et al.* 1997). El animal responde mediante una serie de reacciones de comportamiento y/o fisiológicas con objeto de compensar y/o adaptarse a la nueva situación (Overli, *et al.* 2001, 2004; Wendelaar Bonga, *et al.* 1997).

### 3.1. Estrés y la activación del sistema de respuesta

En los vertebrados superiores (mamíferos) el conjunto de sistemas orgánicos interrelacionados implicados en la respuesta a las situaciones de estrés se denomina eje HPA (eje hipotálamo-pituitaria-adrenal). Mientras que en los peces el eje HPA es conocido como el eje hipotálamo-pituitario-interrenal (HPI). Puesto que no poseen una glándula adrenal como tal, sino un conjunto difuso de células interrenales.

El término “eje del estrés” se ha utilizado en los peces debido a la clara interacción entre los estímulos al estrés y las funciones de las células del eje HPI (Weyts, *et al.* 1999). Asimismo, en los peces existe un segundo eje fisiológico implicado en el conjunto de la respuesta a los factores estresantes: el eje Hipotálamo Simpático Cromafín (HSC). Los estresantes son primero percibidos por los sensores del sistema nervioso central (SNC) en el hipotálamo, donde se estimulan los dos grandes ejes reguladores: el HPI y el HSC (Weyts, *et al.* 1999). En el eje HSC, la síntesis y liberación de las catecolaminas (CA) (adrenalina (A), noradrenalina (NA) en la circulación, está estimulada por las fibras colinérgicas del sistema simpático y un leve aumento tardío (retraso en minutos) de la liberación de las hormonas glucocorticoides (GC). Los somas de esas neuronas hipotalámicas se encuentran en centros neuronales del hipotálamo anterior y medial.

Las catecolaminas (CA) son liberadas de la médula adrenal en los mamíferos. En los peces teleósteos se sintetizan en las células cromafines dispuestas en la pared de la vena cardinal posterior en la región del riñón anterior (Nilsson 1984; Reid, Bernier and Perry 1998) y activa varias respuestas de tipo cardiovascular, respiratoria y metabólica dirigidas a aliviar los efectos perjudiciales asociados con los estresantes agudos (Perry, *et al.* 2004).

La primera hormona en el eje HPI es la hormona liberadora de la corticotropina (CRH), liberada por las neuronas hipotalámicas de la región pre-óptica. La CRH se ha encontrado en peces, junto con la hormona liberadora de la tiroide (TRH) (Pepels, *et al.* 2002). La TRH y la CRH estimulan la liberación de la hormona adenocorticotropa (ACTH) desde la parte anterior de la pituitaria, que induce la producción y liberación del cortisol por las células interrenales (Wendelaar Bonga, *et al.* 1997; Pepels *et al.* 2002; Pottinger, *et al.* 1995; Pickering, *et al.* 1991; Mommsen, *et al.* 1999). Además de la ACTH, otras hormonas participan en la secreción del cortisol, como el péptido Terminal N, angiotensina, urotensinas I y II, péptido natriurético atrial, entre otros (Mommsen *et al.* 1999). Los teleósteos no poseen un sistema portal y las células corticotrópicas de la adenohipófisis son directamente innervadas por axones del hipotálamo, regulando la liberación de la ACTH.

El cortisol es sintetizado en las células interrenales, que están localizadas en el riñón anterior o pronefrítico, que en los peces es un órgano mixto, compuesto por elementos hematopoyéticos, retículo-endoteliales, endocrinos y excretorios, que participan en la osmo-regulación, hematopoyesis, inmunidad, metabolismo endocrino y excreción (Matty, *et al.* 1985). En el riñón, se localizan las glándulas interrenales, las células cromafines, los folículos tiroideos y una amplia red vascular y nerviosa. Esta ubicación no es aleatoria, revelándose la importante relación entre los tres sistemas, existente en las especies filogenéticamente más antiguas.

Avances recientes en el campo de la fisiología comparativa del estrés sugieren, que el factor liberador de la corticotropina (CRF) juega un papel clave en la regulación e integración de los sistemas neuroendocrino, autónomo, inmune y del comportamiento como respuesta a estresantes (Crespi, *et al.* 2004; Lovejoy, *et al.* 2006; Volkoff *et al.* 2006; Heinrichs, *et al.* 2004). Su aumento provoca la

liberación de otras hormonas como las endorfinas y los péptidos derivados de la pro-opiomelanocortina (POMC) (Matteri, *et al.* 1994). Tanto ACTH como endorfinas y melanotrofinas derivan de un precursor común, la POMC, y son sintetizados por dos tipos celulares: células corticotrofas, de la parte anterior de la hipófisis que secreta como principal producto biológicamente activo la ACTH; en tanto que las hormonas estimulantes de los melanocitos ( $\alpha$ -MSH) y  $\beta$ -endorfinas, son los principales productos secretados por células melanotrofas, localizadas en la parte intermedia de la glándula. La presencia de estos tipos celulares posibilitaría que diferentes tipos de estrés actúen sobre una u otra célula, secretándose hormonas específicas para cada caso (Pepels, *et al.* 2004; Rotllant, *et al.* 2000b). Un gran número de citocinas son ahora conocidas por interactuar con el eje HPA en mamíferos y las células que son parte integral del sistema nervioso también producen citocinas que originalmente se pensó que eran sólo producidas por las células del sistema inmune (Weyts, *et al.* 1998). Las citocinas pro-inflamatorias interleucina (IL)-1, factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) e IL-6, son consideradas las principales efectoras en esta comunicación entre el sistema inmune y el eje HPA en mamíferos (Engelsma, *et al.* 2003).

En las Figuras 1 y 2 se observa el conjunto de órganos implicados en los dos ejes reguladores descritos (Overli, *et al.* 2001; Reid, *et al.* 1998) y un esquema del funcionamiento de estos ejes (según la explicación del texto) (Tort, *et al.* 1998).

#### Cerebro

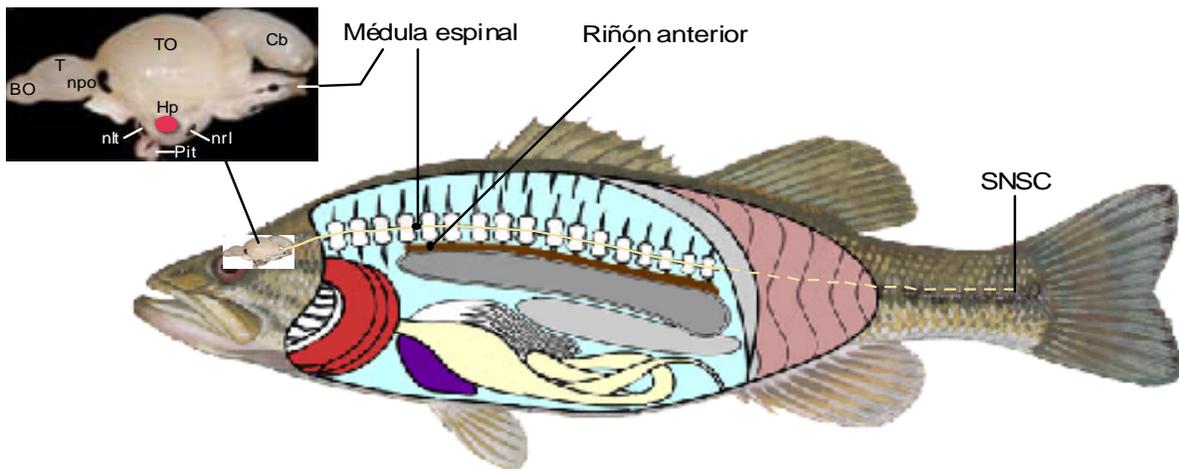


Figura 1. Esquema de la anatomía interna de un pez teleosteo (lubina *Dicentrarchus labrax*) mostrando los principales órganos implicados en los ejes neuroendocrinos Hipotálamo-Hipófisis-Interrenal (HPI) y Hipotálamo-Simpático-Cromafin (HSC).

Abreviaturas: BO: bulbo olfativo, Cb: Cerebelo, Hp: Hipotálamo, nlt: *nucleus laterales tuberis*; npo: *nucleus preopticus*; nrl: *nucleus recessis lateralis*; Pit: Pituitaria o Hipófisis; SNSC: sistema neurosecretor caudal (neurohipófisis), T: telencéfalo, TO: tectum óptico.

Adaptado de J. Cimbaro. The Florida Fish and Wildlife Conservation Commission & Duane Ravers, Jr. (kentuckylake.com 2007) y de N.J. Bernier, 2006 (Bernier, *et al.* 2006).

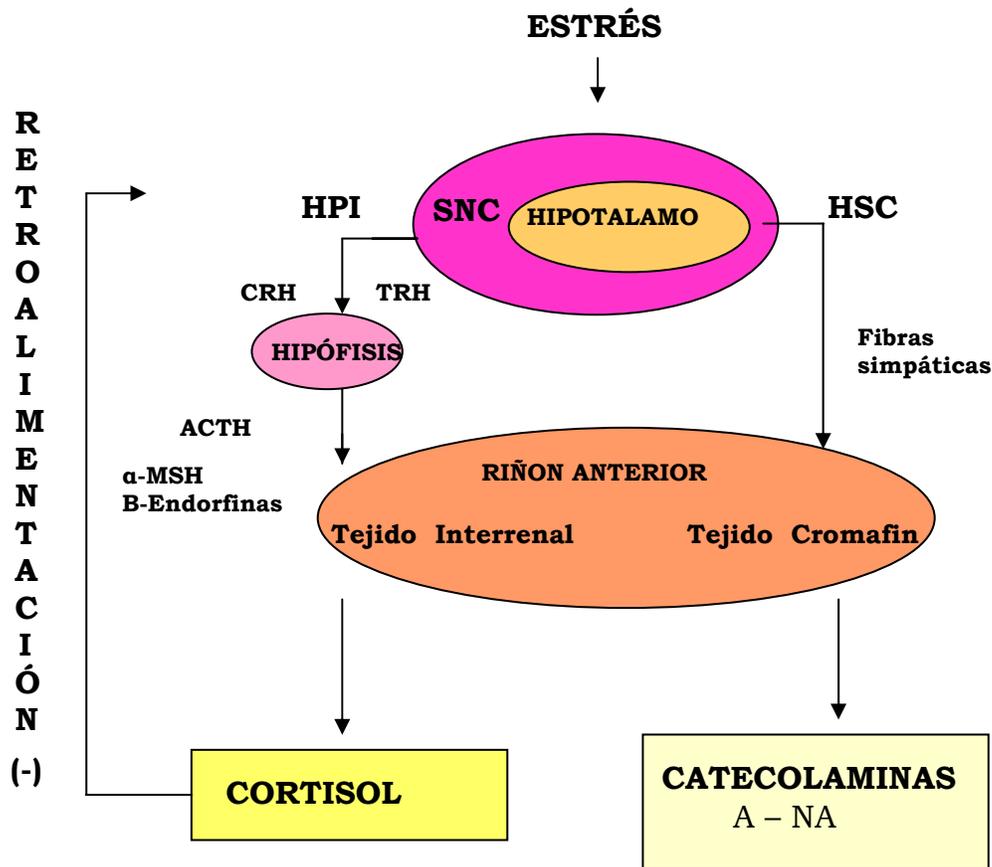


Figura 2.- Esquema de la relación existente en la respuesta a un estímulo estresante (Tort, *et al.* 1998).

### 3.1.1. Respuestas primaria, secundaria y terciaria al estrés

El alcance y la dinámica de la respuesta al estrés pueden ser fuertemente influenciadas por el estado de desarrollo del animal, la gravedad y la duración del estresante entre otros factores. Por ejemplo los factores de la respuesta primaria y secundaria al estrés, pueden manifestar diferentes patrones entre peces maduros o inmaduros expuestos a algún estrés generalizado (Barton, *et al.* 1998; Maule, *et al.* 1991).

En el análisis de las respuestas fisiológicas al estrés en los animales, se distinguen tres tipos de respuestas según los diferentes niveles de organización biológica (Wendelaar Bonga, *et al.* 1997).

a) Respuesta primaria. Consiste en la activación de los núcleos cerebrales, células adenohipofisarias, tejido interrenal y cromafin, con un incremento en los niveles de catecolaminas y corticosteroides adrenales en plasma.

b) Respuesta secundaria. Considerada como las modificaciones fisiológicas originadas por las catecolaminas y corticosteroides: aumento del consumo de oxígeno, actividad cardíaca, hiperglucemia, perturbaciones del equilibrio hidromineral, etc.

c) Respuesta terciaria. Se extiende a nivel del organismo y la población: inhibición del crecimiento, problemas en la reproducción, alteración del sistema inmune y disminución de la tolerancia a nuevas situaciones de estrés (Mommsen, *et al.* 1999; Arends, *et al.* 1999; Moon, *et al.* 1999). Los procesos involucrados en los sistemas de coordinación de las respuestas fisiológicas y del comportamiento, pueden ser compensadas y/o adaptadas permitiendo al animal superar la amenaza. Sin embargo, en algunas ocasiones la respuesta al estrés puede perder su valor adaptativo, pudiendo provocar la inhibición del crecimiento, alterar las características reproductivas e inducir inmuno supresión (Wendelaar Bonga, *et al.* 1997; Weyts, *et al.* 1998) (Figura 3).

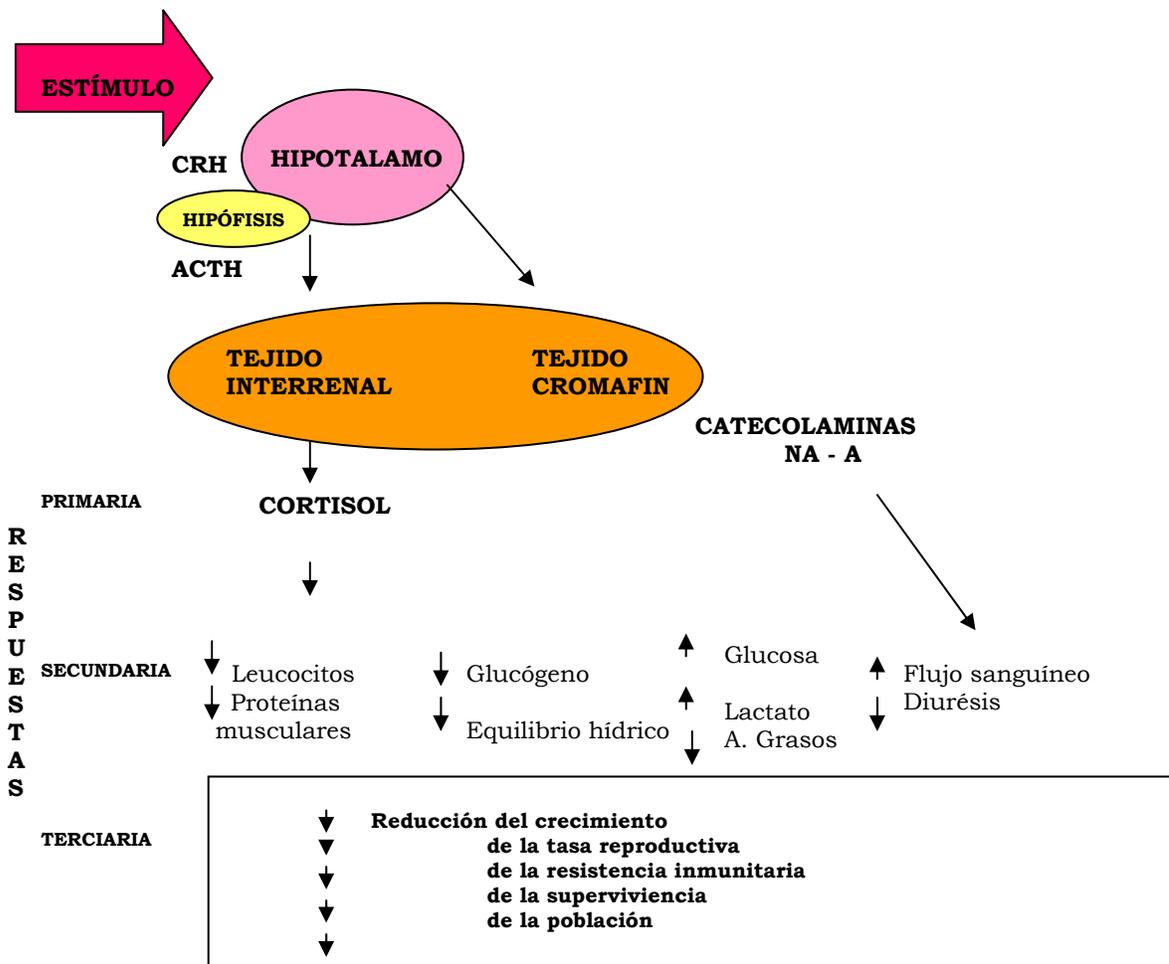


Figura 3.- Tipos de respuestas fisiológicas a estrés desde el punto de vista de los niveles de organización biológica (según Tort, *et al.* 1998).

### 3.2. Factores estresantes

La respuesta al estrés es un proceso que demanda energía (Schreck, *et al.* 1982; Davis, *et al.* 1997). Durante ella, un organismo puede tener menos energía disponible destinada para otras funciones vitales, comprometiéndolas, temporal o permanentemente (Barton, *et al.* 1998).

Las respuestas al estrés son de diferente duración dependiendo de los estresantes y de los indicadores medidos; el tiempo es un factor importante para la recuperación de la homeostasis. La duración del estresante influye significativamente en el estado fisiológico total. Los estresantes agudos involucran rápidos y altos niveles de secreciones de esteroides, seguidos de una recuperación a las pocas horas después de la inducción, siendo por ello reducido el costo energético de estos episodios de estrés. Por el contrario en los casos de estresores crónicos o repetitivos son más constantes los niveles de esteroides secretados, que involucran frecuentemente largos períodos de recuperación, siendo mayor el costo energético y de funcionamiento, debido a la persistencia del estresante y al efecto derivado de la respuesta del estrés al estresante.

Se han identificado numerosos estresores que afectan a los peces. Estos incluyen los cambios físicos extremos del medio ambiente (por ejemplo temperatura, salinidad, pH bajo y turbiedad), interacción animal (por ejemplo predación, parasitismo, competición por espacio, alimentación, parejas sexuales), interferencia humana (incluyendo prácticas acuícolas, por ejemplo, captura y manejo, transporte, anestesia) y aguas contaminadas (por ejemplo con metales pesados) (Weyts, *et al.* 1998; Iwama, *et al.* 1991; Bly, *et al.* 1997; Gerwick, *et al.* 1999; Mazon, *et al.* 2004). La exposición química aumenta hasta tres veces la respuesta integrada al estrés y puede causar inmunosupresión e inmunocompetencia (Wendelaar Bonga, *et al.* 1997). Además son conocidos por iniciar la secreción de las CA en peces, provocando varias alteraciones fisiológicas como anoxia, anemia, acidosis, ejercicio exhaustivo y perturbación física (Nakano, *et al.* 1967; Ristori, *et al.* 1985). Una gran variedad de condiciones tales como la polución, el estrés nutricional y físico, la influencia hormonal puede modificar todo los niveles de almacenamiento de las CA en el tejido cromafín (Reid, *et al.* 1998).

La anorexia es una respuesta característica en los peces sometidos a diversos agentes infecciosos virales, bacterianos y parásitos, a consecuencia de la infección ingieren menos alimentos y se ven afectados sus mecanismos de defensa (Bernier, *et al.* 2006).

Existen también otros efectos en el comportamiento. Por ejemplo, un animal en repetidas ocasiones sujeto a acciones agresivas por un individuo dominante, mostrará casi inevitablemente un comportamiento fuertemente inhibido, con la tendencia a reducir la competencia por el alimento, compañeras reproductivas o espacios territoriales como principales características (Overli, *et al.* 2004; Maule, *et al.* 1991; Sloman, *et al.* 2002).

Asimismo, cuando un animal es amenazado inesperadamente por un predador, detendrá precipitadamente su alimentación e intentará escapar pero, incluso si se escapa no comenzará a comer de nuevo inmediatamente después de que el predador se haya ido (Bernier, *et al.* 2006; Berthoud, *et al.* 2002; Bernier, *et al.* 2001; Munkittrick, *et al.* 1991; Volkoff, *et al.* 2005)

En los peces la derrota social, induce cambios del comportamiento y elevación crónica de glucocorticoides en el plasma, así como alteraciones neuroquímicas en el cerebro de los poiquilotermos (Korzan, *et al.* 2002; Summers, *et al.* 2005). La hipótesis sería que este tipo de comportamiento agresivo hacia otros, es un reductor de estrés, que actúa copiando la estrategia sufrida después de una derrota, generalmente contra individuos de menor tamaño (Overli, *et al.* 2004; Summers, *et al.* 2005).

### **3.3. Indicadores de estrés**

#### **3.3.1. Indicadores neuroendocrinos (Adrenalina y cortisol)**

Los parámetros utilizados para identificar el estrés en los peces son los denominados de respuesta primaria. Indicadores neuroendocrinos como la adrenalina y el cortisol, que son inductores de cambios rápidos a nivel cardiovascular y metabólico. El cortisol está más relacionado con los estresantes crónicos, como parte final del eje HPI.

#### **3.3.2. Índices metabólicos de respuesta secundaria**

La adrenalina produce desequilibrio en los iones y en los niveles del agua produciendo hinchamiento de las células sanguíneas (Nikinmaa, *et al.* 1981; Nikinmaa, *et al.* 1982), modificando el número, tamaño de las células y con ello el valor hematocrito, demandando más oxígeno, especialmente en el estrés agudo, durante el cual se observan cambios significativos en los valores hematológicos o en el número de glóbulos rojos. Mientras el cortisol actúa en el tejido branquial modificando el flujo de los iones a través del agua.

Otros indicadores de estrés utilizados son los índices metabólicos de respuesta secundaria a estrés midiendo los niveles de glucosa, de lactato y los iones del plasma (Rotllant, *et al.* 1997; Rotllant, *et al.* 2000a; Sunyer, *et al.* 1995). Como resultado se produce una mayor movilización energética y metabólica (Rotllant, *et al.* 1997; Rotllant, *et al.* 2000a; Tort, *et al.* 2005). Los parámetros hematológicos y metabólicos son herramientas para medir la fase de resistencia ya que responden a la acción del cortisol y las CA (Rotllant, *et al.* 1997; Sunyer, *et al.* 1995; Tort, *et al.* 2005; Tort, *et al.* 1996). Estos indicadores fisiológicos generales se miden en la sangre y en el plasma. El lactato y la glucosa en el plasma son útiles indicadores metabólicos y energéticos del estrés (Tort, *et al.* 1994; Tort, *et al.* 1991; Tort, *et al.* 1990). El estrés aumenta los niveles de glucosa liberando las reservas de glúcidos en corto tiempo. A largo plazo, el estrés puede contribuir al incremento de los niveles de glucosa y a la disminución de las reservas de glucógeno, rompiéndose entonces la glucosa y liberándola en la sangre. El lactato también incrementa sus niveles. En situaciones agudas, se produce una demanda de energía y la vía

anaerobia que produce el lactato es rápidamente disponible. Sin embargo, los estresantes crónicos y los de poca intensidad no inducen cambios en el lactato. La osmolalidad en el plasma y el balance en los niveles de iones, son indicadores plasmáticos también modificados por las CA y el cortisol (Rotllant, *et al.* 2000a; Tort, *et al.* 1994; Tort, *et al.* 1991; Tort, *et al.* 1990).

En la Figura 4 se muestra la activación de la respuesta secundaria como resultado de la activación de la respuesta primaria.

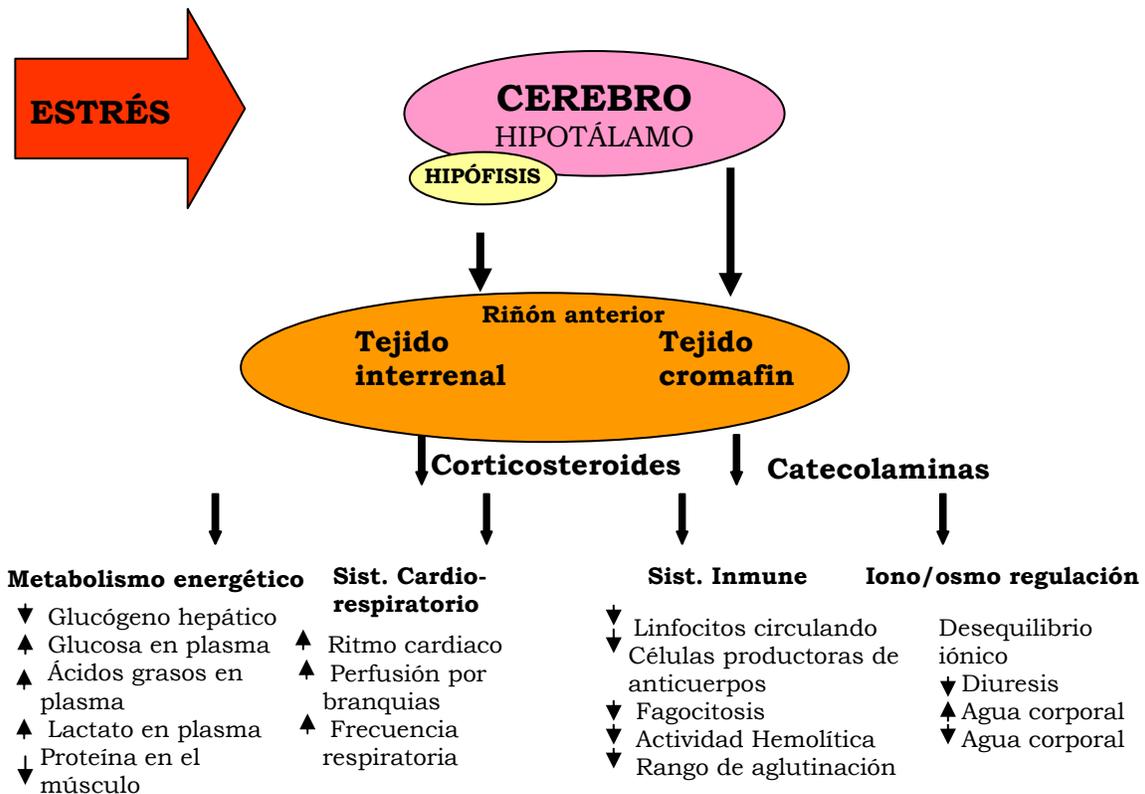


Figura 4.- Respuesta secundaria al estrés, donde se observa como afecta la actividad y fisiología del sistema neuroendocrino, cardio-respiratorio e inmune y el metabolismo y la regulación corporal, razón para ser utilizados como indicadores (Tort, *et al.* 1998).

### **3.3.3. Sistema inmunitario, estrés y respuesta inmunitaria**

La función esencial del sistema inmune en todos los vertebrados es la defensa contra las infecciones. Este sistema permite la supervivencia del individuo y el mantenimiento de sus funciones corporales en un medio por naturaleza hostil. Los mecanismos de defensa presentan diferencias significativas a lo largo de la escala filogenética, tendiendo hacia una mayor complejidad y potencia de las respuestas de defensa y un reconocimiento específico de los patógenos, pero manteniendo los sistemas de defensa presentes en especies menos evolucionadas.

El primer mecanismo de defensa y el más efectivo, es impedir la entrada de los patógenos gracias al desarrollo de barreras físicas y/o químicas. Este tipo de barreras se encuentran en todos los seres vivos, con características peculiares dependiendo de qué organismo se trate. Junto a estas barreras, los animales, tanto invertebrados como vertebrados, presentan un segundo nivel de complejidad, presentando ya un sistema inmunitario. En el caso de los invertebrados, éstos poseen únicamente un Sistema Inmune Innato, donde participan componentes celulares (células con capacidad fagocítica), y componentes solubles o humorales (Janeway, *et al.* 2005).

Únicamente los animales vertebrados tienen un tercer nivel de complejidad, el denominado Sistema Inmune Adaptativo o Adquirido, gracias a que poseen linfocitos T, B y anticuerpos. Entre sus características fundamentales, que les diferencian de los animales invertebrados, están la capacidad para reconocer de forma específica un antígeno (debido a la gran diversidad de receptores distintos en la superficie de los linfocitos T y B), la posibilidad de recordar exposiciones previas a un antígeno (memoria), y la de responder de forma más eficaz después de ponerse de nuevo en contacto con ese mismo antígeno (maduración de la respuesta inmune) (Abbas, *et al.* 2007).

La mayoría de órganos inmunitarios de los mamíferos tienen sus homólogos en los peces. Sin embargo, su eventual menor complejidad estructural podría limitar su capacidad para generar una respuesta inmunitaria completa y funcional frente a la invasión de patógenos. Algunos investigadores discuten sobre la capacidad de los peces para generar respuestas inmunitarias exitosas; teniendo en cuenta la robustez aparente de la respuesta innata de los peces, en comparación con la observada en vertebrados superiores (Harris, *et al.* 2000; Ellis, *et al.* 2001; Tort, *et al.* 2003).

## **4. COMPONENTES NUTRICIONALES EN ACUICULTURA**

### **4.1 Introducción**

Los recursos pesqueros o acuícolas muestran cada vez mayor relevancia económica en todo el mundo debido al crecimiento de su demanda y a la creciente calidad del producto comercial. Conocer constantemente el estado de la población cultivada es fundamental, ya que frecuentemente cuando se detecta un problema es tarde para salvar la población. La correcta adaptación del animal a

las condiciones de cultivo es fundamental en la piscicultura. Cuanto mejor sea esta adaptación, tanto mejor será el mantenimiento en cautividad, el crecimiento y la reproducción de la especie. Los peces de piscifactorías están sujetos a múltiples situaciones de manejo, transporte y confinamiento que es responsable de la aparición del estrés (Davis, *et al.* 2002). Se han realizado extensos estudios sobre la respuesta de los peces a estresantes típicos en prácticas acuícolas (Arends, *et al.* 1999; Barton, *et al.* 2005; Tort, *et al.* 1996b). Las condiciones de cultivo deben intentar evitar o minimizar las situaciones de estrés en los procesos de producción (Weyts, *et al.* 1999; Van Weerd, *et al.* 1998).

Otro factor fundamental para una explotación piscícola, puesto que resulta determinante del estado fisiológico de los animales, tanto de manera directa por su influencia sobre el estado energético, como de manera indirecta por su influencia sobre la resistencia al estrés, es la dieta y el estado nutricional. La ración adecuada de alimentación se ha demostrado que afecta al crecimiento, la eficacia de la alimentación, el estado inmunológico y la fisiología de peces como la dorada *Sparus aurata* (Canario, *et al.* 1998). Los sistemas de alimentación empleados en las piscifactorías pueden aumentar la competición por la alimentación (Thorpe, *et al.* 1995; Cutts, *et al.* 1998) limitando la ración (Jobling, *et al.* 1999), reduciendo el índice de la alimentación, aumentando la jerarquización (Overli, *et al.* 1999), con un crecimiento de los peces dominantes a expensas de los subordinados, aumentando los daños en las aletas y generando interacciones agresivas. Existen evidencias de que algunas dietas mejoran la resistencia de algunos animales a esas condiciones. Tales dietas son enriquecidas con vitaminas como la C y E, inositol, ácidos grasos insaturados y fosfolípidos (Tort, *et al.* 2005; Montero, *et al.* 1998; Ortuño, *et al.* 1999; Ortuño, *et al.* 2001; Montero, *et al.* 1999).

En consecuencia, se hacen necesarios estudios para conocer el verdadero alcance fisiológico de estas substituciones en la alimentación de los peces afectando lo menos posible su salud y, por lo tanto, su rendimiento comercial.

#### **4.1.2. Componentes y efectos de las dietas**

Los requerimientos nutricionales de los peces al igual que la de otros vertebrados permiten un adecuado desarrollo de las especies. Se tiene alguna constancia de cómo afectan a la salud de peces en cultivo. En concreto, la calidad y cantidad de los macronutrientes, algunas vitaminas y minerales esenciales (Wedemeyer, *et al.* 1973). Las dietas para las especies de nuestro estudio de manera general constan aproximadamente del 20-30% de lípidos, el 10% de carbohidratos y el 50% de proteínas además de vitaminas y minerales. Desafortunadamente otros factores nutricionales minoritarios han recibido poca o ninguna atención (Blazer, *et al.* 1992).

##### **4.1.2.1. Ácidos grasos**

Los Ácidos Grasos Esenciales (EFAs) son indispensables tanto para la vida vegetal como para la animal y en el caso de los animales no los pueden sintetizar, por ello deben ser administrados por la alimentación. Existen 3 series principales

de los Ácidos Grasos Poli-insaturados (PUFAs) (de 18 o más átomos de carbono) ( $\omega$ -3,  $\omega$ -6,  $\omega$ -9) de las cuales las series  $\omega$ 3,  $\omega$ 6 son fundamentales para los animales, actuando como primer sustrato de una cadena metabólica y se denominan por esto, elementos guías. Sólo el mundo vegetal posee las enzimas de desaturación necesarias para obtener los EFAs guía de las series metabólicas del reino animal, a partir de un FA saturado de 18 átomos de carbono (ácido esteárico), el elemento guía de la serie  $\omega$ -9 seguido del elemento guía de la serie  $\omega$ -6 y por último el elemento  $\omega$ -3. De este modo la serie  $\omega$ 3 posee un grado de insaturación superior en comparación con la serie  $\omega$ -6, que a su vez posee un grado superior en relación con la serie  $\omega$ -9. En la inmensa mayoría de los casos, las plantas no pueden transformar los EFAs guías. Por lo tanto los aceites vegetales no pueden suministrar los metabolitos de estos FAs. Las plantas terrestres son especialmente ricas en ácido linoleico (18:2  $\omega$ -6) (LA), pero con menor contenido en ácido linolénico (ALA). Por el contrario la síntesis de ácido linolénico (18:3  $\omega$ -3) (ALA) participa principalmente en el metabolismo de las plantas marinas. Los animales carecen de las desaturasas necesarias para la formación de LA y ALA a partir de 18:  $\omega$ -9. Cada uno de estos tres elementos se convierte así en la cabeza de una serie de FAs, dentro de la cual caben interconversiones pero no siendo posibles los pasos cruzados o interseries. Además, la capacidad de elongar y desaturar el linolénico (18:3  $\omega$ -3) hasta los ácidos eicosapentaenoico (EPA) (20:5  $\omega$ -3) y docosahexaenoico (DHA) (22:6  $\omega$ -3), o de pasar el primero de estos últimos al segundo, son variables según la especie o grupo. Los peces de agua dulce no están limitados en este aspecto, presentando suficiente actividad de elongasas y desaturasas para bio-convertir los ácidos linoleico y linolénico en ácido araquidónico (20: 4  $\omega$ -6) (AA) y EPA + DHA respectivamente (Sargent, *et al.* 2002), mientras que los peces marinos estudiados parecen tener una limitación absoluta. Por lo tanto, a partir de los ácidos grasos iniciales, en especial linoleico y linolénico que son esenciales en los animales, y por medio de elongaciones y desaturaciones se obtienen los HUFAs EPA, AA, DHA, siendo estos últimos de obligatoria inclusión en las dietas de peces marinos. En la Figura 5 se muestra un esquema de las secuencias del metabolismo de los PUFAs.

## SECUENCIAS DEL METABOLISMO DE LOS PUFAS

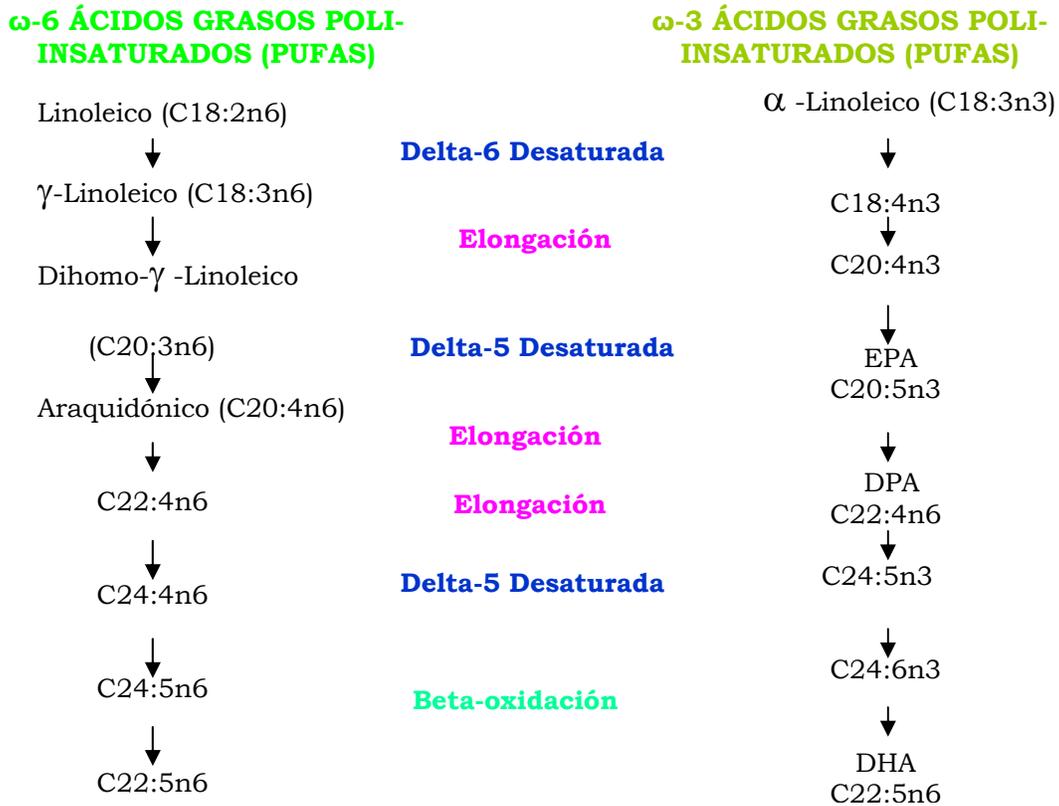


Figura 5. Origen y secuencias del metabolismo de los ácidos grasos poli-insaturados (PUFAs).

Las cadenas metabólicas de los ω-3 y ω-6 dan origen a los mediadores inflamatorios y antiinflamatorios denominados eicosanoides, que son productos derivados de los FAs (Ganga, *et al.* 2005). Poseen 20 átomos de carbono e incluyen: las prostaglandinas (PGs), los tromboxanos (TXs), los leucotrienos (LTs), los hidroxiácidos y lipoxinas (LXs) (Janeway, *et al.* 2005). Las PGs y los TXs son generados por la acción de las enzimas ciclooxigenasas (COX) y los LTs, los hidroxiácidos y las LXs por la lipooxigenasas (LOX) (Botana, *et al.* 2002). Los eicosanoides producen una amplia serie de efectos biológicos sobre la respuesta inflamatoria en las articulaciones, la piel y los ojos, también sobre la intensidad y duración del dolor, de la fiebre y sobre la función reproductora (Abbas, *et al.* 2007). Además, desempeñan un importante papel en la inhibición de la secreción de los ácidos del estómago, regulan la presión arterial por medio de vasodilatación o vaso constricción e inhiben o activan la agregación plaquetaria y la trombosis (Janeway, *et al.* 2005; Abbas, *et al.* 2007). En La Figura 6 se esquematizan las secuencias y efectos biológicos más estudiados de los eicosanoides derivados del ácido araquidónico.

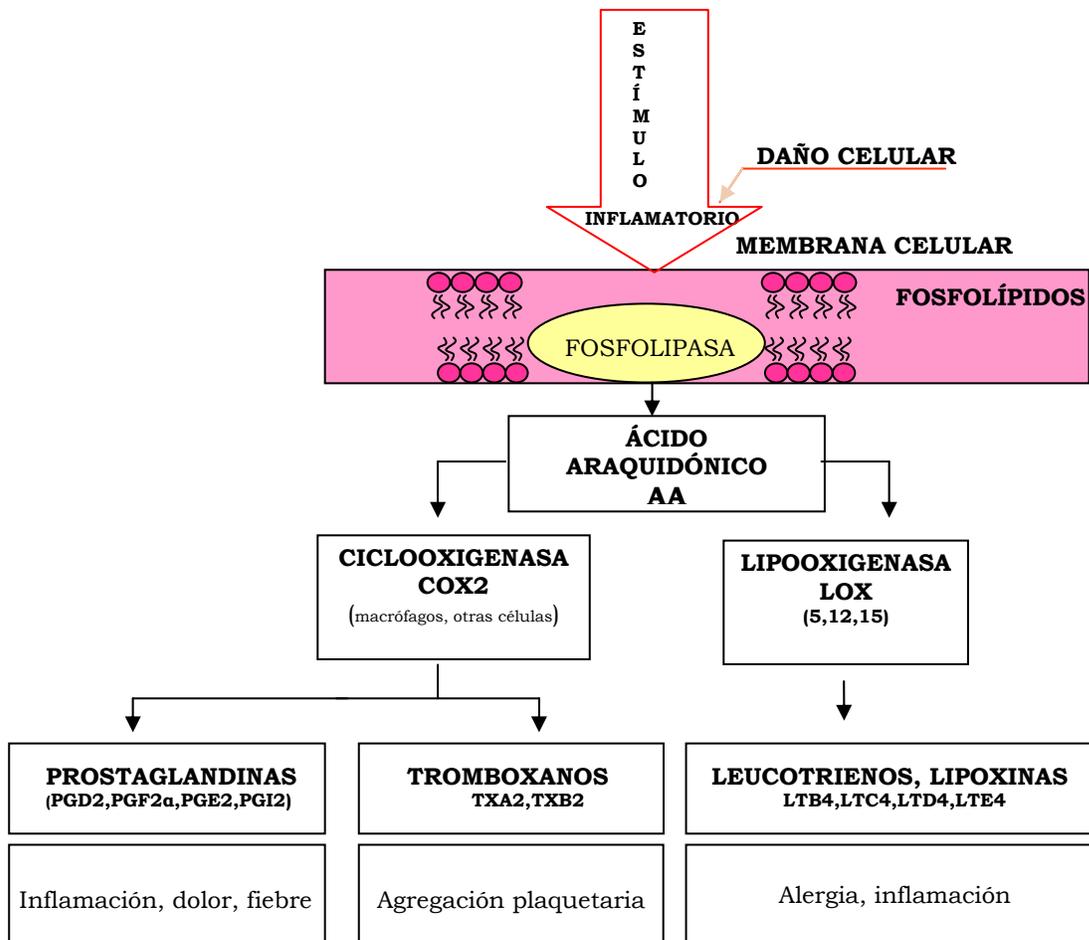


Figura 6. Síntesis y funciones agregante e inflamatoria de los eicosanoides derivados del ácido araquidónico. Todos los eicosanoides representados participan en la respuesta inflamatoria.

La composición de los ácidos grasos de los tejidos está determinada principalmente por la composición de los lípidos de la dieta (Sargent, *et al.* 2002). Los mecanismos bioquímicos para modificar los FAs implican las vías catabólicas y metabólicas de la desaturación, del elongamiento y de la esterificación de los FAs  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 y  $\omega$ -9 en varios tejidos. Los lípidos son la principal fuente de energía tomada por la ingesta alimentaria y de la utilización adecuada de esta energía, depende el crecimiento de los peces y la reducción de la materia orgánica indeseable y la pérdida de nitrógeno residual de las granjas al medio acuícola (Martins, *et al.* 2007).

El aceite de pescado (FO) ha sido tradicionalmente la fuente principal de lípidos en las dietas comerciales de los peces, pero constituyen un recurso natural limitado debido a la sobre pesca y a problemas climáticos. Es un producto

altamente apreciado para otras aplicaciones como los piensos para animales terrestres y la farmacología. Además, el alto índice de crecimiento de la acuicultura para hacer frente en el futuro a un mayor aumento del consumo del pescado, contrasta con la disponibilidad de este aceite, cuya producción está estancada y se prevé a la baja (Caballero, *et al.* 2006). Por esta causa hay un interés creciente en la inclusión de los aceites vegetales en las dietas que sustituyan o reduzcan parcialmente la dependencia en los peces marinos de los aceites de pescados (Cheng, *et al.* 2002; Liu, *et al.* 2004).

En la búsqueda del aceite idóneo para remplazar el FO se han investigado diversas combinaciones de aceites vegetales (VO) tales como, aceites de maíz, de colza, de linaza, de soja, etc. A pesar de ello, no se han obtenido en algunos casos los resultados esperados. Por el contrario, están apareciendo algunos efectos indeseados en la salud relacionados con estas nuevas dietas provocando por ejemplo alteraciones del tiempo óptimo de alimentación. Los aceites vegetales en la dieta afectan el perfil de los ácidos grasos de los peces, un efecto que es más obvio en especies marinas debido a su limitada capacidad de convertir C18 en los PUFAs (Watanabe, *et al.* 1982). Estos cambios son particularmente importantes en el músculo donde la incorporación de 18:2  $\omega$ -6 en los peces alimentados con dietas ricas en aceite de soja, reduce considerablemente el cociente  $\omega$ -3/  $\omega$ -6 de los FAs de la dieta. Manteniendo altos niveles de  $\omega$ -3 PUFAs y bajos niveles de  $\omega$ -6 PUFAs en los peces cultivados, se proporcionan elevados y adecuados valores nutricionales adecuados para la alimentación humana (Martins, *et al.* 2007).

Los PUFAs son esenciales para el mantenimiento de la estructura, la fluidez y las funciones de las membranas celulares. La deficiencia de los EFAs, suprime la función celular inmune en los humanos (Calder, *et al.* 1995) y en los peces (Tort, *et al.* 1996a; Montero, *et al.* 1998). Sin embargo, la ingesta de altos niveles en la dieta de  $\omega$ -3 PUFAs reduce también la respuesta inmune en los humanos (Payan, *et al.* 1986; Virella, *et al.* 1989; Soyland, *et al.* 1994), en las ratas (Lim, *et al.* 1996; Jolly, *et al.* 1997) y en los peces (Kiron, *et al.* 1995), dependiendo de diversos factores ambientales y la interacción con otros nutrientes, como las vitaminas antioxidantes. La reducción en la respuesta inmune en la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* puede ser debida a la deficiencia de los EFAs en su dieta (Kiron, *et al.* 1995), dependiendo de diversos factores ambientales y la interacción con otros nutrientes, como las vitaminas antioxidantes. Una probable explicación a estos cambios en la respuesta inmune es que la función inmunológica puede verse alterada por el cambio en la composición de los FAs en las membranas celulares (Montero, *et al.* 2003; Lin, *et al.* 2007).

La sustitución del aceite de pescado por aceites vegetales en dietas para peces depende, por tanto, de que los requerimientos de ácidos grasos esenciales queden cubiertos para la especie que se estudie, sea de agua dulce o marina. Se han conseguido sustituciones parciales de aceite de pescado por aceites vegetales en peces marinos, como por ejemplo en el mero *Epinephelus malabaricus*, donde el 50% del FO se reemplazó con aceite de maíz sin afectar el crecimiento (Lin, *et al.* 2007). Otros VO como aceite de la soja (SO) y de linaza (LO), se consideran buenas fuentes alternativas de lípidos para los salmónidos y los peces de agua dulce (Bell, *et al.* 2001; Rosenlund, *et al.* 2001; Caballero, *et al.* 2002). Sin embargo, los aceites vegetales no pueden ser utilizados como única fuente de

lípidos en peces marinos, ya que se requieren los ácidos araquidónico (AA), eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), esenciales para los peces marinos que se encuentran en altas concentraciones en el FO (Sargent, *et al.* 2002).

El aceite de pescado se puede sustituir totalmente en los peces de agua dulce y parcialmente en los peces marinos (Izquierdo, *et al.* 2005; Montero, *et al.* 2005; Mourente, *et al.* 2005; Mourente, *et al.* 2007), siempre que se cubran los requerimientos de HUFAs para estas especies. La sustitución adecuada del FO reduciría la dependencia absoluta de este ingrediente y de sus costes asociados. Sin embargo, mientras que varias especies de peces parecen crecer adecuadamente con parte del aceite sustituido por los VO (Bell, *et al.* 2003; Regost, *et al.* 2003a; Izquierdo, *et al.* 2003). Estudios recientes muestran variaciones histológicas en diversos tejidos tales como hígado (Caballero, *et al.* 2004) e intestino (Caballero, *et al.* 2002; Olsen, *et al.* 1999; Caballero, *et al.* 2003). Para dorada alimentada con aceite de colza, se observan grandes acumulaciones de lípidos en los enterocitos y cuando son alimentados con SO muestran modificaciones en el tamaño y el tipo de lipoproteínas intestinales (Caballero, *et al.* 2003). Numerosos estudios revelan los efectos sobre el sistema inmune en los animales cuyas fuentes lipídicas son vegetales. Además, muestran bajas tasas de supervivencia a las infecciones producida por *Edwardsiella ictaluri*. También, una menor capacidad de producir anticuerpos después de alimentar al gato de río *Ictalurus punctatus* con una dieta con aceite de linaza del 7% (Fracalossi, *et al.* 1994). La deficiencia de  $\omega$ -3 HUFA en las dietas de la trucha reduce también la resistencia de los animales al virus de IHN (Kiron, *et al.* 1995) y recientemente, se confirma que la alimentación a largo plazo de la dorada con SO al 60% puede conducir a la inmunosupresión, mientras que el LO podría alterar la respuesta al estrés (Montero, *et al.* 2003).

Sin embargo, la alimentación con los VO disminuye el contenido en el músculo de EPA, de DHA y de AA. Aumentan los depósitos hepáticos de los lípidos en el sargo picudo (Hernández, *et al.* 2005; Piedecausa, *et al.* 2007). Efectos similares se describen en otras especies (Castell, *et al.* 1994; Takeuchi, *et al.* 1991; Lemaire, *et al.* 1991b), en los salmones atlánticos *Salmo salar* (Bell, *et al.* 2001; Bell, *et al.* 2003), la trucha común *Salmo trutta* (Caballero, *et al.* 2002), el gato de río africano *Clarias gariepinus* (Ng, *et al.* 2003), el rodaballo *Psetta maxima* (Regost, *et al.* 2003b), la lubina *Dicentrarchus labrax* (Montero, *et al.* 2005; Mourente, *et al.* 2005) y la dorada *Sparus aurata* (Izquierdo, *et al.* 2005).

Los peces alimentados con el SO muestran asimismo, un índice hepatosomático (HSI) perceptiblemente más alto que los alimentados con FO o LO y se debe probablemente a un mayor almacenamiento de los lípidos (Caballero, *et al.* 2003). Anteriores estudios no muestran diferencias significativas del HSI en otras especies de peces alimentados con LO, como los salmones atlánticos (Rosenlund, *et al.* 2001; Menoyo, *et al.* 2004; Tocher, *et al.* 2003; Bendiksen, *et al.* 2003; Ng, *et al.* 2004a), rodaballo (Regost, *et al.* 2003a), y lubina (Mourente, *et al.* 2005; Tocher, *et al.* 2003). Los hígados de los peces con dietas ricas en SO presentan síntomas de esteatosis hepática. Es decir, que los hepatocitos tienen alto contenido en grasa y migraciones nucleares cuando se comparan con los alimentados con las otras dietas (Caballero, *et al.* 2004).

Estas alteraciones histológicas en el hígado de la dorada *Sparus aurata* se observan después de reemplazar el 60% del aceite de la dieta con SO o aceite de colza, pero no se observan cuando se utiliza LO o con una mezcla del VO de niveles similares. El LO no altera la morfología hepática, su elevada proporción de 18:3  $\omega$ -3 promueve la oxidación del lípido hepático. Disminuye los HSI a valores similares a los de los peces alimentados con dietas que contenían FO. El alto porcentaje de 18:2  $\omega$ -6 en el SO promueve la acumulación de lípidos. Las alteraciones en los mecanismos fisiológicos implicados en los diversos procesos de la digestión y de absorción de los lípidos podrían ser los responsables de las características morfológicas del intestino. Una de las características principales del desequilibrio de los FAs  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 es el depósito progresivo de lípidos en el hígado (Ogino, *et al.* 1979). Los impactos fisiológicos de las fuentes vegetales parecen ser diferentes en el salmón Atlántico y el bacalao atlántico *Gadus morhua* (Mundheim, *et al.* 2004; Albrektsen, *et al.* 2006).

Existen diversos problemas derivados de la utilización de VO tales como, la regurgitación del aceite. En trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* un problema causado por la fluctuación de la salinidad en las granjas de cultivo marino, manifestándose como gotas de aceite que flotan en el contenido estomacal. La separación y la acumulación del aceite libre en el estómago y la digestibilidad limitada de los lípidos, pueden producir también estrés osmoregulatorio. En la trucha se puede asociar al síndrome de distensión abdominal que puede agravarse durante la digestión, o también producirse en respuesta a otros estresantes ambientales, como las fluctuaciones de la temperatura. (Staurnes, *et al.* 1990; Baeverfjord, *et al.* 2006). Son característicos de esta patología, el aumento del estómago (hasta 6 veces más material de lo normal, principalmente agua y aceite acumulado), la reducción del grosor de la pared abdominal y el estrés osmoregulatorio subletal. En la trucha se observa un incremento en las concentraciones del plasma de los TAGs, del colesterol, y de la glucosa, limitando el almacenamiento de la bilis, y acumulando lípidos en el hígado y la mucosa intestinal. Se observa una acumulación similar de lípidos en los enterocitos de la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Caballero, *et al.* 2002; Olsen, *et al.* 2003), y la trucha alpina *Salvelinus alpinus* (Olsen, *et al.* 1999; Olsen, *et al.* 2000); sufren alteraciones en la transferencia de los lípidos a través de la mucosa por una fuente dietética escasa en fosfolípidos (Baeverfjord, *et al.* 2006). En la trucha de arco iris cultivada, se reduce el problema de la regurgitación de aceite suplementando las dietas con el óxido del trimetilamina (TMAO) para estimular la síntesis en la bilis.

Existen otras fuentes de VO como el aceite crudo de palma (CPO), a partir del cual se pueden producir diversos compuestos mediante procesos de refinado como el Ácido Graso Destilado de Palma (PFAD) cuyo contenido es principalmente FAs libres (FFA). Una característica interesante es que la vitamina E tiende a concentrarse en las fracciones de PFAD durante los procesos de refinamiento. El aceite de palma substituye con éxito una parte significativa de FO en las dietas para varias especies de peces incluyendo el salmón Atlántico (Rosenlund, *et al.* 2001; Bell, *et al.* 2002; Olsen, *et al.* 2003; Torstensen, *et al.* 2000; Ng, *et al.* 2004b), trucha arco iris (Fonseca-Madrigal, *et al.* 2005) y algunos peces de agua templada como el gato de río *Ictalurus punctatus* (Legendre, *et al.* 1995).

La digestibilidad de los lípidos en la dieta de los peces en algunas especies es generalmente alta. Sin embargo, hay ciertas diferencias en digestibilidad entre los FAs, que dependen generalmente de la longitud de la cadena y de la temperatura del agua (Hoffman, *et al.* 1976) y aumentan con la insaturación de los mismos (Olsen, *et al.* 1999; Ng, *et al.* 2004a; Torstensen, *et al.* 2000). El alto contenido de los FAs saturados (cerca de 50%), de las fuentes de aceite de palma puede ser un factor que afecte significativamente la digestibilidad de los FAs y su consecuente disponibilidad como fuente de energía en las dietas de la tilapia *Oreochromis sp.* Se han llevado a cabo con éxito ensayos a corto plazo alimentando la tilapia con dietas de CPO semipurificado (Ng, *et al.* 2002), pero los efectos de estas dietas a largo plazo en la calidad, en el crecimiento y en el filete de tilapia actualmente no se conocen (Bahurmiz, *et al.* 2007).

Estudios anteriores en la trucha común *Salmo trutta* muestran la reducción de la digestibilidad de los SFAs en parte por el aumento de la resistencia de los TAGs a la digestión con un incremento también de los CPO contenidos en la dieta (Ng, *et al.* 2003). Una de las ventajas de la utilización de estos subproductos como el PFAD es su menor costo económico (15%) comparado con el CPO (Bahurmiz, *et al.* 2007); otra ventaja del uso de PFAD en la alimentación acuícola es el alto contenido de vitamina E, que se deposita fácilmente en los tejidos de los peces mejorando la estabilidad oxidativa (Ng, *et al.* 2003; Ng, *et al.* 2004b; Ng, *et al.* 2002).

El alto nivel de grasas saturadas en las dietas provoca que se formen emulsiones o micelas que pueden afectar la digestibilidad de los otros FAs (Menoyo, *et al.* 2003). Algunos estudios en trucha arco iris alimentadas con altos niveles de CPO y a baja temperatura del agua, muestran una disminución en la digestibilidad y se encuentran altas concentraciones de TAGs en las heces contribuyendo a disminuir la digestibilidad de los FAs especialmente de los saturados (Ng, *et al.* 2003). La solubilización micelar luminal es necesaria para que los enterocitos absorban los FAs. A pesar que los PUFAs sean bien solubilizados, esta solubilización en los SFAs disminuye con la longitud de la cadena y la disminución de la temperatura del agua (Bahurmiz, *et al.* 2007). La capacidad de oxidar los lípidos se incrementa cuando aumenta la temperatura, aunque la capacidad aeróbica permanece sin cambios o disminuye (Guderley, *et al.* 2004; Thibault, *et al.* 1997).

La  $\beta$ -oxidación tiene como principal función acortar las largas cadenas de FAs (> de 20 carbonos) y de otros carboxilos lipofílicos, como los eicosanoides, las cadenas laterales de los intermediarios en las bilis y xenobióticos (Van Veldhoven, *et al.* 1999). La  $\beta$ -oxidación peroximal hepática contribuye significativamente (hasta un 20%) a la  $\beta$ -oxidación total en el salmón Atlántico *Salmo salar* (Stubhaug, *et al.* 2007). En agua salada, la capacidad de la  $\beta$ -oxidación en el músculo rojo y el hígado es estable a temperaturas elevadas (18°C), aunque la capacidad de  $\beta$ -oxidación se reduce con la disminución de la temperatura a 6°C. En el salmón Atlántico alimentado con dietas ricas en aceite de colza, como sustituto del FO, no se ven diferencias en el músculo y el hígado cuando baja la temperatura a 4°C (Stubhaug, *et al.* 2005a). Otros estudios concluyen que el metabolismo de los lípidos está más influenciado por las estaciones que por el

crecimiento y la temperatura (Kiessling, *et al.* 1993; Kiessling, *et al.* 1991; Kiessling, *et al.* 2001; Nordgarden, *et al.* 2003). Otra explicación para la desaceleración de la  $\beta$ -oxidación en agua marina podría ser que los peces almacenan más lípidos de los necesarios para la producción de la energía y parece ser que el contenido de los lípidos incrementa en el cuerpo en la transición a agua marina (Stubhaug, *et al.* 2006). La capacidad de la  $\beta$ -oxidación del músculo rojo, blanco y el hígado se ve afectada en mayor grado por los cambios en la demanda energética debido a las distintas etapas de la vida, y menos por temperatura, el rango de la tasa del crecimiento y los FAs dietéticos, tales como MUFAs, EPA y DHA (Stubhaug, *et al.* 2007).

Las lipoproteínas son los mayores transportadores de lípidos a través del sistema circulatorio en los vertebrados (Chapman, *et al.* 1980). La distribución y caracterización de las lipoproteínas en los peces teleósteos como la trucha arco iris (Babin, *et al.* 1989), la lubina (Santulli, *et al.* 1996) o el besugo *Pagellus bogaraveo* (Iijima, *et al.* 1995) muestran que la distribución de sus lípidos y de sus apoproteínas generalmente se parece a la observada en mamíferos. Las lipoproteínas de los peces se clasifican de manera similar que las de los mamíferos, como las de muy baja densidad de lipoproteínas (VLDL), lipoproteínas intermedias (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las de alta densidad (HDL) (Chapman, *et al.* 1980; Babin, *et al.* 1989; Iijima, *et al.* 1995).

Las HDLs son las lipoproteínas dominantes y se reflejan en los altos niveles de fosfolípidos circulantes y en el suero de varias especies de peces teleósteos (Ando, *et al.* 1993). Las HDLs son las lipoproteínas dominantes en la dorada y está implicada principalmente en el transporte de DHA a los tejidos (Brodtkorb, *et al.* 1997) que está compuesta por un alto contenido de proteínas y fosfolípidos particularmente fosfatidilcolina (PC) (Goldstein, *et al.* 1997; Lie, *et al.* 1993). Las LDLs están también involucradas en el transporte de los lípidos principalmente del colesterol en la dorada (Caballero, *et al.* 2006) y también en otras especies (Torstensen, *et al.* 2000; Farrell, *et al.* 1983; Farrell, *et al.* 1986; Lie, *et al.* 1986).

El hígado juega un papel importante en el metabolismo de los lípidos (Haug, *et al.* 1988). Así, por ejemplo, los gadiformes acumulan una alta cantidad de lípidos en el hígado (50%). Sin embargo su tejido muscular tiene poca capacidad de almacenamiento de lípidos (Dossantos, *et al.* 1993; Nanton, *et al.* 2001); probablemente sea por la baja concentración en el plasma de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Nanton, *et al.* 2001). En el róbalo *Melanogrammus aeglefinus* se ha reportado poca concentración de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en el plasma (Nanton, *et al.* 2001). Además, la concentración de VLDL en el plasma diversas especies marinas se han relacionado positivamente con los niveles de lípidos en el músculo (Ando *et al.* 1993). Es más, se cree que las VLDL son importantes vehículos transportadores de lípidos desde el hígado a los músculos en los peces (Sheridan, *et al.* 1988).

Los lípidos exógenos absorbidos por el intestino están integrados predominantemente en los quilomicrones y las VLDL (Caballero, *et al.* 2003; Sire, *et al.* 1981). Mientras los lípidos endógenos son transportados en las VLDL, LDL y HDL (Babin *et al.* 1989; Iijima, *et al.* 1995; Sheridan, *et al.* 1988). Las proteínas y los lípidos integrados a diferentes lipoproteínas interactúan con las enzimas o los

receptores celulares, produciéndose la degradación de las lipoproteínas o la transformación.

Los lípidos de los VOs afectan la biosíntesis de los TAGs y los fosfolípidos interfiriendo con los tipos de lipoproteínas producidas por el intestino de la dorada. La predominancia de las HDL pueden ser consecuencia de la baja degradación de estas fracciones comparado con otras lipoproteínas de una degradación más rápida que las VLDL por la lipoproteína lipasa o por un incremento de su síntesis en el hígado y el intestino (Iijima, *et al.* 1995; Leger, *et al.* 1990). Aunque se encontraron altos niveles de colesterol en la fracción LDL en la dorada *Sparus aurata*

Inicialmente los quilomicrones y los VDL-TAG son hidrolizados por la enzima lipoproteína lipasa liberando los FAs que son absorbidos por el tejido adiposo para el almacenamiento o para su oxidación en otros órganos como los músculos (Auwerx, *et al.* 1992). La salida de las partículas de las LDLs son principalmente mediadas por receptores extrahepáticos LDL específicos (Goldstein, *et al.* 1997). La lecitina acetiltransferasa (LCAT) es una enzima clave en este proceso: es responsable de la transferencia del colesterol y los FAs de la fosfatidilcolina a los ésteres del colesterol en la superficie de las HDLs. Esta enzima se observa en el plasma de los peces teleosteos (Dannevig, *et al.* 1979; Black, *et al.* 1987).

Ante la ausencia de estudios en los peces, existen datos disponibles sobre los efectos de los  $\omega$ -3 PUFAs con 18 o más átomos carbono y dos o más dobles enlaces, en los niveles del colesterol en el plasma de mamíferos y basándose en algunos estudios llevados a cabo en ratas y conejos, se concluye que existen suficientes evidencias de la respuesta lipémica postprandial a las comidas que contienen predominantemente SFAs, PUFAs  $\omega$ -6 y  $\omega$ -3 con niveles de respuesta de los TAGs en el orden  $\omega$ -3 PUFAs <  $\omega$ -6 PUFAs < MUFAs = SFAs (Williams, *et al.* 1998). En los humanos, el efecto hipocolesterolémico de los FAs sigue también este patrón. En los mamíferos con las dietas con  $\omega$ -3 HUFAs podría mejorarse la actividad de la enzima LCAT localizada en las HDLs (Thornburg, *et al.* 1995; Parks, *et al.* 2000). Tripodi en 1991 observa que la alta afinidad de las fracciones de las LDLs hacia los receptores del hígado inducen la hipocolesterolemia en las ratas alimentadas con esos FAs (Tripodi, *et al.* 1991). En la Figura 7 se muestran los efectos biológicos de los PUFAs en los mamíferos.

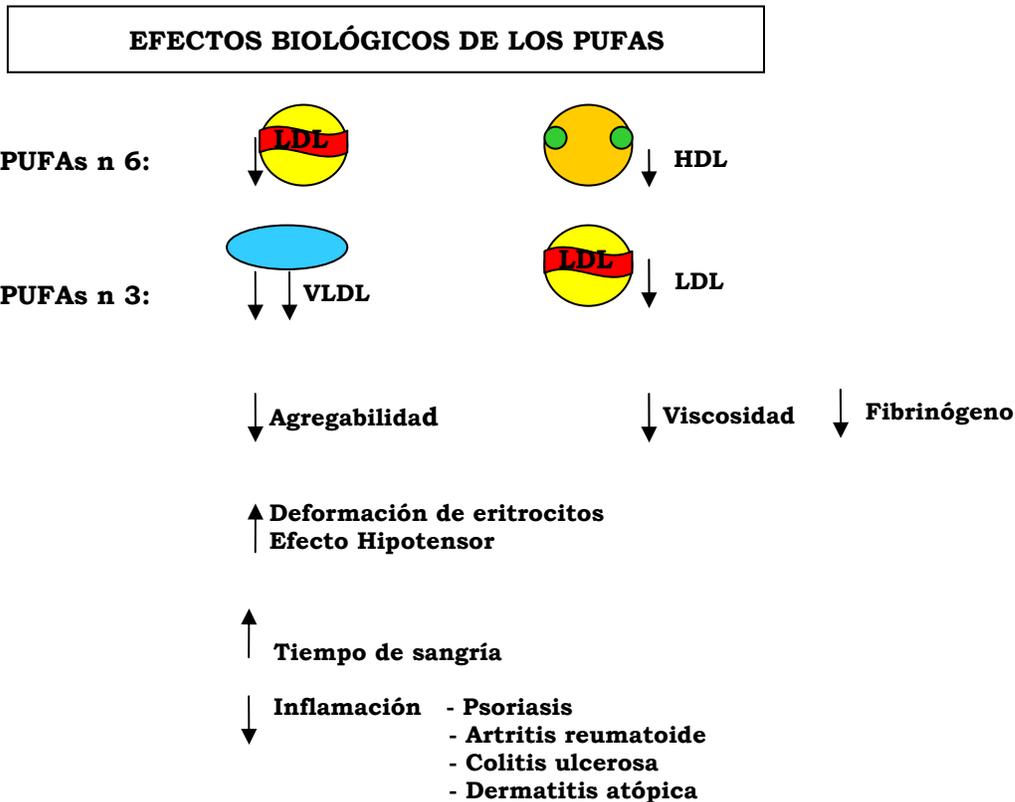


Figura 7. Efectos biológicos de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en mamíferos: HDL: lipoproteínas de alta densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

Los receptores de las LDL son proteínas localizadas dentro de las membranas de la célula, su función se ve afectada por la composición de los FAs de la membrana. Los cambios en la composición de los lípidos de la membrana pueden inducir alteraciones estructurales y funcionales en los receptores específicos (Gurr, *et al.* 1992). El contenido de TAGs de todas las fracciones de la lipoproteína están también reducidos en la dieta con FO. En humanos, un alto contenido dietético de  $\omega$ -3 PUFA reduce los niveles de las VLDL-TAG por la disminución de la síntesis de los TAGs en el hígado (Harris, *et al.* 1983; Berge, *et al.* 1999). La composición de los ácidos grasos de las VLDL están más fácilmente afectadas por la dieta que por las HDL. Esto podría corresponderse con el contenido más alto de TAGs de la lipoproteína, en los peces (Brodtkorb, *et al.* 1997; Olsen, *et al.* 1997). Además, la composición de FAs específica de las lipoproteínas podría estar relacionada con las diferentes funciones, el metabolismo y la síntesis de las lipoproteínas. Finalmente, las HDLs se caracterizan por los altos niveles de 22:6  $\omega$ -3, independiente de los FAs de la dieta. (Torstensen, *et al.* 2000; Lie, *et al.* 1986; Lie, *et al.* 1993). Los lípidos transportados como VLDL se almacenan principalmente en el hígado y se catabolizan en el músculo (Nanton, *et al.* 2003).

La substitución en la dieta del FO hasta 60% por el aceite de la soja (SO), de linaza (LO) o de colza (RO) no muestra efectos en la composición de las

lipoproteínas, mientras que una sustitución del 80% de SO o LO aumenta el colesterol en el plasma y las concentraciones de TAGs debido al bajo contenido de los  $\omega$ -3 HUFAs en estas dietas (Caballero, *et al.* 2006). Las HDL pueden intercambiar los fosfolípidos con las membranas celulares, lo que puede servir como un importante mecanismo de rotación que renueva los fosfolípidos de estas membranas (Illingwo, *et al.* 1973; Eisenberg, *et al.* 1984). Las células epiteliales del intestino distal de los peces teleósteos durante las etapas del desarrollo poseen gran capacidad endocitosis considerada una importante función inmunológica.

Recientes estudios demostraron que las dietas experimentales con aceite de soja (SO) disminuyen el colesterol observándose un efecto hipocolesterolémico en el plasma de los juveniles de pargo de cabeza negra, *Acanthopagrus schlegeli* (Peng, *et al.* 2008). Resultados similares se han reportado en otros peces (Richard, *et al.* 2006) en los que las dietas que contienen mezclas de aceites vegetales reducen el colesterol total en el plasma de la lubina y de la trucha arco iris (Richard, *et al.* 2006b). Esto es posible porque las dietas que contienen los aceites vegetales ricos en ácido oleico (OA), ácido linoleico (LA) y ácido linolénico (ALA), son conocidos como FAs reductores del colesterol (Dietschy, *et al.* 1998). Otra explicación podría ser la presencia de fitosteroles en los aceites vegetales que pueden afectar la absorción de colesterol (Gilman, *et al.* 2003). Estudios en bioquímica sugieren que la inclusión de SO aumenta el contenido del  $\alpha$ -tocoferol hepático reduciendo la peroxidación lipídica en los peces. La dieta de SO modifican el perfil de los FAs en el hígado, observándose un marcado efecto en el contenido de EPA y DHA (Peng, *et al.* 2008).

Actualmente los resultados sobre el crecimiento indican que es posible sustituir hasta el 60% del aceite de pescado por aceites vegetales como SO y CO, sin afectar el crecimiento (Izquierdo, *et al.* 2005; Montero, *et al.* 2005; Mourente, *et al.* 2007), contrariamente a lo visto con el uso de PO como sustituto del FO en la dorada *Sparus aurata* (Fountoulaki, *et al.* 2009a).

#### **4.1.2.2. Vitaminas:**

Se considera que los componentes de las dietas afectan el sistema inmune de los vertebrados, las vitaminas antioxidantes, especialmente la vitamina C y E (Panush, *et al.* 1985). De hecho, las vitaminas y los minerales han mostrado sus efectos en la inmunidad y la resistencia a enfermedades en salmónidos (Lall, *et al.* 1985; Blazer, *et al.* 1984) y en el gato de río *Ictalurus punctatus* (Durve, *et al.* 1982; Li, *et al.* 1985).

Las Vitaminas C (o ácido Ascórbico) y E ( $\alpha$ -tocoferol o  $\alpha$ -T) funcionan como antioxidantes biológicos para proteger las macromoléculas celulares (DNA, proteína, lípidos) contra la oxidación incontrolada por los radicales libres durante el metabolismo normal o bajo condiciones de desafío oxidativo tales como las infecciones, el estrés y la contaminación. Por tal motivo, se considera esencial para los requerimientos dietéticos de las vitaminas C y E. La vitamina C parece proteger las membranas celulares contra los daños oxidativos, debido a la baja oxidación de los lípidos (Parihar, *et al.* 1996; Chien, *et al.* 2001), porqué mantiene

la integridad membranal para adaptarse a los cambios térmicos en ausencia de dietas suplementadas con  $\alpha$ -T (Chen, *et al.* 2004).

En el salmón atlántico se ha observado que la vitamina C protege de manera dosis dependiente contra la deficiencia en la vitamina E sobre el crecimiento, la mortalidad la hematología y la oxidación de los lípidos en el hígado (Hamre, *et al.* 1997). Por otra parte, la vitamina C no influye en los niveles de vitamina E en los tejidos, excepto en el caso de deficiencia de la vitamina C. Similares resultado se han reportado en la trucha arco iris (Furones, *et al.* 1992). Se cree que la vitamina C, está implicada en las reacciones de hidroxilación actuando en el subcomponente de C1q que tiene una región unida al colágeno que contiene la hidroxiprolina (Li, *et al.* 1985). Se ha descrito que en muchas especies acuícolas la vitamina C ejerce una influencia positiva en la resistencia a enfermedades (Navarre, *et al.* 1989; Kumari, *et al.* 2005).

Por otra parte, el  $\alpha$ -T es un potente antioxidante que prolonga la vida de los eritrocitos y tiene un papel importante en la respiración celular (Hung, *et al.* 1981). Es el componente celular de los fosfolípidos de las membranas que previene la oxidación de las cadenas largas de HUFAs (Bendich, *et al.* 1988). Los peces con deficiencia en  $\alpha$ -T pueden tener daños en las estructuras membranosas y en la función. Los peces alimentados con dietas no suplementadas con  $\alpha$ -T se caracterizan por anemias con bajos valores de hemoglobina y hematocrito; estos valores no se ven afectados por los niveles elevados de vitamina C en la dieta (Chen, *et al.* 2004) y parece probable que el daño de la membrana de los eritrocitos desencadene en una eventual mortalidad por la peroxidosis hemolítica (Hung, *et al.* 1981).

La anemia se asocia con frecuencia como una señal de estrés oxidativo (Henrique, *et al.* 2002). En la lubina y en la trucha arco iris, se observan generalmente valores hematocritos bajos en los peces con estrés oxidativo (Ortuño, *et al.* 1999; Meseguer *et al.* 1992). La vitamina E actúa destruyendo los radicales libres y captando el oxígeno (Foote, *et al.* 1984; Foote, *et al.* 1984). Existe una relación directa entre el  $\alpha$ -T en los tejidos y su concentración en la dieta (Hamre, *et al.* 1997; Ruff, *et al.* 2003) se ha visto también en el mero *Epinephelus malabaricus*, en el rémol *Scophthalmus rhombus*, y en la dorada (Mourete, *et al.* 2000).

La actividad reactiva del oxígeno en animales deficientes en  $\alpha$ -T puede tener efectos adversos en la actividad linfocítica y en la respuesta de los macrófagos y los neutrófilos (Tengerdy, *et al.* 1990). Los peces con dietas bajas en niveles de vitamina C y  $\alpha$ -T reducen la capacidad antioxidante y aumentan la susceptibilidad a la inflamación causada por el daño tisular y a posibles enfermedades infecciosas (Chen, *et al.* 2003). Es más, la fuerte interacción entre vitamina C y  $\alpha$ -T es evidente en el ACP de la sardinilla de quilla *Notemigonus crysoleucas* (Chen, *et al.* 2004) y aparece también en la dorada (Ortuño, *et al.* 2001) sugiriendo, que los factores del complemento pueden ser protegidos de la oxidación por el equilibrio en la ración de  $\alpha$ -T y Vitamina C.

La actividad alternativa del complemento (ACP) parece estar influenciada por la concentración de Vitamina C. Además la ACP fue deficiente en los peces con

deficiencia en  $\alpha$ -T. Como en la trucha arco iris, el salmón Atlántico y la dorada (Montero, *et al.* 1998; Blazer, *et al.* 1984; Hardie, *et al.* 1990). Los mecanismos por los cuales la ACP es reducida por  $\alpha$ -T no están claros (Blazer, *et al.* 1984). El total de las inmunoglobulinas y los niveles de hemolisina y aglutininas se reducen en las truchas arco iris con deficiencia de  $\alpha$ -T. Manifestándose determinantes en la defensa humoral no específica en los peces.

El efecto de las altas concentraciones de  $\alpha$ -T en el sistema inmune de los peces ha sido menos estudiado. En algunos estudios las altas dosificaciones dietéticas de la Vitamina E mostraron estimulación del sistema del complemento y las actividades o resistencia fagocitarias al estrés (Montero, *et al.* 1999; Pulsford, *et al.* 1995; Ortuño, *et al.* 2000), mientras que en otros no se observó ningún efecto inmunostimulante (Hardie, *et al.* 1990), aunque los resultados dependen de múltiples factores, como la interacción con otros nutrientes, el nivel de lípidos y por su puesto la especie estudiada. La suplementación de las vitaminas C y/o de E afectan la inmunorespuesta natural celular de la dorada, como se ha también descrito también en los mamíferos (Panush, *et al.* 1985).

Las propiedades antioxidantes del  $\alpha$ -T pueden también influenciar la tolerancia a la temperatura en peces (Chen, *et al.* 2004). Se sospecha que la vitamina E está involucrada también en la salud del sistema esquelético como parte de los mecanismos de defensa intracelular, protegiendo las células osteoblásticas de los radicales libres (Xu, *et al.* 1995). Así mismo, los cartílagos, los huesos, las vesículas de la matriz, los osteoblastos y los condrocitos se componen de PUFAs que los hace ser altamente susceptibles a la oxidación (Raisz, *et al.* 1993). La oxidación de los lípidos dietéticos puede modificar los componentes celulares de la membrana de las células del hueso, que afectan la fluidez de la membrana, la integridad y la función de la célula (Xu, *et al.* 1994; Watkins, *et al.* 1997).

Estudios realizados en el mero *Epinephelus malabaricus* no mostraron efectos de las dietas con o sin suplementación de vitamina E en el crecimiento y la mortalidad; similares resultados se reportaron en la dorada (Mourente, *et al.* 2002). El rodaballo juvenil *Psetta maxima* parece ser sensible a las dietas de lípidos oxidados (7.5meq/Kg) independientes de la suplementación con la vitamina E, mostrando en los tejidos estrés oxidativo y anormalidades escolióticas y lordóticas importantes. El examen de los niveles de tolerancia a los lípidos dietéticos oxidados para las etapas de desarrollo tempranas del mero puede ser beneficioso para reducir el predominio de deformidades esqueléticas y de patologías relacionadas en criaderos comerciales del mero *Epinephelus malabaricus* (Lewis-McCrea, *et al.* 2007).

Otra vitamina que tiene un papel esencial en muchos de los procesos fisiológicos, incluyendo la visión, la reproducción, la embriogénesis normal, el crecimiento, la diferenciación y el mantenimiento de los tejidos epiteliales es la vitamina A (Henrique, *et al.* 2002; Bendich, *et al.* 1989; NRC (National Research Council) 1993; Combs, *et al.* 1998). Los peces, como otros vertebrados carecen de la capacidad para sintetizar la vitamina A y por lo tanto la requieren en la dieta (Halver, *et al.* 2001).

La vitamina A afecta el crecimiento y el desarrollo normal de los peces en las dietas con exceso o deficiencia (Woodward, *et al.* 1994). Los síntomas de la deficiencia de Vitamina A en los peces incluyen retraso en el crecimiento, anemia, lesiones del ojo y la degeneración de la retina (Henrique, *et al.* 2002; NRC (National Research Council) 1993; Shimeno, *et al.* 1993; Shimeno, *et al.* 1981) y el exceso de vitamina A muestra efectos parecidos a los de la deficiencia (Halver, *et al.* 2001), por ejemplo crecimiento retardado, (Hilton, *et al.* 1983; Saleh, *et al.* 1995; Hernandez, *et al.* 2005) y alta incidencia de deformidades vertebrales (Hilton, *et al.* 1983; Saleh, *et al.* 1995; Dedi, *et al.* 1995; Takeuchi, *et al.* 1998) observadas previamente en las etapas juveniles y larvales de la platija japonesa *Paralichthys olivaceus* (Dedi, *et al.* 1995; Takeuchi, *et al.* 1998). El contenido de la Vitamina A en las dietas afecta el almacenamiento del retinol total en el hígado, de la platija japonesa *Paralichthys olivaceus* (Hernández, *et al.* 2005). Resultados similares se han publicado para el salmón atlántico *Salmo salar* (Thompson, *et al.* 1994), la trucha arco iris (Thompson, *et al.* 1995). En los homeotermos, la vitamina A afecta la resistencia a las enfermedades. Además, en altas dosis parece tener un efecto positivo en las respuestas mediadas por células principalmente por su papel en el crecimiento celular (Blazer, *et al.* 1992; Liao, *et al.* 1996). La Vitamina A se almacena principalmente en el hígado en los peces (Combs, *et al.* 1998), aunque no hay información disponible sobre cómo su deficiencia o exceso puede afectar la función hepática. Algunos estudios en la lubina midieron algunos parámetros del suero como la proteína total, la albúmina total, la bilirrubina y algunas enzimas que se han utilizado para evaluar los efectos de los productos químicos tóxicos (Lemaire, *et al.* 1991a) y las deficiencias de los lípidos en el hígado (Lee, *et al.* 2001) en otras especies como la carpa común (Jeney, *et al.* 1992) y la platija japonesa *Paralichthys olivaceus* (Jung, *et al.* 2003).

Investigaciones en mamíferos han mostrado que la vitamina A es un factor importante para diversos mecanismos de resistencia a las enfermedades en los mamíferos (Blazer, *et al.* 1992). Sin embargo, poco se sabe de ella en los peces. Los altos niveles de vitamina A mejoran algunas funciones inmunes tales como la actividad antiproteasa del suero de los salmones atlánticos (Thompson, *et al.* 1995) y el sistema inmune celular específico de la dorada (Cuesta, *et al.* 2007). La vitamina A adicionada en la dieta afecta perceptiblemente el crecimiento de la platija japonesa juvenil. La deficiencia de la Vitamina A produce retardo en el crecimiento e inapetencia a la alimentación en la platija japonesa juvenil alimentadas con dietas sin Vitamina A, observado también en otras especies (NRC (National Research Council) 1993; Halver, *et al.* 2001). En la dorada *Sparus aurata* (Cuesta, *et al.* 2002), los altos niveles de vitamina A de la dieta no aumentaron la actividad de las respuestas no específicas del suero.

Algunos estudios de suplementación de Vitamina E en la platija japonesa sugieren que necesitan la vitamina A para mantener las respuestas no específicas a las enfermedades (particularmente, la actividad antibacteriana del suero) como se ha observado en otros vertebrados (Combs, *et al.* 1998; Halver, *et al.* 2001; Liao, *et al.* 1996; Hernández, *et al.* 2007).

La vitamina D o colecalciferol tiene como principal función participar en la homeostasis del calcio y el fósforo. Además interviene en la proliferación y

diferenciación celular y ejerce una marcada influencia sobre la inmunidad (Botana, *et al.* 2002). En el sistema inmune de los mamíferos tiene un papel importante en la protección contra enfermedades como el cáncer, las enfermedades autoinmunes, las infecciones, la proliferación celular, el metabolismo xenobiótico y endobiótico (Cerezuela, *et al.* 2009). En los peces existen pocos estudios. Sin embargo, se ha demostrado que los peces marinos poseen grandes depósitos en el hígado de esta vitamina (Takehuchi, *et al.* 1984). La fuente de esta vitamina corresponde a la vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferol) endógena producida por la conversión fotoquímica cutánea del 7-dihidrocolesterol, o se obtiene por la alimentación de origen vegetal, exógena a partir de la Vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol) producida también por la conversión fotoquímica del ergosterol. La Vitamina D de la dieta se absorbe con la porción lipídica y es transportada en los quilomicrones (Botana, *et al.* 2002). El receptor de la vitamina D (VDR) en los vertebrados superiores incluye transformaciones esenciales entre el riñón donde se hidroxila y se activa transportándose a las células diana, para desarrollar su acción (Cerezuela, *et al.* 2009). Se ha demostrado que el requerimiento de Vitamina D es mucho mayor en los peces que en animales terrestres (NRC (National Research Council) 1993). La forma activa de esta vitamina funciona como una hormona que interacciona con los receptores del intestino incrementando la absorción de calcio y fósforo (Lall, *et al.* 2007) y su principal fuente de la Vitamina D para los peces es el plancton (Cerezuela, *et al.* 2009).

Ciertas investigaciones han demostrado que la administración de la Vitamina D<sub>3</sub> afecta algunos parámetros inmunes innatos (la actividad hemolítica natural del complemento y los niveles de peroxidasa) en la dorada *Sparus aurata* dependiendo de la dosis y el tiempo de administración. Es más, cuando se administra la Vitamina D<sub>3</sub> disminuyen estos parámetros. Por el contrario, mejoran quimiotaxis, la fagocitosis y las funciones citotóxicas, que involucran respuestas de los macrófagos (Cerezuela, *et al.* 2009). Sin embargo, se desconocen los mecanismos por los cuales la Vitamina D<sub>3</sub> mejora los parámetros inmunes y se hacen necesarios más estudios para la utilización de esta vitamina como inmunoestimulador.

La Vitamina K, soluble en grasa, es mejor conocida por su efecto sobre la coagulación de la sangre (protrombina, factores VII, IX, X) y su papel fundamental es estimular la formación ósea e inhibir la resorción, reduciendo la pérdida ósea. Las tres formas de vitamina K son biológicamente activas para la mayoría de los animales y peces (Lall, *et al.* 2007). La información disponible acerca de la vitamina K como requisito esencial respecto al metabolismo de los peces es limitada. El requisito cuantitativo de la vitamina K para la mayoría de los peces no se ha establecido (NRC, 1993).

#### **4.1.2.3. Aminoácidos:**

En los últimos años, la investigación intenta desarrollar nuevos sustitutos para la alimentación de los peces que sea sostenible, mejore la relación costo-eficiencia y rentabilice la acuicultura. Pero la sustitución total de la proteína de pescado en la alimentación de los peces por proteínas vegetales no es adecuadamente asimilada por los peces carnívoros/piscívoros debido a los desequilibrios nutricionales de

los aminoácidos. En los salmones se ha demostrado la presencia de factores que inhiben el crecimiento o son antinutricionales o con un sabor desagradable (Olli, *et al.* 1994; VandenIngh, *et al.* 1996; Hamre, *et al.* 2005) aunque no se afecte necesariamente la digestibilidad de la proteína (Mundheim, *et al.* 2004).

La mayoría de los estudios sugieren unas exigencias relativamente altas de proteína, de acuerdo con la naturaleza de carnívoros/piscívoros de los peces. Un correcto equilibrio de los macronutrientes (proteínas, lípidos y carbohidratos) repercuten positivamente en el crecimiento y la utilización del alimento. Además, en acuicultura permite ahorrar costos, ya que las proteínas son el ingrediente más caro e incorporado en mayor proporción en la alimentación de los peces marinos siendo utilizado habitualmente para el crecimiento y no para producción de energía (Perez-Jimenez, *et al.* 2009).

Los aminoácidos esenciales que se consideran generalmente son los mismos 10 en todas las especies piscícolas: Arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, valina y triptófano (Gurure, *et al.* 2007). Cualquier desequilibrio relevante en la composición de los aminoácidos esenciales afectará a la conversión alimenticia, reduciendo la utilización de las proteínas y el contenido de los aminoácidos de la dieta que tendrían que ser re-equilibrados con respecto a los requerimientos nutricionales para un óptimo rendimiento del crecimiento (Albrektsen, *et al.* 2006).

Un factor limitante en las dietas sustitutivas con semilla de soja en la alimentación acuícola es el bajo nivel de la lisina, que se encuentra en grandes cantidades en las proteínas musculares (Harris, *et al.* 1981; Harris, *et al.* 1976). Las proteínas de origen vegetal son generalmente deficientes en lisina y metionina, precursores de la carnitina una proteína implicada en el transporte de los ácidos grasos (FAs) y en las mitocondrias para la  $\beta$ -oxidación (Walton, *et al.* 1984; Bremer, *et al.* 1990). Estudios de sustitución de las proteínas vegetales (soja y maíz) en el bacalao y el salmón mostraron que las digestibilidades son similares. Sin embargo, las respuestas a una mayor inclusión dietética de proteínas vegetales parecen ser diferentes; el salmón es más sensible a las proteínas vegetales y muestra una reducción más severa en los valores de digestibilidad que el bacalao para mayores sustituciones de harina de pescado (Albrektsen, *et al.* 2006). Estas dietas de sustitución que utilizan productos no refinados como las semillas de la soja tienen efecto negativo en los peces carnívoros debido a la gran cantidad de fibra y a los componentes antinutricionales que producen mala absorción o causan patologías intestinales (Bakke-McKellep, *et al.* 2000). Estos ingredientes se encuentran en los granos y forrajes en forma de fitato (inositol hexafosfato), que reduce la disponibilidad del fósforo, los minerales, las proteínas y el almidón. Adicionando a la dieta la enzima exógena fitasa (liberadora de las uniones del fitato a los nutrientes), se mejora el crecimiento en diversas especies (gato de río *Ictalurus punctatus*, panga

*Pangasius pangasius*, trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* y carpa común *Cyprinus carpio* (Biswas, *et al.* 2007) e incrementan la disponibilidad de la unión fitasa-fósforo, optimizando la digestibilidad del material seco (Ricque, *et al.* 2004), reduciendo los costos de alimentación y la contaminación por el fósforo excretado (Beegle, *et al.* 2000).

Las dietas suplementadas con lisina mejoran los niveles de carnitina y de los lípidos en el músculo en estudios realizados en gato de río, mejorando su crecimiento y la oxidación de los lípidos (Li, *et al.* 1992; Zarate, *et al.* 1997). En 1995, Kaushik observa que la proteína de la soja tiene un efecto hipocolesteronémico en la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Kaushik, *et al.* 1995). El papel esencial de la lisina en la biosíntesis de la carnitina puede influir en las largas cadenas de FAs: AA, EPA y DHA utilizadas en la  $\beta$ -oxidación. Además, el incremento en los niveles de lisina de las dietas tiene un efecto importante en el contenido total de los lípidos en el músculo disminuyendo los resultados totales y con ello reduciendo la composición de otra clase de lípidos (Biswas, *et al.* 2007).

En el hígado y en el riñón de la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*, la reducción en la excreción de nitrógeno puede deberse a un mejor aprovechamiento de la proteína suplementada con la lisina y por ello a la menor excreción de amoníaco, el producto final del catabolismo de la desaminación de los aminoácidos (Walton, *et al.* 1984; Cowey, *et al.* 1994; Cowey, *et al.* 1993). La fitasa, además, reduce las descargas de fosfatos en el agua, tal vez por la mayor eficiencia del fósforo en la dieta que bloquea los enlaces fósforo-fitasa y la reducción del fósforo.

Además, los peces alimentados con fuentes de proteína vegetal deficientes en compuestos nitrogenados se ven afectados. Mostrándose algunas consecuencias sobre el funcionamiento, el crecimiento y la salud de los peces (Albrektsen, *et al.* 2006; Stapleton, *et al.* 1997; Abe, *et al.* 2000; Burrells, *et al.* 2001). Las proteínas vegetales son perceptiblemente diferentes tanto en el contenido de nitrógeno como en el contenido de aminoácidos libres, de taurina, de anserina y de nucleótidos libres con respecto a las fuentes marinas (Aksnes, *et al.* 2006). El bacalao *Gadus morhua* parece tener mejor tolerancia a las fuentes de proteína vegetal comparada con otras especies de peces carnívoras como los salmones (Aksnes, *et al.* 2006).

Se ha demostrado en diversos estudios que los peces son capaces de adaptarse a las nuevas situaciones nutricionales cambiando su perfil metabólico (Walton, *et al.* 1984). El principal cambio de estado metabólico en los peces implica que las dietas ricas en proteínas estimulan las vías proteolíticas y gluconeogénicas. Sin embargo, la sustitución parcial de las proteínas por los lípidos podría inhibir la vía lipogénica, mientras el uso de los carbohidratos podría estimular la glicólisis, glucogénesis y lipogénesis disminuyendo el catabolismo de las proteínas y la gluconeogénesis (Perez-Jimenez, *et al.* 2009). El papel de los niveles de proteína y la regulación hepática en la síntesis de los aminoácidos y enzimas asociados, se ha estudiado mucho menos que los lípidos o los carbohidratos en la dieta (Peres, *et al.* 2007).

La reducción en los niveles de aminoácidos está asociada a la disminución en la ingesta de alimento independientemente de su nivel de digestibilidad (El-Mowafi, *et al.* 2010). En ausencia de alimentación, los niveles plasmáticos de aminoácidos se pueden mantener por la glucogenólisis hepática y/o de la gluconeogénesis, así como por la movilización de los aminoácidos de las reservas periféricas

(Mommsen, *et al.* 1999; Hemre, *et al.* 2002). Por esto se recomienda ajustar al alza el porcentaje de energía alimentaria a fin de mantener un rendimiento óptimo y la rentabilidad en piscifactoría (El-Mowafi, *et al.* 2010). Una posibilidad en los ensayos de crecimiento sería la medición de los niveles en las concentraciones de los aminoácidos libres como indicadores de las necesidades de aminoácidos (Aragao, *et al.* 2008)

Existen evidencias que el estrés afecta el metabolismo de los aminoácidos (Aragao, *et al.* 2008). Así, algunos estudios muestran que el contenido total de aminoácidos en el plasma puede aumentar y la concentración de algunos aminoácidos libres se verían afectados (Vijayan, *et al.* 1997), de manera que los cambios en los niveles de aminoácidos libres en el plasma pueden ser un indicativo del requerimiento de ciertos aminoácidos en estas condiciones (Wilson, *et al.* 1996). Asimismo, importantes alteraciones en las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos libres se ven involucrados directa o indirectamente en la síntesis de compuestos importantes en la respuesta al estrés (Aragao, *et al.* 2008). En el lenguado senegalense *Solea senegalensis* en cambio no se mostraron variaciones de los aminoácidos en el plasma total bajo condiciones de estrés como el manejo.

#### **4.1.2.4. Los carbohidratos**

Los glúcidos constituyen el grupo de nutrientes más controvertido dentro de la alimentación de los peces, si bien es verdad que no aparecen deficiencias o síntomas carenciales cuando están ausentes en la dieta. Es más, se podría afirmar que sus requerimientos y necesidades son nulas. También puede afirmarse que estos animales ingieren cantidades mayores o menores de ciertos glúcidos que se encuentran en los alimentos que consumen normalmente, como por ejemplo, el glucógeno en los carnívoros e incluso algunas azúcares sencillos: manosa, xilosa, glucosa, etc. En el caso de los omnívoros y herbívoros además ingieren celulosa y almidón, aún cuando la presencia de este polisacárido es muy escasa en el medio acuático. Por último el azúcar presente en la sangre es la glucosa y por tanto, como en el caso de los anteriores vertebrados utilizan monosacáridos como sustrato energético en la mayor parte de los tejidos (Espinosa de los Monteros, *et al.* 1987).

En la actualidad, los carbohidratos son importantes ingredientes en las dietas acuícolas como suministro de energía a bajo costo (Krogdahl, *et al.* 2005). En los peces marinos carnívoros generalmente, no se incluyen carbohidratos en las dietas. Sin embargo es una fuente de energía fácilmente digerible, principalmente en forma de azúcares aunque no debe ser mayor a 20%. Ensayos llevados a cabo en Halibut Atlántico indican que pueden tolerar un amplio rango de carbohidratos suplementados, mientras las proteínas sean suficientes (Hamre, *et al.* 2003) siendo estas últimas la base de las dietas en acuicultura. Se acepta la hipótesis que con pocos carbohidratos, los lípidos pueden variar su rango sobre el total de la suplementación (50 a 300Kg<sup>-1</sup>). Así, los requisitos de la proteína en el Halibut Atlántico juvenil *Hippoglossus hippoglossus* para evitar posibles efectos adversos sobre el crecimiento son aproximadamente 580 Kg<sup>-1</sup> de alimento seco (Hamre, *et al.* 2005). El aumento en la dieta de los niveles de los carbohidratos

causa un aumento en el HSI principalmente por una mayor acumulación de glicógeno en el hígado, mientras que el aumento en la dieta de los lípidos hasta un 25% no lo hace (Hamre, *et al.* 2003).

Nuevos estudios en la lubina *Dicentrarchus labrax* sugieren que el incremento en la dieta de hasta un 20% de almidón está probablemente cerca del nivel máximo tolerable para la utilización metabólica de los hidratos de carbono por la lubina europea juvenil (Moreira, *et al.* 2008).

#### **4.1.2.5. Los minerales**

A pesar de los significativos progresos de las últimas décadas en la nutrición piscícola se dispone todavía de poca información sobre los requerimientos cuantitativos de los elementos inorgánicos y sus funciones fisiológicas en muchas especies, en particular sobre los elementos que actúan en el metabolismo de los organismos acuáticos. Se han hallado grandes dificultades para caracterizar los síntomas de la deficiencia o toxicidad bajo condiciones medioambientales controladas (Halver, *et al.* 2001). En muchas granjas acuícolas se enfrentan a patologías severas y señales de deficiencias nutricionales de etiología desconocida que podrían ser debidas a desequilibrios minerales de las dietas por limitados o excesivos elementos traza en el agua. Existen notables diferencias entre las especies de peces de agua dulce, los eurihalinos y los marinos en la absorción y utilización de elementos minerales indicando también que el requerimiento y toxicidad de los elementos inorgánicos puede ser influenciado por la acidez del agua (bajo pH). Las formulaciones alimenticias para animales acuáticos deben tener en cuenta el requerimiento individual de cada elemento, el potencial de acción con otros elementos inorgánicos, los nutrientes presentes en el tracto digestivo y su nivel metabólico en los distintos tejidos, la suplementación para el medio acuático así como la especie, la edad y el sexo de los peces (Halver, *et al.* 2001).

Los minerales esenciales son clasificados en dos grupos principales de acuerdo con su concentración en el cuerpo del animal como macroelementos (calcio Ca, fósforo P, magnesio Mg, potasio K, sodio Na, cloro Cl y azufre S) y como microelementos (cobalto Co, hierro Fe, manganeso Mn, cromo Cr, vanadio V, yodo I, níquel Ni, cobre Cu, molibdeno Mo, estaño Sn, flúor F, selenio Se y silicio Si, y zinc Zn (FAO 2003). La función general de los minerales, los microelementos o los elementos traza es la de constituyente esencial de las estructuras esqueléticas, el mantenimiento de la presión osmótica y de la regulación del intercambio de agua y solutos, así como, constituyentes de las estructuras de los tejidos blandos, la transmisión de los impulsos nerviosos y las contracciones musculares. Además, juegan un papel vital en el equilibrio ácido-base corporal, la regulación del pH en la sangre y otros fluidos. Son también constituyentes esenciales de muchas enzimas, vitaminas, hormonas y pigmentos respiratorios o como cofactores en el metabolismo, catálisis y como activadores enzimáticos (FAO 2003). El calcio y el fósforo, tienen un papel clave en la estructura esquelética en organismos acuáticos y son necesarios también para el crecimiento, el desarrollo y la salud ósea en los peces. Muchos microelementos esenciales tales como el

zinc, el manganeso y el cobre son necesarios también para el crecimiento, el desarrollo y la salud ósea en los peces (Lall, *et al.* 2007).

La biodisponibilidad de un elemento en la dieta puede diferir dependiendo de la forma molecular en que esté presente, el estado de valencia y el ligando presente cuando el elemento es ingerido en las diferentes dietas. Los mecanismos involucrados en la formación de sustancias insolubles y no absorbentes, puede facilitar o impedir a la mucosa la entrada en el intestino, el transporte y el metabolismo de un elemento en el cuerpo. A pesar que los peces tienen la capacidad de producir ciertos elementos del medio acuático, necesitan en sus dietas suplementación mineral.

Las dietas purificadas sin suplemento mineral provocan pérdida de apetito, disminución del tamaño, anemia hipocrómica, alta mortalidad y deformidades craneales (Nose, *et al.* 1972; Ogino, *et al.* 1976). Las dietas con base en soja suplementadas con minerales mejoran el crecimiento y la mineralización de los huesos (Ketola, *et al.* 1975b) en trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* reporta que la adición de calcio a la dieta que contiene levaduras incrementa el crecimiento (Arai, *et al.* 1975). Las dietas comerciales necesitan una suplementación adicional de algunos elementos para optimizar el crecimiento y la mineralización de los huesos (Watanabe, *et al.* 1980; Arai, *et al.* 1974). Murakami observa que la adición de fósforo a la dieta comercial de la carpa *Cyprinus carpio* mejora el crecimiento y previene las deformaciones craneales (Murakami, *et al.* 1970). Las excesivas cantidades de los minerales particularmente de Calcio y Fósforo, reducen la biodisponibilidad del Zinc que está a su vez relacionado con la formación de cataratas en salmónidos jóvenes (Ketola, *et al.* 1975b; Richardson, *et al.* 1986).

En la tabla 1 se enumeran las principales señales de la deficiencia de algunas especies de interés piscícola.

- (1) Trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*; (2) Trucha de arroyo *Salvelinus fontinalis*;
- (3) Salmón Atlántico *Salmo salar*; (4) Salmón Chum *Oncorhynchus keta*; (5) Salmón boquinegra *Oncorhynchus tshawytscha*;
- (6) Gato de río *Ictalurus punctatus*; (7) Carpa común *Cyprinus carpio*; (8) Anguila japonesa *Anguilla japonica*;
- (9) Besugo *Pagellus bogaraveo*; (10) Tilapia azul *Oreochromis aureus*; (11) *Oreochromis mossambicus* (Sargent, *et al.* 2002; Halver, *et al.* 2001).

<b>Mineral</b>	<b>Señales de deficiencia ( n especie)</b>
Calcio	Reduce el crecimiento y pobre conversión del alimento (1,8-10), anorexia (8). Reduce la mineralización ósea (10).
Fósforo	Reduce el crecimiento (1,3,6-9), anorexia (8), pobre conversión del alimento (1,3,5,6,9), reduce mineralización ósea (1,3,6,7,9), deformidades esqueléticas (1,3,7), deformidades craneales (7), vértebras esponjosas largas y curvadas (9) incremento de la grasa visceral (7).
Potasio	Anorexia (5), Convulsiones (5), Tétanos (5), mortalidad (5).
Magnesio	Reduce el crecimiento (1,6,8), anorexia (1,6-8), pesadez (1,6,7), nefrocalcinosis (1), convulsiones (7), cataratas (1,7), degeneración de las fibras musculares y las células epiteliales del intestino ciego pilórico y de los filamentos branquiales (1), deformidades esqueléticas (1), reduce la correcta mineralización ósea (1), reducción ósea (1,3,6,7,9,10), corporal (3) del suero (3), concentración del Mg, mortalidad (1,6,7).
Hierro	Reduce el crecimiento y pobre conversión del alimento (6), anemia macrocítica hipocrómica (2,3,7-9), bajos niveles del valor hematocrito y de la hemoglobina (1,3,6), reducción del Fe en el plasma y en la saturación de la transferrina (3,6).
Zinc	Reduce el crecimiento (1,3,6,7), anorexia (6,7), enanismo (1,7), cataratas (1,7), erosión de la aleta (1,7), erosión en la piel (7), reducción de las concentraciones de Zn corporal (3), ósea (1,6) y ósea de Ca (6), bajos niveles de Zn en el suero (6), mortalidad (1,7).
Manganeso	Reduce el crecimiento (1,7,11), pérdida del equilibrio (11), enanismo (1,7), cataratas (1,7), alta mortalidad (3,11), reducción ósea (2,3) y corporal (3), concentración de Mn (2,3), pobre anidación (1,2,3), anormal crecimiento de la cola (1).
Cobre	Reduce el crecimiento (7), cataratas (7), reduce en el hígado la enzima superóxido Cu/Zn dismutasa (3), y en el corazón la actividad oxidasa del citocromo c (3,6).
Selenio	Reduce el crecimiento (6,7), anemia (7), cataratas (7), distrofia muscular (3) diátesis exudativa (1), reduce la actividad de la glutathion peroxidasa (1,3,6).
Yodo	Hiperplasia tiroidea (1,2,5).

A pesar de los significativos progresos de las últimas décadas en la nutrición piscícola, se desconocen los requerimientos cuantitativos de los elementos inorgánicos y sus funciones fisiológicas en muchas especies. En particular sobre los elementos que actúan en el metabolismo de los organismos acuáticos, se han encontrado grandes dificultades para caracterizar los síntomas de la deficiencia o toxicidad bajo condiciones medioambientales controladas (Halver, *et al.* 2001). En muchas granjas acuícolas se enfrentan a patologías severas y las señales de deficiencias nutricionales de etiología desconocida podrían deberse a desequilibrios minerales de las dietas. Existen notables diferencias entre las especies de peces de agua dulce, los eurihalinos y los marinos en la absorción y utilización de elementos minerales. indicando también que el requerimiento y toxicidad de los elementos inorgánicos puede ser influenciado por la acidez del agua (bajo pH). Las formulaciones alimenticias para animales acuáticos deben tener en cuenta el requerimiento individual de cada elemento, el potencial de acción con otros elementos inorgánicos, los nutrientes presentes en el tracto digestivo y su nivel metabólico en los distintos tejidos, la suplementación para el medio acuático así como la especie, la edad y el sexo de los peces (Halver, *et al.* 2001).

## \* OBJETIVOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

La presente tesis ha tenido como objetivo general determinar la respuesta inmunitaria de peces de interés acuícola después de tratamientos dietarios experimentales.

En particular, este objetivo general se ha desarrollado en varios objetivos específicos que han conformado el diseño experimental de la tesis:

- 1) Determinar el efecto de un estrés por manejo y estimulación inmunitaria sobre la respuesta de estrés e inmunitaria en la dorada.
- 2) Establecer la influencia de la concentración de un inmunoestimulante tipo manano-oligosacárido en la dieta de lubinas juveniles (*Dicentrarchus labrax*).
- 3) Comprobar el efecto del inmunoestimulante Glucano-manano en la dieta de doradas juveniles *Sparus aurata*.
- 4) Determinar el efecto de la concentración del ácido linoleico conjugado en la dieta de lubinas juveniles *Dicentrarchus labrax* sobre la respuesta inmunitaria.



## **5. CAPÍTULO 1: EFECTO DEL ESTRÉS AGUDO POR MANEJO E INFECCION CON LPS EN DORADA *Sparus aurata***

### **5.1. Introducción**

#### **5.1.1. El cortisol y el sistema inmune**

En los vertebrados las hormonas corticoesteroides mineralcorticoides (MCs) y glucocorticoides (GCs) son esenciales para el desarrollo normal, el mantenimiento de la homeostasis basal y los eventos relacionados con el estrés. Regulando una amplia gama de procesos metabólicos y de funciones fisiológicas a través de dos clases de los receptores del corticoesteroide (CR y GR). Los GCs ejercen una parte de sus efectos por difusión a través de la membrana celular, ocupando los receptores situados en el citosol. El desplazamiento del complejo del GC-receptor en el núcleo se combinan con los elementos específicos responsables de los GCs presentes en los promotores del gen o por la interacción con el factor de la transcripción del NF- $\kappa$ B (Cupps, *et al.* 1982; McKay, *et al.* 1999) induciendo o reprimiendo la transcripción que conduce a la función biológica (Cupps, *et al.* 1982).

El indicador de estrés de uso más común en los peces es el cortisol plasmático. Por su fácil accesibilidad experimental, existen numerosos y variados datos obtenidos del plasma: 1) el cortisol puede medirse fácil y precisamente utilizando un radioinmunoanálisis (RIA) (Gamperl, *et al.* 1994) o un ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) (Barry, *et al.* 1993); 2) es posible obtener niveles de cortisol en el plasma en organismos no estresados por el propio procedimiento de obtención de muestras, incluida la anestesia (Boesgaard, *et al.* 1993; Laidley, *et al.* 1988a; Iwama, *et al.* 1989) y 3) los niveles de cortisol en plasma tienden a incrementarse con la exposición al estresante (Mommsen, *et al.* 1999).

Las investigaciones realizadas en *Salmon coho* con dietas suplementadas con cortisol, muestran un aumento en el número de leucocitos en el timo y en el riñón anterior. Mientras, que en el bazo los leucocitos disminuyen (Maule, *et al.* 1991). Otros autores describen cambios significativos en la respuesta mitogénica a los lipopolisacáridos (LPS) o después de incubación de linfocitos con medios enriquecidos con cortisol (Laidley, *et al.* 1988b). Sin embargo, el estudio de Narnaware (Narnaware, *et al.* 1996) no muestra disminución significativa de la actividad fagocítica de macrófagos después de la inyección de 200nM del cortisol. En el caso, del salmón Atlántico *Salmon salar* los resultados fueron inconsistentes dependiendo de los indicadores analizados. Después de la inyección de cortisol, no fueron observados cambios en los niveles de granulocitos en sangre, linfocitos o monocitos. Por el contrario, se observan incrementos significativos en los trombocitos (Narnaware, *et al.* 1996).

Los altos niveles de cortisol tienen un impacto negativo en la resistencia a infecciones microbianas en la dorada *Sparus aurata* como resultado de una reducción de la actividad fagocítica de los leucocitos. Se demostró que el cortisol,

especialmente a altas dosis, tiene un efecto negativo en la regulación de la fagocitosis pero no en la actividad citotóxica (Narnaware, *et al.* 1996). Los receptores del cortisol se han detectado en los teleósteos en muchos órganos como el timo y el riñón anterior afectando leucocitos (Maule, *et al.* 1989; Weyts, *et al.* 1998). No obstante, el mecanismo que gobierna este efecto en los peces permanece desconocido.

### **5.1.2. Indicadores inmunitarios del estrés**

Las situaciones de estrés alteran gran número de parámetros inmunes, pero existen dificultades para identificar los más adecuados debido a la falta de conocimiento de los mecanismos involucrados en la respuesta al estrés en los peces, en comparación con lo que se conoce en vertebrados superiores.

Los peces son organismos poiquiloterms y de medio acuático, por lo que necesitan adaptarse a grandes cambios ambientales de temperatura, niveles de oxígeno, salinidad, etc. Por esto, su sistema inmune debe actuar rápida y eficientemente con un amplio rango de antígenos. Además, el hecho de vivir en un medio acuático los expone a gran cantidad de patógenos. Por lo tanto, un buen indicador en los peces, es aquel que representa la respuesta inmune respondiendo a un amplio rango de antígenos, que sea eficiente y potente en corto período de tiempo (Magnadóttir, *et al.* 2006).

Los peces dependen de la respuesta inmunitaria innata como un conjunto de mecanismos que juegan un papel mucho más importante que en los vertebrados superiores (Tort, *et al.* 2005). En otros vertebrados, estas respuestas las realizan la inmunidad celular adaptativa o las moléculas de plasma o suero, siendo específicas o no específicas. En los peces, la respuesta inmune central no es específica. Se ha demostrado que la parte más importante de la respuesta inmune se centra en la respuesta fagocítica. Dicha actividad fagocítica puede ser detectada por los indicadores de la reacción de explosión respiratoria donde se mide la producción de radicales libres de oxígeno. Durante esta reacción las células incrementan el consumo de oxígeno y los intermediarios reactivos del oxígeno (IROs) (Secombes, *et al.* 1996). Esta respuesta también es detectable por los indicadores fagocíticos como la reducción del *Nitro-Blue Tetrazolium* (NBT) causado por los radicales libres del oxígeno, la adherencia celular o la capacidad de fagocitar partículas de los macrófagos.

Otros indicadores pueden ser derivados de los cambios celulares inducidos por el estrés, ya que en estas condiciones se modifica el número y la distribución de células blancas. Sin embargo, no hay suficientes estudios que muestren un panorama completo de estos parámetros; por ejemplo, el número de células en la sangre (leucocitos o linfocitos) y en los órganos linfoides (bazo, riñón anterior y timo) (Tort, *et al.* 2005).

Las inmunoglobulinas (Igs) están menos desarrolladas en los peces que en los grandes vertebrados. Las formas de Igs, en los peces, son muy reducidas en comparación a los grandes vertebrados; el poder de la respuesta es bajo y la respuesta de la memoria secundaria es muy reducida en potencia y rapidez en el tiempo (toma de 3-5 semanas para desarrollar la máxima respuesta). Por el

contrario, otras respuestas como las del sistema alternativo del complemento y sus propiedades líticas son 10 veces mayores que en mamíferos. Además, este sistema está activo a un amplio rango de temperaturas y pH (Sunyer, *et al.* 1995).

Nuevas investigaciones han mostrado la relación entre el aumento de condiciones de potencia y una gran variabilidad para las proteínas del sistema del complemento, disminuyendo las condiciones de las proteínas Igs en vertebrados inferiores. La relación inversa se ha observado en vertebrados superiores (Sunyer, *et al.* 1997). Otro sistema no específico más eficiente en los peces que en los vertebrados homeotérmicos es la actividad lisozímica en la sangre, tejidos y piel u otras moléculas en el suero como lectinas o aglutininas (Tort, *et al.* 1996; Mock, *et al.* 1990).

La Tabla 1 muestra los indicadores más utilizados para medir inmunocompetencia no específica en peces (Anderson, *et al.* 1997). Los cambios en las pruebas son siempre herramientas muy útiles, para determinar la eficiencia del sistema inmune bajo las condiciones de estudio requeridas. Las pruebas de resistencia a enfermedades con algún patógeno específico u oportunista, indican la capacidad del sistema inmune para afrontar los cambios (Tort, *et al.* 2005).

Tabla 1. Indicadores inmunes en peces. Agentes y localización en el cuerpo (Tort, *et al.* 1998).

INDICADOR	UNIDADES	AGENTE	LOCALIZACIÓN
Complemento (alternativo)	ACH50 unit/mL	Proteínas C3	Suero
Complemento (Clásico)	ACP unit/mL	Proteínas del suero + anticuerpo	Suero
Aglutinación	Títulos	Ig +Lectinas	Suero
Lisozima	Títulos	Lisozima	Moco, Suero
Reducción NBT	Absorbancia	Macrófagos	Sangre
Explosión respiratoria	Absorbancia	Macrófagos	Riñón anterior
Adherencia de WBC	Porcentaje	Macrófagos	Riñón anterior
Linfocitos circulantes	1000/ $\mu$ L	Linfocitos	Sangre
Quimioluminiscencia	Centelleo	Macrófagos	Linfocitos
Proliferación celular		Linfocitos	Tejido linfoide
Células formadoras de placas	Pfu/mL	Linfocitos	Tejido linfoide
Cantidad diferencial de WBC	Formula	Células sanguíneas	Sangre

### 5.1.3. Inmunosupresión inducida por estrés

Como se ha comentado, las situaciones de estrés tienen consecuencias no sólo a nivel energético, metabólico y son supresoras potentes de las funciones fisiológicas que dependen del tiempo de exposición al supresor. El estudio de estresantes tales como captura, hacinamiento o dietas deficientes pueden afectar la homeostasis general de los animales y en concreto del sistema inmune. Como se puede apreciar en la tabla 2. Donde se muestran algunos de estos indicadores en la dorada *Sparus aurata*.

Tabla 2. Cambios de algunos indicadores seleccionados después de exposición a diferentes estresantes en *Sparus aurata* (Tort, *et al.* 1996).

INDICADOR	UNIDADES	%DE CAMBIO	TIEMPO	ESTRESOR
Complemento ACP (hemólisis)	ACH50 unidad/mL	97,4	24 horas	Captura (agudo,5 minutos)
		88,9	5 días	Hacinamiento (crónico) Captura diaria (repetición agudo)
		70,1	16 días	
		53,3	2 meses	
		52,1	2 meses	
Actividad de Aglutinación	Títulos	87,9	24 horas	Deficientes en vitamina E y n-3 HUFAs
		64,7	9 días	Captura (agudo,5 minutos)
		79,5	16 días	Hacinamiento (crónico) Captura diaria (repetición agudo)
Linfocitos Sangre	106 cel/mL	94,7	2 meses	n-3 HUFAs deficientes
		84,4	24 meses	Captura (agudo, 5 minutos)
		70,2	9 días	Hacinamiento (crónico) Captura diaria (repetición aguda)
		68,7	16 días	

Existen múltiples estudios sobre los efectos de los estresantes en el sistema inmune de los peces relacionados con los cambios ambientales como: los estados reproductivos, las características del agua, la presencia de productos químicos en el agua y los procedimientos de cultivo. La mayoría de las investigaciones demuestran que el estrés produce inmunosupresión, pero la prolongación de sus efectos es muy variable y depende de muchos factores claves. La naturaleza de la respuesta está relacionada con el estresor: dependiendo de su tipo, intensidad, persistencia y duración de la exposición (tiempo) generando diferentes respuestas. La respuesta del organismo depende del indicador medido, la localización en el cuerpo (sangre, órganos o tejidos periféricos) y el estado del pez (Rotllant, *et al.* 1997; Barton, *et al.* 2005; Acerete, *et al.* 004; Altimiras, *et al.* 1994; Montero, *et al.* 1999; Rotllant, *et al.* 1997).

Durante la primera fase de activación del estrés agudo producido por el estrés social o confinamiento, las células inmuno-competentes de los tejidos linfoides tales como el riñón anterior, el bazo o el timo pueden mejorar la respuesta proliferativa/mitótica (Demers, *et al.* 1997; Pottinger, *et al.* 1995; Pickering, *et al.* 1991; Cubero, *et al.* 1997).

Sin embargo, otros estresantes tales como el transporte o hacinamiento originan una importante disminución de la tasa mitótica (Maule, *et al.* 1989; Mazur, *et al.* 1993). Los estresantes químicos tales como pesticidas, metales o componentes orgánicos usualmente suprimen la función inmune, pero incrementan los indicadores inmunes y específicamente el índice de fagocitosis (Fries, *et al.* 1986; Roberts, *et al.* 1995; Thuvander, *et al.* 1993).

Estas discrepancias son probablemente explicadas por las circunstancias en que los indicadores son medidos; por ejemplo, en el tiempo transcurrido desde la iniciación del efecto del estresor y la dinámica del mecanismo inmune particular (Tort, *et al.* 1998). Por lo tanto, numerosos indicadores podrían mostrar incremento cuando el sistema inmune esta en la primera fase de reacción contra el cambio. Así, el aumento o disminución del número de linfocitos podría ser registrado dependiendo del lugar donde se toman las muestras (sangre o tejidos linfoide) y el tiempo después de la incursión del estresor. Los índices fagocíticos también son contradictorios dependiendo de las condiciones particulares del experimento. No obstante, parece no haber duda, que un efecto principal es la supresión o la mala adaptación y esto podría ser especialmente claro a medio o largo plazo cuando el estresor es crónico o repetitivo (Tort, *et al.* 1998; Tort, *et al.* 1996; Tort, *et al.* 1996a; Barton, *et al.* 1997).

## **5.2. Experimento 1**

### **5.2.1. Objetivo**

El objetivo de este estudio es evaluar dos tipos de estrés agudo, la manipulación y captura y la infección experimental con LPS, así como sus implicaciones en la resistencia a las infecciones.

### **5.2.2. Materiales y métodos**

#### **5.2.2.1. Animales experimentales**

Doscientos ejemplares de doradas fueron distribuidas al azar en cuatro tanques y con cincuenta peces cada uno; que fueron alimentados por tres semanas *ad libitum* hasta adaptarse a las condiciones ambientales de temperatura (19 – 23°C) y de densidad media (6Kg/m<sup>3</sup>). Realizándose, el muestreo de seis peces de cada tanque.

#### **5.2.2.2. Manipulación y captura**

Cien peces fueron seleccionados al azar y distribuidos en dos tanques cilíndricos, de fibra de vidrio con 300l de capacidad; para facilitar la incubación de patógenos

(3 Kg de peces/m<sup>3</sup>, 50 peces/tanque). Los tanques fueron filtrados con agua marina (1.39 l/min) a temperatura de 19 – 23.4°C y fotoperíodo (12h luz día/12h luz noche).

Los peces fueron alimentados manualmente *ad libitum* durante tres semanas y tres veces al día. En el primer día, en los intervalos de tiempo 0, 1, 2, 4 y 8 horas y los días segundo, quinto y décimo. Los peces fueron capturados con una red y sostenidos fuera del agua por 30 segundos. De igual manera, se procedió en el segundo, el quinto y el décimo día. Se muestrearon seis peces por tanque, recogiendo el suero a los tiempos ya descritos para determinar la actividad lisozímica, bacteriolítica, del complemento ACP, la osmolalidad y el cortisol.

### **5.2.2.3. Infección experimental**

En este caso, se inyectó una sola dosis de LPS bacteriano en la cavidad peritoneal. Mientras, que los controles respectivos fueron inyectados con suero fisiológico. Este es un modelo ya probado por el grupo de investigación en otras ocasiones, y permite estudiar la respuesta al estrés provocado por las consecuencias sistémicas de una infección (Acerete, *et al.* 2004; Ribas, *et al.* 2004; Sunyer, *et al.* 1997).

Pasado el tiempo de adaptación, los peces de los dos tanques reciben tratamientos de infección y control, mediante una dosis de inyección intraperitoneal (I.P) de 400µl de endotoxina LPS de *E.Coli* 026:B6 (Sigma) y una dosis de solución salina estéril, respectivamente. En ambos casos, los especímenes fueron anestesiados con 2-fenoxietanol (Sigma) a una concentración no letal de (0,75ml/l). Se tomaron seis ejemplares por tanque para recoger el suero en los tiempos 0, 1, 2, 4, 8 horas. Se repitió el mismo procedimientos en los días 1, 2, 5 y 10; para determinar la actividad lisozímica, bacteriolítica, del complemento (ACP), la osmolalidad y el cortisol.

### **5.2.3. Obtención de muestras**

#### **5.2.3.1. Obtención del suero**

La sangre se extrajo mediante punción en la vena caudal y posteriormente fue colocada en tubos Eppendorf. La sangre se almacena a 4°C por un periodo de tiempo de 4 a 6 horas y se centrifuga a 8000 rpm por 5 minutos. Finalmente, se recolecta el sobrenadante y se guarda a -80°C hasta que se realicen los análisis respectivos.

#### **5.2.3.2.1. Técnicas analíticas**

##### **5.2.3.2.1.1. Bacteriolisis**

Se inculó una colonia de *E. Coli* en medio LB, y se dejó crecer toda la noche. Al día siguiente, se colocó una muestra de la bacteria en el suero en dilución (1:2) y se midió la absorbancia por espectrofotometría, indicando la capacidad hemolítica bactericida del suero, inhibiendo su crecimiento.

#### **5.2.3.2.1.2. Lisozima**

La actividad de la lisozima se determina por el método turbidimétrico, que utiliza la lisis del *Micrococcus luteus* para la determinación de la actividad enzimática (Rotllant, *et al.* 1997) utilizando la lisozima de clara de huevo como estándar.

#### **5.2.3.2.1.3. Complemento**

La determinación de la actividad del complemento se realiza siguiendo la técnica descrita por Sunyer (Sunyer, *et al.* 1995). Se denominada como ACH50 se mezcla el suero del pez con sangre fresca de conejo o cordero.

#### **5.2.3.2.1.4. Osmolalidad**

La osmolalidad (mOsm/kg) en el suero es medida directamente en el punto de congelación en el osmómetro (Osmomat 30 Gonotech, Berlin).

#### **5.2.3.2.1.5. Cortisol**

Los niveles de cortisol se midieron por la técnica de radioinmunoanálisis (R.I.A) (Rotllant, *et al.* 2001). Los anticuerpos utilizados para el ensayo fueron proporcionados por Biolink, S.L. (Costa Mesa, CA) con una dilución final de 1:6000.

### **5.2.7. Análisis estadístico**

Los experimentos se hicieron por duplicado. Se realizó un análisis de varianza ANOVA para evaluar la evolución del estrés con 2 factores (estrés y tiempo) y (infección y tiempo). Se consideran diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ , indicándose en las figuras con asteriscos (\*),  $p < 0,01$ (\*\*),  $p < 0,001$ (\*\*\*). Los valores  $n=4$  están representados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (*Mean*  $\pm$  *S.E.M.*); cuando la ANOVA resultaba significativa ( $p < 0,05$ ), se realizaron dos análisis adicionales, una *t de Student* para conocer las diferencias entre los grupos a cada tiempo, y un Post-hoc Scheffé para conocer diferencias entre tiempos.

### **5.2.8. Resultados**

#### **5.2.8.1. Manipulación y captura.**

##### **5.2.8.1.1. Actividad bacteriolítica.**

Cuando se compararon los peces control con los peces sometidos a estrés agudo por manipulación, se observó una elevada capacidad para reducir el crecimiento bacteriano en el suero respecto a los controles. Es más, sus niveles de interacción fueron significativos para el estrés desde la primera hora hasta el quinto día.

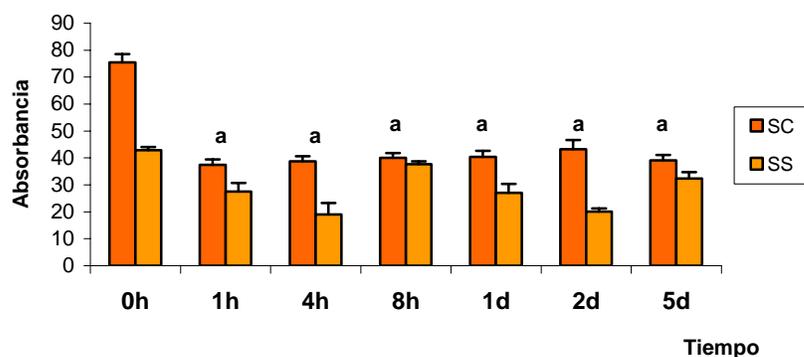


Figura 1. Comparación de la actividad bacteriolítica del suero en peces sometidos a estrés por manejo y captura (SS) y los grupos control (SC), a lo largo del tiempo (0h – 5 días). El ANOVA mostró diferencias significativas ( $p < 0,001$ ). Media y error estándar  $n=4$ . En el Posthoc Scheffé se encontraron diferencias significativas  $P < 0,001$ . La letra indica la diferencia entre los grupos (control- estrés) con una *t de Student*.

En la tabla n. 3, se observan los resultados del post hoc Scheffé que se realizó después de la ANOVA, con una gran diferencia significativa para esta variable.

R/Post hoc Scheffe	1H	4H	8H	1D	2D	5D
<b>Bacteriólisis</b>	0,001	0,001	0,001	0,001	0,005	0,001
<b>Dif. Sig.</b>	***	***	***	***	*	***

### 5.2.8.1.2. Actividad de la Lisozima

Cuando se compararon los peces control con los sometidos a estrés agudo se observó disminución en los niveles de la lisozima. Se apreciaron diferencias significativas en cuanto a la interacción de las variables (estrés - tiempo) en los peces sometidos al estrés. Pero no se registraron cambios significativos respecto a la evolución del tiempo.

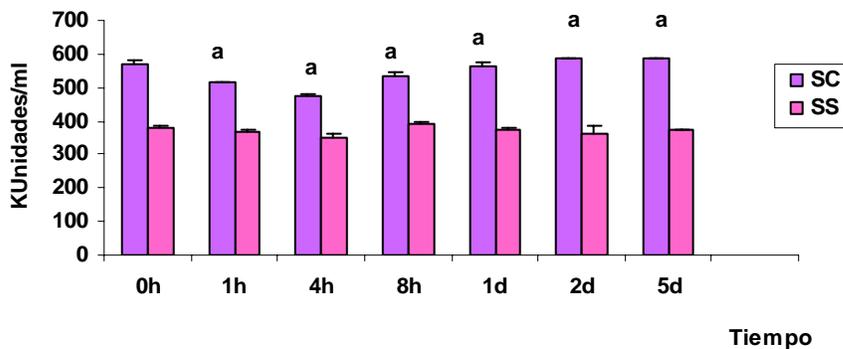


Figura 2. La actividad de la lisozima (en K unidades/ml) en peces sometidos a estrés por captura y manejo (SS) y los grupos control (SC). El ANOVA donde  $p < 0,001$  fue significativo (\*\*\*). Media  $\pm$  error estándar  $n=4$ . En el Posthoc Scheffé no se encontraron diferencias significativas respecto al tiempo  $P < 0,05$  (\*). La letra indica la diferencia entre

los grupos (control- estrés) con una *t. Student*.

### 5.2.8.1.3. Actividad del complemento

El ACH50 mostró actividad normal, llegando a su máximo valor en el segundo día del tratamiento experimental. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas respecto al estrés.

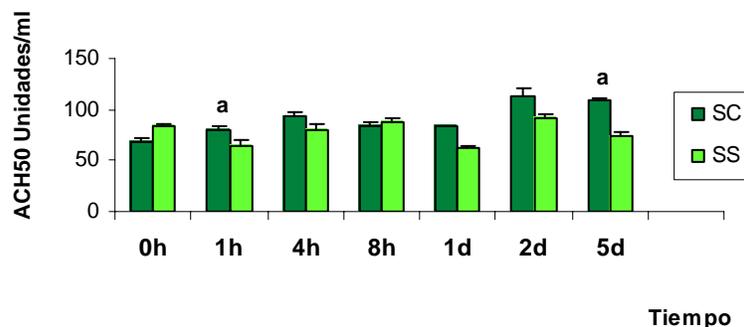


Figura 3. Actividad del complemento en unidades (ACH50/ml) en peces sometidos a estrés por captura y manejo (SS) y los grupos control (SC), a lo largo del tiempo (0h-5 días). El ANOVA no fue significativo  $p < 0,05$  (\*). Media  $\pm$  error estándar  $n=4$ . La letra indica la diferencia entre los grupos (control- estrés) con una *t de Student*.

### 5.2.8.1.4. Osmolalidad

Los peces sometidos a estrés no mostraron diferencias relevantes cuando se compararon con los controles. Este parámetro se vió poco afectado por el estrés durante el tiempo de experimentación y se observó poca variabilidad a lo largo del tiempo (solamente a las 4 horas).

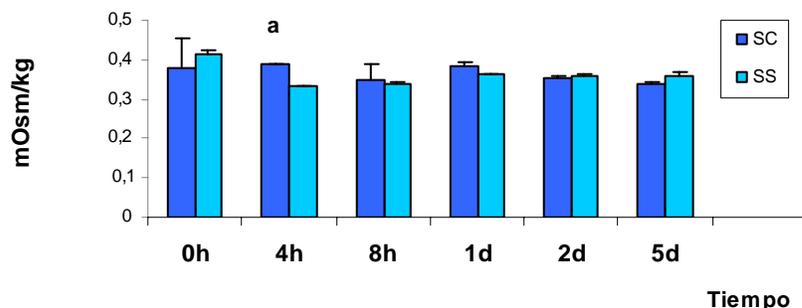


Figura 4. Comparación de la osmolalidad del suero sometido a estrés por manejo y captura (SS) y los grupos control (SC), a lo largo del tiempo (0h -5 días). El ANOVA no fue significativo ( $p < 0,05$  \*). Media  $\pm$  error estándar  $n=4$ . La letra indica la diferencia entre los grupos (control- estrés) con una *t de Student*.

### 5.2.8.1.5. Cortisol

En los peces sometidos a estrés agudo se apreció una elevada actividad en este parámetro, mostrándose un rápido incremento en las primeras horas del tratamiento que posteriormente fue disminuyendo lentamente; sin embargo, no hay diferencias significativas respecto al tiempo según el análisis post-hoc.

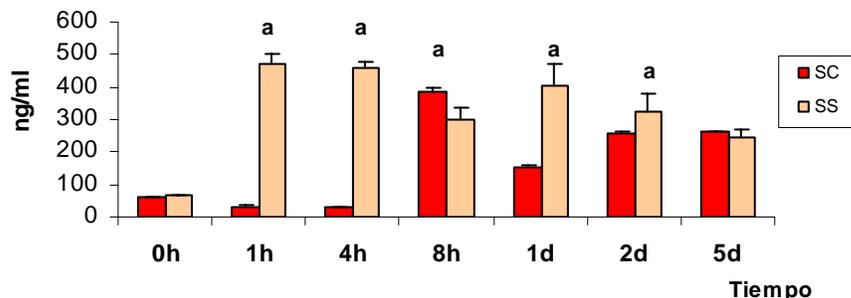


Figura 5. Comparación de la actividad del cortisol entre el suero de peces sometidos a estrés por captura y manejo (SS) y los grupos control (SC), a lo largo del tiempo (0h - 5 días). El ANOVA no fue significativo ( $p < 0,05$ ). Media  $\pm$  error estándar  $n=4$ . La letra indica la diferencia significativa entre los grupos (control- estrés) con una *t de Student*.

### 5.2.8.2. Infección experimental con LPS

#### 5.2.8.2.1. Actividad bacteriolítica

Cuando se compararon los peces sin tratamiento con los infectados por LPS se pudo observar una elevada respuesta bacteriolítica. A pesar de esto, no se mostraron diferencias significativas durante el periodo experimental según el test estadístico.

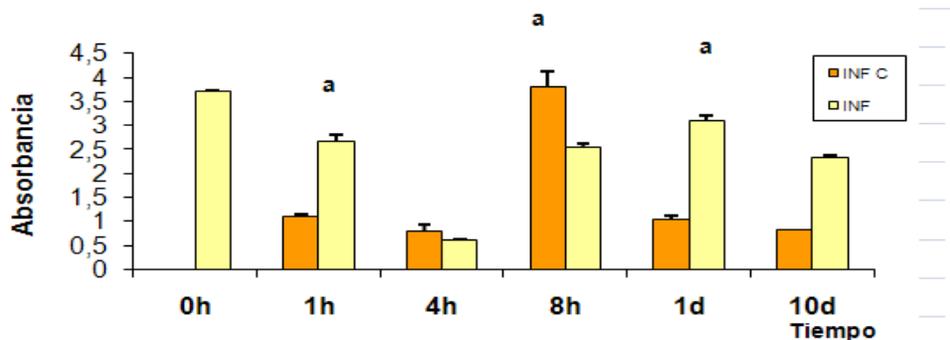


Figura 6. Actividad bacteriolítica del suero en peces sometidos a estrés por una infección experimental (Inf) y los grupos control (InfC), a lo largo del tiempo (0h -10 días). El ANOVA no fue significativo ( $p < 0,05$ ). Media  $\pm$  error estándar  $n=4$ . La letra indica la diferencia entre

los grupos (control-infección) con una *t de Student*.

### 5.2.8.2.2. Actividad de la Lisozima

Este parámetro inmunitario mostró pocas diferencias con los controles ante la infección experimental y no se observaron diferencias significativas considerando todo el experimento respecto a la evolución global del tiempo. Sin embargo, se encuentran cambios significativos en cuanto a la interacción de las variables infección-tiempo, y también en los niveles en infectados respecto a los controles excepto en los dos primeros tiempos en que los controles también son bajos.

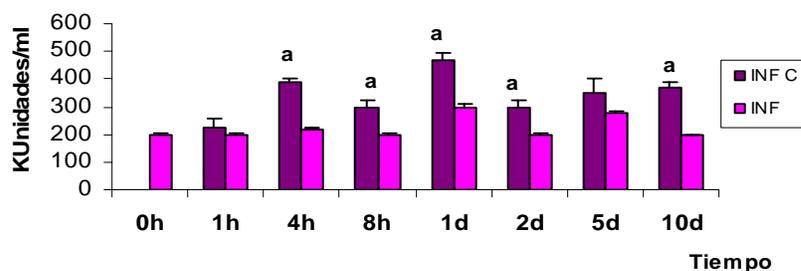


Figura 7. Comparación de la actividad de la lisozima del suero en peces sometidos a estrés por infección experimental (Inf) y los grupos control (InfC), a lo largo del tiempo (0h -10 días). En el ANOVA no se encontraron diferencias significativas a una  $p < 0,05$  (\*). Media  $\pm$  error estándar  $n=4$ . La letra indica la diferencia entre grupos (control- estrés) *T. Student*.

### 5.2.8.2.3. Actividad del complemento

La ACH50 mostró una actividad más baja al principio y creció posteriormente, siendo su pico más alto a las cuatro horas de la iniciación de la infección experimental. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas globalmente.

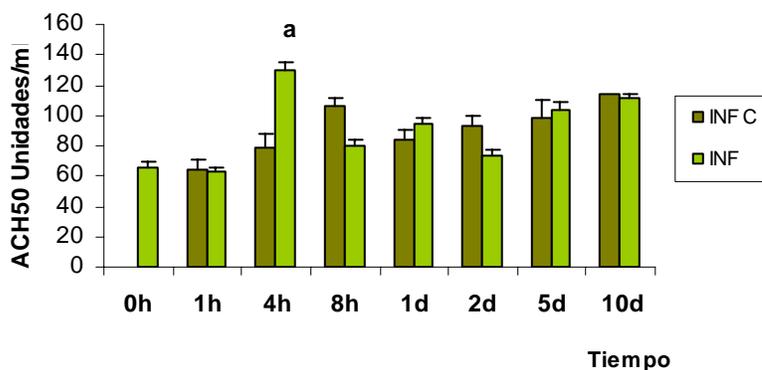


Figura 8. Comparación de la actividad del complemento en el suero entre peces sometidos a estrés por infección experimental (Inf) y los grupos control (InfC), a lo largo del tiempo (0h -10 días). En el ANOVA no se encontraron diferencias significativas, donde  $p < 0,05$  (\*). Media  $\pm$  error estándar  $n=4$ . La letra indica la diferencia entre los grupos (control-infección) con una *t de Student*.

#### 5.2.8.2.4. Osmolalidad

Durante el tratamiento experimental este indicador no mostró mucha variación y se apreciaron pocas diferencias. Estos resultados son Ssmilares a los que se presentaron en el primer experimento en el que tampoco se encontraron diferencias significativas.

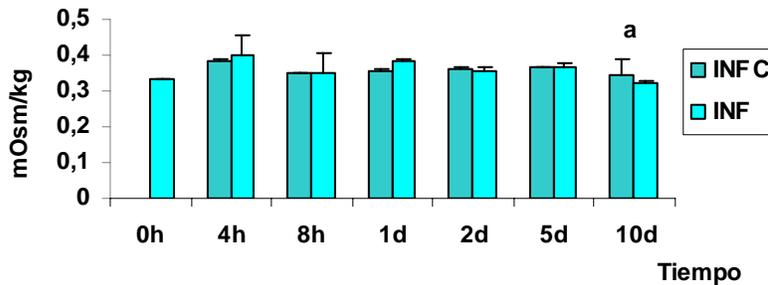


Figura 9. Comparación de la osmolalidad en suero entre peces sometidos a estrés por infección experimental (Inf) y los grupos control (InfC), a lo largo del tiempo (0h -10 días). En el ANOVA no encontraron diferencias significativas, ( $p < 0,05$ ). Media  $\pm$  error estándar  $n=4$ . La letra indica la diferencia entre los grupos (control-infección) según una *t de Student*.

#### 5.2.8.2.5. Cortisol

El cortisol, a pesar que no fue significativo, resultó elevado globalmente, sobre todo en las primeras horas, reduciéndose después, y aumentaron otra vez al final del experimento donde mostraban mayor actividad.

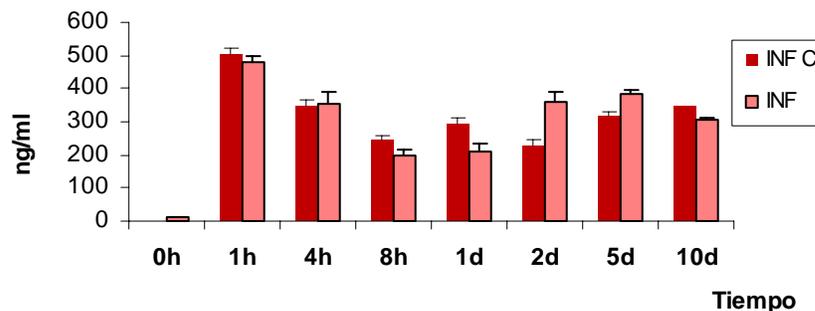


Figura 10. Comparación de la actividad del cortisol en el suero en peces sometidos a estrés por infección experimental (Inf) y los grupos control (InfC), a lo largo del tiempo (1H -10 días). En el ANOVA no se encontraron diferencias significativas, ( $p < 0,05$  \*). Media  $\pm$  error estándar  $n=4$ .

### 5.2.8. Discusión

El sistema inmune innato juega un papel instructivo en la respuesta inmune adquirida y la homeostasis. Funciona como primera línea de defensa del huésped y hace posible evitar los ataques microbianos inicialmente y mantenerlos bajo control hasta que una respuesta inmunitaria adquirida eficiente haya sido desarrollada (Saurabh, *et al.* 2008). Se ha demostrado que en los cultivos intensivos, una de las causas más comunes de muerte en los peces se relaciona con el manejo, lo que conlleva la aparición de enfermedades oportunistas (Davis, *et al.* 2002). Los resultados de este estudio permiten comparar dos tipos de estrés agudo: el manejo durante captura, y la infección experimental con LPS.

En la búsqueda de soluciones efectivas para determinar alteración del sistema inmunitario se han estudiado diversos parámetros como las proteínas de fase aguda (lisozima, ceruloplasmina y los anticuerpos naturales) por sus actividades relacionadas con la defensa, Además, estos parámetros intervienen en la limitación de la dispersión de agentes infecciosos, la reparación de daños en los tejidos, el ataque a los microbios y otros patógenos potenciales, y la restauración al estado saludable (Dautremepuits, *et al.* 2004).

En los peces, la lisozima ha sido frecuentemente utilizada como un indicador de la respuesta inmunológica inespecífica, de vital importancia en la lucha contra infecciones en los peces. Es una enzima con propiedades antibióticas liberada por los leucocitos con actividad más potente y generalizada que en los mamíferos (Demers, *et al.* 1997). En todos los vertebrados superiores, la lisozima está involucrada en un amplio grupo de mecanismos de defensa, que abarcan acciones tales como la bacteriolisis, la opsonización y en definitiva la potenciación de la respuesta inmune. Sin embargo, sus actividades antivirales y antineoplásicas son limitadas (Saurabh, *et al.* 2008). Actúa principalmente en el riñón anterior, rico en leucocitos y en otros lugares como las branquias, la piel y el tracto gastrointestinal (Murray, *et al.* 1976; Lie, *et al.* 1989). Actúa rompiendo los enlaces  $\beta$  de el ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina componentes de las capas de peptidoglicanos de las membranas celulares de las bacterias Gram-positivas. Sin embargo, las bacterias Gram-negativas no son directamente afectadas por la lisozima (Saurabh, *et al.* 2008). La lisozima de peces de agua dulce muestra un pH óptimo de 5.4 y requiere una concentración baja de amortiguación para su actividad, mientras que la lisozima de los peces marinos necesita un pH óptimo entre 6,2 y 9,2 a una osmolaridad relativamente alta (Sankaran, *et al.* 1972). Además de ser importante en la resistencia a infecciones es también utilizada como indicador de respuesta al estrés (Saurabh, *et al.* 2008). Se ha visto que la trucha arco iris expuesta a un factor estresante agudo aumenta significativamente la actividad de la lisozima en plasma cuando se compara con los controles (Mock, *et al.* 1990; Demers, *et al.* 1997).

Los resultados de este estudio muestran que la bacteriolisis se muestra significativamente afectada por el estrés. Estos resultados concuerdan con los encontrados en la dorada *S. aurata* (Sunyer, *et al.* 1995) en los que también se observa una alterada acción bactericida cuando el estrés se produce por manipulación y captura. Así pues, el estrés afectaría la respuesta bactericida del plasma de los peces. Los resultados muestran unas oscilaciones importantes pero

no se observa un patrón claro, lo que indicaría que la infección realizada supone un reto significativo respecto a este indicador en las condiciones de este experimento pero con una amplia variabilidad.

La lisozima presenta una reducción muy importante en los peces sometidos a estrés por manipulación y de hecho se registra un descenso de entre un 20-40% en todos los tiempos. Parece pues, que igual que la actividad bactericida, la lisozima queda comprometida por el estrés aplicado. En este sentido esos dos indicadores serían suficientemente sensibles al estrés y serían buenos indicadores. Respecto a la infección, los resultados indican que la infección sí afectaría la respuesta de lisozima mientras que los controles mantienen su actividad. Ello es así en todos los puntos excepto los dos primeros tiempos en que los controles también están en niveles bajos, probablemente debido a los efectos de la inyección de vehículo que significaría un estrés. Estos resultados concuerdan con los resultados en el salmón boquinegro *Oncorhynchus tshawytscha* (Maule, *et al.* 1989).

Recientes investigaciones sobre la actividad bactericida del complemento han confirmado que este es uno de los principales mecanismos para luchar contra las bacterias en los teleósteos (Ellis, *et al.* 2001). La actividad por la vía alternativa, que es independiente de los anticuerpos, puede ser directamente activada por el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram-negativas, y puede resultar en la lisis de las células bacterianas (Sunyer, *et al.* 1995; Boshra, *et al.* 2006)

Se ha establecido en trabajos anteriores que el sistema inmune de los peces puede ser deprimido por varias condiciones de estrés agudo como el hacinamiento en la dorada *S. aurata* (Ortuño, *et al.* 2001) y la hipoxia en la carpa *C. carpio* (Yin, *et al.* 1995). Se aprecia un efecto inmunosupresor en la actividad del complemento alternativo y en otras respuestas inmunitarias no específicas en el suero de la dorada sometida a estrés por hacinamiento (Montero, *et al.* 1999; Ortuño, *et al.* 2001). Dado pues, que el complemento es regulado a la baja en muchas situaciones de estrés, se ha propuesto que esta actividad puede ser un buen indicador de la inmunocompetencia de los peces (Tort, *et al.* 1996), especialmente en animales bajo condiciones tales como la manipulación, transporte y tratamiento con anestesia, etc. (Sunyer, *et al.* 1995; Ortuño, *et al.* 2002). Se ha establecido también que las estaciones pueden tener un efecto en la actividad del complemento en el suero de la dorada, registrándose descensos en los meses más fríos (enero), y el nivel más alto en el inicio del otoño cuando las temperaturas del agua llegan a los valores máximos (Hernández, *et al.* 2003). Por el contrario otro estudio muestra los títulos más elevados de los ACP en invierno en la tenca (*Tinca tinca*) (Boshra, *et al.* 2006)

En este estudio, la actividad del complemento se muestra afectada por el estrés generado mediante manipulación e infección como en anteriores trabajos en dorada *S. aurata* (Sunyer, *et al.* 1995). Se han visto resultados similares también en el pargo común *Pagrus pagrus* (Rotllant, *et al.* 1997). Sin embargo en el presente trabajo se encuentran pocas diferencias significativas entre los grupos a partir de la *t* de Student sobre los dos tratamientos. Solo se registran diferencias significativas a los 5 días en los grupos estresados, lo que concuerda con otro trabajo en dorada (Sunyer *et al.* 1996). En peces infectados parece que solo se

registran cambios a las 4 horas, lo que parece indicar que el nivel de infección en presente trabajo parece ser insuficiente para disparar significativamente la respuesta de complemento. Así pues, si bien parece evidente la disminución de los niveles de la actividad del complemento cuando los peces son sometidos a diversas condiciones de estrés, queda por determinar qué vías y componentes específicos son los más afectados, al igual que en trabajos precedentes (Boshra, *et al.* 2006).

La osmolalidad como indicador muestra pocos cambios a las condiciones de estrés agudo en este estudio y estos resultados se asemejan a los encontrados en la perca europea *Perca fluviatilis* donde no se detectaron cambios significativos (Acerete, *et al.* 2004).

La energía ahorrada podría derivarse a procesos fisiológicos, como el crecimiento. Así, la relación entre la salinidad del medio ambiente y el crecimiento se ha estudiado en diferentes especies eurihalinas, pero la salinidad óptima para obtener el mejor crecimiento depende de diferentes factores ambientales y endógenos, tales como salinidad, temperatura, calidad del agua o la edad (Laiz-Carrión, *et al.* 2005). La dorada *S. aurata* posee un sistema osmoregulatorio con gran capacidad para afrontar los cambios extremos de salinidad del medio ambiente y para adaptarse a diferentes ambientes de salinidad (Arends, *et al.* 1999). Es bien conocido el efecto negativo en el crecimiento de los peces sometidos a condiciones de estrés (Pickering, *et al.* 1993 y Wendelaar Bonga, *et al.* 1997), por ejemplo por los cambios en la salinidad (Morgan, *et al.* 1998).

Se cree que el cortisol tiene una función protectora en la adaptación al estrés osmótico. El cortisol junto con otras hormonas osmoregulatorias juega un papel clave en la adaptación al agua de mar en las especies eurihalinas, activando los iones y los mecanismos osmoregulatorios que conducen a una eficiente homeostasis de los electrolitos (Laiz-Carrión, *et al.* 2005). El cortisol aumenta la gluconeogénesis movilizándolo el metabolismo de la glucosa, resultando en la elevación de los niveles de glucosa circulante (Mommensen, *et al.* 1999)

El cortisol mostró un incremento en la primera hora después de producir el estrés, disminuyendo paulatinamente para luego aumentar de nuevo. Este incremento inicial se puede deber fundamentalmente a la manipulación de la inyección (del patógeno o del vehículo en el control). En ambos casos dicha manipulación es capaz de subir los niveles de la hormona. Similares resultados se han visto en los estudios en el pargo común *Pagrus pagrus* (Arends, *et al.* 1999; Rotllant, *et al.* 1997). Similares resultados se encuentran también en la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Pickering, *et al.* 1991), en la trucha de lago *Salvelinus namaycush* (Barry, *et al.* 1993), en la perca europea *Perca fluviatilis* (Acerete, *et al.* 2004) y también en el salmón boquinegro *Oncorhynchus tshawytscha* (Maule, *et al.* 1989). Conviene observar también que los controles incrementan los niveles de cortisol a las 8h, 1 día, 2 días y 5 días. Dado que el cortisol es un buen indicador de estrés parecería que estos peces han estado también sometidos a algún tipo de factor estresante. Probablemente ello puede ser debido a la manipulación efectuada en los tanques y especialmente en el muestreo. En efecto, si se hace en más de 5-7 minutos, la manipulación necesaria para extraer la sangre implicará subidas de la secreción de cortisol, lo

que se registra en los niveles plasmáticos de sangre. Así, los muestreos se deben hacer con rapidez i por gente experimentada.

### **5.2.9. Conclusión**

En nuestro estudio la conclusión que se puede extraer es que los peces se ven afectados de manera muy significativa por las condiciones experimentales del estrés agudo cuando se comparan con los valores de los grupos control Existen diferencias estadísticamente significativas en el estrés agudo por manipulación y captura, para los indicadores lisozima, bacteriolisis, complemento, osmolalidad y cortisol. Ello implica que los peces son sensibles al estrés por manipulación y no se descarta que el proceso de muestreo pueda influir a menudo, a juzgar por los resultados de cortisol incluso en los grupos control.

En cuanto al estrés por infección se encontraron también diferencias significativas en las actividades de la lisozima, pocas en el complemento, significativas en bacteriolisis y no significativas en osmolalidad o cortisol. Estos resultados parecen indicar que el tipo de infección realizado no significó un reto inmunitario importante para estos peces, ya que sus principales respuestas inmunitarias solo respondieron a un nivel discreto. En cuanto al tiempo, la evolución global es diferente para cada indicador en cada grupo (control o experimental) lo que depende probablemente de los mecanismos implicados en la generación de la respuesta de cada indicador.

## **6. CAPÍTULO 2: LOS INMUNOESTIMULANTES EN ACUICULTURA**

### **6.1. Introducción**

Los sistemas de acuicultura intensiva han creado un medio ambiente potencialmente estresante para los peces, por ejemplo, en la alta densidad poblacional, en las manipulaciones habituales, en el transporte, etc., pudiendo producir estados inmunosupresivos. El desarrollo de nuevos productos para enriquecer y suplementar las dietas acuícolas ha promovido el ensayo con productos que en un principio fueron elaborados para otras especies, como las aves de corral, los cerdos y el ganado vacuno, demostrándose que mejoran la función intestinal incrementando el tamaño de las microvellosidades intestinales, así como, su uniformidad e integridad. Con ello se potencia el crecimiento y la salud (Dimitroglou, *et al.* 2009).

Al mismo tiempo, la incorporación de inmunostimulantes en la dieta que aumenten la respuesta inmune innata y adaptativa son considerados como un elemento prometedor junto con los procedimientos de vacunación o la selección reproductiva y convirtiéndose en una de las principales estrategias para la prevención de enfermedades. Recientes estudios indican que el sistema inmune de los peces en estados inmunosupresivos causados por muchos patógenos puede activarse con inmunostimulantes y revertir los efectos deletéreos mediados por el estrés (Sakai, *et al.* 1999; Anderson, *et al.* 1992; Ortuño, *et al.* 2003).

El sistema inmune innato ha evolucionado para responder a unos patrones moleculares únicos que se encuentran en la superficie de los microorganismos. Muchos de estos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS) son oligosacáridos complejos que contienen numerosas unidades de manosa o residuos de glucosa. La mayoría de los organismos superiores, incluidos los vegetales, los invertebrados, los mamíferos y los peces teleósteos expresan receptores de lectina asociados a las células del sistema inmune innato que se reconocen y se unen a oligosacáridos ricos en manosa y glucosa (Kudrenko, *et al.* 2009).

Los inmunostimulantes son extractos biológicos o productos químicos sintéticos que estimulan la respuesta inmune potenciando la función fagocítica en las células e incrementando su actividad bactericida específico o no específico de las células citotóxicas y la producción de anticuerpos (Sakai, *et al.* 1999). Se conocen diferentes sustancias que actúan como inmunostimulantes pero solo algunas son apropiadas para la acuicultura (Robertsen, *et al.* 1990). A pesar de ello, el uso de algunos inmunostimulantes está siendo una práctica habitual en el sector acuícola, con el objetivo de incrementar la supervivencia y preparar a los peces frente a situaciones críticas como transporte, cambios de temperatura, manipulación periódica, problemas patológicos o cualquier otra situación estresante.

Estos inmunoestimulantes son principalmente derivados de extractos celulares de microorganismos comercialmente disponibles, como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Couso, *et al.* 2003; Kogan, *et al.* 2007; Waldroup, *et al.* 2003), levaduras modificadas o hidrolizadas con altos contenidos en oligosacáridos y nucleótidos. Los oligosacáridos, especialmente los Manano Oligosacáridos (MO) actúan como inhibidores de la unión de patógenos a las células epiteliales del intestino (Montero, *et al.* 2005). La aplicación reciente de estos compuestos en el sector de la cría de animales es prometedora, con la idea de ayudar a la supresión de patógenos entéricos y en la modulación de la respuesta inmune de pollos y pavos (Waldroup, *et al.* 2003).

Los inmunoestimulantes más estudiados y que mejoran la respuesta inmune en los peces son los  $\beta$ -glucanos (Chen, *et al.* 1992; Figueras, *et al.* 1998). Constituyen una de las más importantes estructuras de polisacáridos que componen la pared celular de bacterias, hongos y plantas (Robertsen, *et al.* 1990). Estos compuestos son unidades de glucosa unidas por enlaces glicosídicos del tipo  $\beta$ -1,3 o  $\beta$ -1,6 (glucopiranosil) (Engstad, *et al.* 1994). Estimulan la actividad de la lisozima, del complemento (Ortuño, *et al.* 2001; Engstad, *et al.* 1993) y la acción fagocítica de los macrófagos (Robertsen, *et al.* 1990; Jorgensen, *et al.* 1993; Galeotti, *et al.* 1998).

El más potente inmunoestimulador conocido es el 1,3- $\beta$  glucano (Kumari, *et al.* 2006) que mejora la respuesta no-específica (Sahoo, *et al.* 2002) y la resistencia contra las infecciones bacterianas y virales utilizándose para prevenir y reducir la mortalidad de los animales (Couso, *et al.* 2003). Para tales efectos se prefiere la administración vía oral que es la más apropiada (Sakai *et al.* 1999; Siwicki, *et al.* 1994). De todos modos, la respuesta dependerá del tipo de glucano (Ai, *et al.* 2007), la dosis suministrada, la vía de administración, del régimen de alimentación, y de la asociación con otros inmunoestimulantes (Bagni, *et al.* 2005).

El efecto adyuvante de los  $\beta$ -glucanos de la levadura se ha demostrado en peces como el Salmón Atlántico *Salmo salar* (Sahoo, *et al.* 2001), en el gato de río (Siwicki, *et al.* 1994) y en la trucha arco iris *O. mykiss* (Anderson, *et al.* 1994; Yoshida, *et al.* 1995; Ainsworth, *et al.* 1994). No obstante, en este dos últimos la administración oral prolongada de péptido-glucanos disminuye la respuesta inmune cuando se expone al *Vibrio anguillarum* (Matsuo, *et al.* 1993); sugiriendo un efecto de retroalimentación negativa de los  $\beta$ -glucanos (Robertsen, *et al.* 1990).

En combinación con la vitamina C, los  $\beta$ -glucanos modulan la respuesta inmune incrementando los anticuerpos secretados en el suero por las células plasmáticas frente a la *Edwardsiella ictaluri* en el gato de río y contra la *Yersinia ruckeri* en la trucha arco iris (Verlhac, *et al.* 1996; Jeney, *et al.* 1997). En otras investigaciones se ha visto que la administración conjunta en la dieta de lactoferrina, 1-3 $\beta$  glucano, levamisol y vitamina C aumentan la resistencia en especies de peces de agua dulce y marina para enfermedades bacterianas como la *Aeromonas* sp, *Vibrio* sp, *Edwardsiella*, *Yersenia ruckeri* y *Ichthyophthirius multifiliis* (Kumari, *et al.* 2005; Sakai, *et al.* 1999; Mulero, *et al.* 1998b; Sahoo, *et al.* 2002; Sahoo, *et al.* 2001; Kumari, *et al.* 2006). También incrementan la protección en condiciones

inmunocomprometidas o de estrés (Kumari, *et al.* 2006). En la lubina *Dicentrarchus labrax* se ha encontrado un aumento en la actividad fagocítica con dietas suplementadas con levamisol y  $\beta$ -glucanos (Jeney, *et al.* 1997). La actividad del complemento y de la lisozima mejora en lubinas alimentadas con dietas suplementadas con  $\beta$ -glucanos de levaduras, Vitamina C y E (Bagni, *et al.* 2000; Peddie, *et al.* 2002; Dalmo, *et al.* 1995; Fujiki, *et al.* 1997).

En el caso de la respuesta específica, los  $\beta$ -glucanos pueden actuar como moduladores incrementando los anticuerpos secretados por las células plasmáticas (Sakai, *et al.* 1999). La estimulación del sistema inmune específico por la administración de glucanos en la dieta del rodaballo *Scophthalmus maximus* (de Baulny, *et al.* 1996) y la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Verlhac, *et al.* 1998) podría estimular indirectamente el proceso de activación de los linfocitos. Sobre todo los  $\beta$ -glucanos podrían mejorar la resistencia al ataque bacteriano en los espáridos (Cook, *et al.* 2001).

Otros inmunoestimulantes importantes son los probióticos, que se utilizan como aditivos en el agua o como suplemento alimenticio (Moriarty, *et al.* 1998; Skjermo, *et al.* 2006). Algunas aplicaciones de los probióticos han demostrado ser beneficiosas para el crecimiento, la supervivencia y la salud del hospedador (Moriarty, *et al.* 1998; Skjermo, *et al.* 2006). Estudios previos han demostrado que los probióticos son eficaces para su uso en el cultivo del langostino occidental juvenil *Penaeus latisulcatus* (Van Hai, *et al.* 2009). Las bacterias vivas de los probióticos y los prebióticos pueden actuar como inmunoestimulantes (Galeotti, *et al.* 1998) con capacidad de modular la inmunidad e impulsar sus efectos (Reid, *et al.* 2006). Actúan en tratamientos alternativos a los antibióticos y a los productos químicos desempeñando el papel de alarma para activar las moléculas del sistema inmune (López, *et al.* 2003).

La presencia de bacterias como la *Aeromonas Hydrophila* está asociada al estrés por la patogenicidad en peces de agua templada, como la carpa *Cyprinus carpio*, el gato de río *Ictalurus punctatus* y también en los salmónidos, produciéndoles lesiones superficiales con hemorragia local y septicemia (Yin, *et al.* 1996). A pesar de que se han probado algunas vacunas efectivas en la carpa y en el gato de río (Yin, *et al.* 1996; Nayak, *et al.* 2004), no se dispone de vacunas comerciales para la gran diversidad de patógenos que causan infecciones. Adicionalmente, no pueden utilizarse si el sistema inmune adquirido no ha madurado lo suficiente, como sucede en el estado larvario o de alevin. Las especies marinas durante los 2-3 meses del período larvario y juvenil dependen solo del sistema inmune innato para resistir a las infecciones (Magnadóttir, *et al.* 2006). Por ello los inmunoestimulantes pueden ser elementos importantes para prevenir esta patogenicidad. Una posible estrategia sostenible consiste en optimizar la inmunidad natural de un animal por medio de la nutrición (Coop, *et al.* 1995); es decir, la inmunonutrición podría controlar la resistencia a los patógenos en los sistemas de producción convencional y orgánica del ganado (Coop, *et al.* 1999), mejorando así la inmunocompetencia a través de la dieta (Muturi, *et al.* 2005).

## **6.2. Experimento 2**

### **INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE UN INMUNO-ESTIMULADOR TIPO MANANO OLIGOSACÁRIDOS (MOS) EN LA DIETA DE LUBINAS JUVENILES (*Dicentrarchus labrax*)**

#### **6.2.1. Objetivo**

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto del manano oligosacárido en la dieta de lubinas juveniles *Dicentrarchus labrax*, sus implicaciones en ciertos parámetros inmunes y la resistencia a las infecciones.

*Esta investigación se realizó gracias a la colaboración entre los grupos de investigación de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), Departamento de Biología celular, Fisiología e Inmunología y del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM), Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA). El mantenimiento de los peces y el muestreo se realizaron en las instalaciones del ICCM; los análisis de las muestras de los parámetros inmunes se realizaron en la UAB.*

*Los resultados que se exponen en este capítulo son parte de un estudio que pertenece a la tesis doctoral de Silvia Torrecillas Burriel y han sido publicados en 2007 por la citada autora, con la siguiente referencia: Torrecillas, et al. (2007) Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. Fish & Shellfish immunology 23, 969-981*

#### **6.2.2. Materiales y métodos**

##### **6.2.2.1. Dietas**

Se diseñaron tres dietas isonitrógenas e isoenergéticas, con una fórmula comercial que contenía Manano oligosacáridos (MO). Las raciones utilizadas para formular las porciones guardaban las siguientes proporciones: 0‰ para el control, 2‰ denominado como MOS-2, y finalmente del 4‰ como MOS-4, suplementados con un producto comercial reemplazando los carbohidratos estándar. Las dietas cumplen con los exigencias nutricionales para las lubinas y fueron fabricadas en los Graneros de Tenerife, España.

##### **6.2.2.3. Animales experimentales**

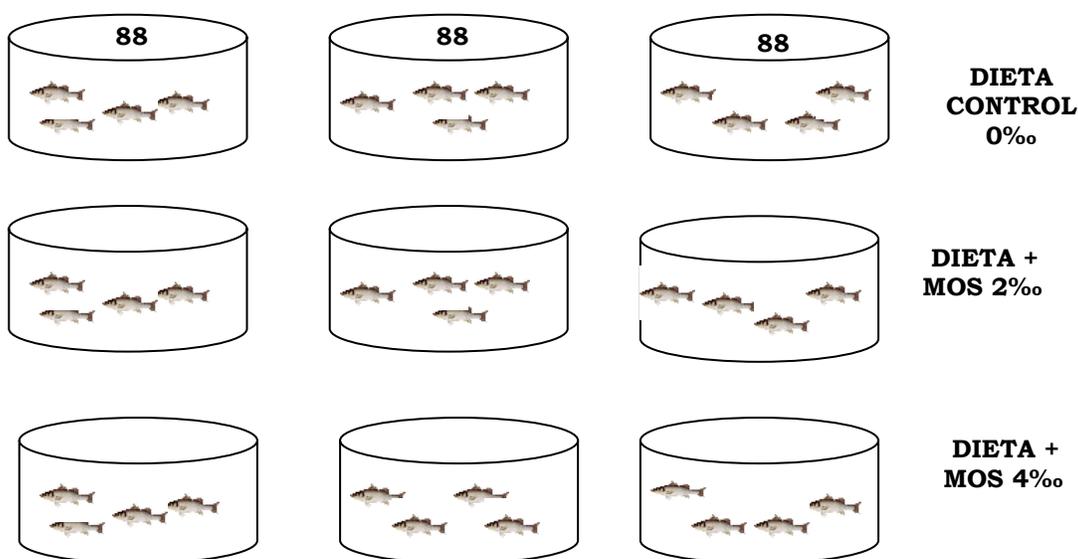
800 lubinas juveniles *Dicentrarchus labrax* procedentes de (San Bartolomé de Tirajana, Islas Canarias, España) en buen estado sanitario, ingresan en el Instituto Canario de Ciencia Marina (ICCM). Durante 3 semanas se alimentaron *ad libitum* con una dieta comercial (19 – 20.5°C). Después del período de

aclimatización se adaptaron a las condiciones ambientales (3Kg/m<sup>2</sup> de densidad media).

#### 6.2.2.4. Diseño experimental

Se distribuyeron aleatoriamente 792 peces en 9 tanques cilíndricos cónicos de fibra de vidrio con 1000l de capacidad, para una densidad media de 3 Kg/m<sup>3</sup> (88 peces por tanque). Los tanques de agua marina filtrada (1.39 l/min) estaban a una temperatura de 20.5 – 23.4°C y fotoperíodo de 12h luz día/12h luz noche. El Oxígeno disuelto fue mantenido a 8.0 ±0.2 ppm. Los peces fueron alimentados *ad libitum* con una de las tres dietas experimentales durante 9 semanas (3 veces al día, 6 días a la semana). Cada dieta fue ensayada por triplicado.

El primer muestreo se realizó con 9 peces por tanque y 15 peces por tanque en el día 67. Las muestras de sangre fueron tomadas de 15 peces para recoger el plasma y el suero del día 67 para determinar la actividad lisozímica y del complemento ACP.



• 792 lubinas  colocadas aleatoriamente en 9 tanques de 1000 l, después de su aclimatación son alimentados *ad libitum* durante 9 sem. 3/día 6/sem.

• 88 lubinas  por Tanque

• Muestreo inicial 9 peces

• El día 67, 15 lubinas por tanque son sacrificados

#### 6.2.3. Preparación de muestras y recogida de sangre

Los peces son capturados con un salabre y se realiza una punción en la zona ventral del pedunculo caudal con una jeringa de 1 ml. y el tiempo de manipulación fue menor a 1 minuto para minimizar los efectos del estrés. Con la sangre venosa se efectua el análisis de los parámetros inmunológicos. Las alícuotas se dividieron en dos porciones transfiriéndose a los tubos Eppendorfs permitiéndose así la coagulación a las 2 horas. El suero se separó por centrifugación y se guardó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para las pruebas del complemento vía alternativa (ACP) y determinar la actividad de la lisozima.

#### **6.2.3.1. Técnicas analíticas**

La actividad de la lisozima se determina por el método turbidimétrico, que utiliza la lisis del *Micrococcus luteus* para la determinación de la actividad enzimática (Rotllant, *et al.* 1997) utilizando la lisozima de clara de huevo como estándar. Los resultados son presentados como lisozima/ml.

Actividad de la vía alternativa del complemento. La importancia de este indicador se debe a que en los peces, la actividad del complemento es unas 10 veces más potente que en los mamíferos. Para lo cual, se mezcla el suero del pez con sangre fresca de conejo o cordero produciéndose la lisis de las células sanguíneas ocasionado por el suero. El 50% de la lisis de las células sanguíneas del conejo o cordero ocasionado por el suero se denominada como ACH50. La determinación de la actividad del complemento se realiza siguiendo la técnica descrita por Sunyer (Sunyer, *et al.* 1995).

En la bacteriolisis, se inoculó una colonia de *E. Coli* en medio LB, y se dejó crecer toda la noche. Al día siguiente, se colocó una muestra de la bacteria en el suero en dilución (1:2) y se midió la absorbancia por espectrofotometría, indicando la capacidad bactericida del suero, inhibiendo su crecimiento.

#### **6.2.3.2. Análisis estadístico**

Los experimentos se hicieron por triplicado. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la evolución de las dietas y la manera en que afectan los parámetros inmunes. Se efectuó una ANOVA con factor anidado, donde la dieta es un factor anidado dentro del factor tanque. Se considera estadísticamente significativa (y indicado en las figuras con asteriscos \*) cuando,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*). Los valores fueron representados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (*Mean*  $\pm$  *S.E.M.*); cuando la ANOVA resultó significativa se ejecutó un análisis adicional para conocer los grupos ( $n=5$ ) en que aparecían significaciones con un *Post-hoc* con la prueba de Scheffé.

#### **6.2.4. Resultados**

Durante el período experimental, no se registró mortalidad relacionada con la dieta. En cuanto a los parámetros inmunes medidos durante la experimentación, la actividad bacteriolítica, lisozímica y del complemento ACH50, no se vieron

afectados por el tratamiento al inicio del ensayo; sin embargo estos indicadores, si fueron sensibles durante el experimento.

La figura 1 muestra que la actividad de la lisozima no se vio afectada entre las dietas suplementadas con los Manano oligosacáridos, y tampoco respecto al control y las 2 concentraciones de Manano oligosacáridos.

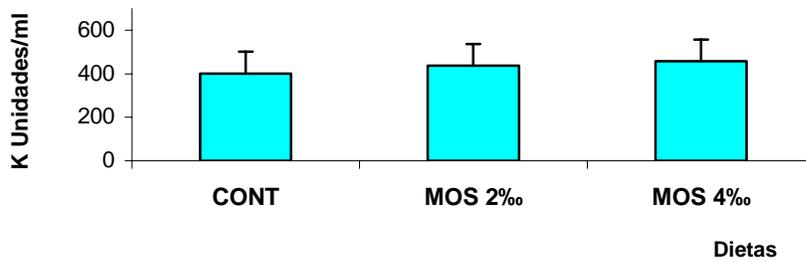


Figura 1. La actividad de la lisozima (en K unidades/ml) según las dietas control o suplementadas con MOS. El ANOVA no mostro diferencias significativas (\*)  $p < 0,05$ . Media  $\pm$  error estándar  $n=5$ .

La actividad del complemento indicó cierto incremento en proporción al porcentaje de los Manano oligosacárido; sin embargo, no se observaron diferencias importantes cuando se compararon las 3 dietas; la dieta con Manano oligosacáridos 4‰ mostró un mejor resultado cuando se compararon los promedios durante todo el período experimental. No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

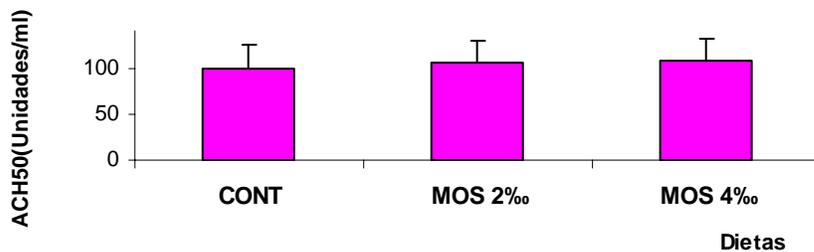


Figura 2. La actividad del complemento en unidades (ACH50/ml) según las dietas control o suplementadas con MOS. El ANOVA no mostró diferencias significativas (\*\*)  $p < 0,01$ . Media y error estándar  $n=5$ . En el Posthoc *Scheffé* no se encontraron diferencias significativas (\*)  $p < 0,05$ .

La bacteriolisis reveló una clara tendencia a incrementar su actividad a medida que la dieta tiene mayor porcentaje de Manano oligosacáridos suplementado. Los resultados son similares a los encontrados en las dos anteriores técnicas; sin embargo las diferencias no fueron significativas.

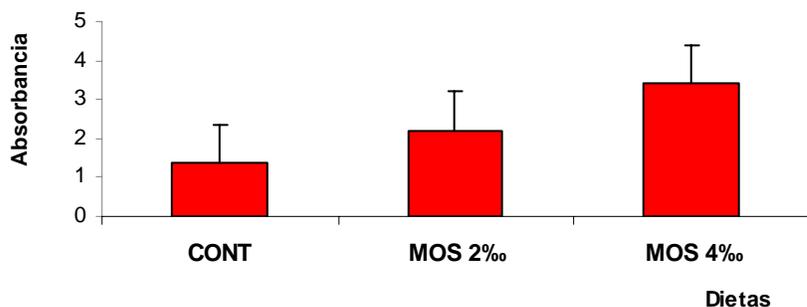


Figura 3. La actividad bacteriolítica según las dietas control o suplementadas con MOS. El ANOVA no muestra diferencias significativas (\*)  $p < 0,05$ . Media y error estándar  $n=5$ .

## 6.2. Experimento 3

### INFLUENCIA DEL INMUNO-ESTIMULADOR GLUCANO-MANANO EN LA DIETA DE DORADAS JUVENILES *Sparus aurata*

#### 6.2.1. Objetivo

El objetivo de este estudio es evaluar los efectos de un inmunoestimulador suplementado en la dieta de doradas juveniles *Sparus aurata* y en algunos de sus parámetros inmunes. Este inmunoestimulante es una variedad de  $\beta$ -glucanos o mananos, como se han descrito en la introducción.

#### 6.2.2. Materiales y métodos

##### 6.2.2.1. Dietas

Los 6 dietas o tratamientos (A-F), fueron extrusionadas adicionadas con el inmunoestimulador glucano-manano G1M1. Las dietas fueron manufacturadas localmente y basadas en dietas comerciales de INVE Technologies (Bélgica). El inmunoestimulante tenía una composición a base de glucanos, mananos o mixta añadidos a la dieta comercial de dorada. Los grupos eran los siguientes:

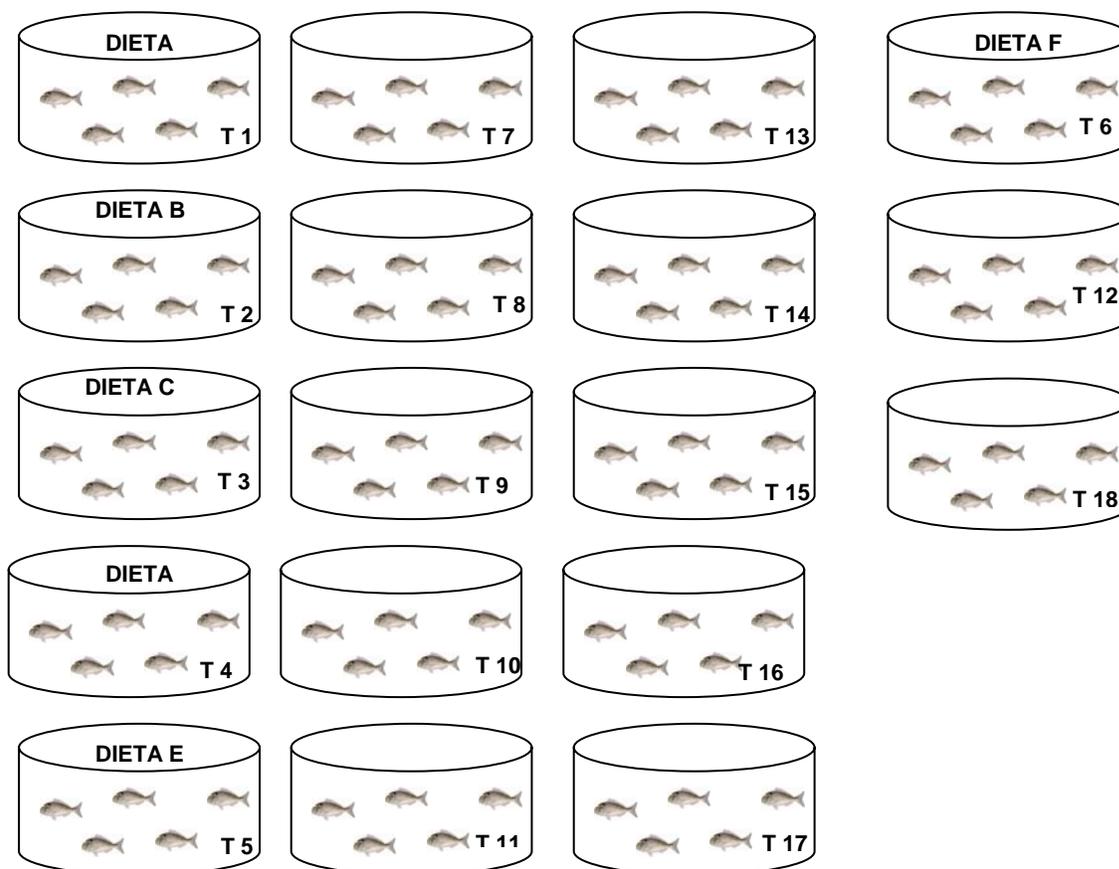
- A: Dieta comercial
- B: Dieta comercial + 2,5% Glucano
- C: Dieta comercial + 5% Glucano
- D: Dieta comercial + 2,5% Manano
- E: Dieta comercial + 5% Manano
- F: Dieta comercial + 2,5% Glucano + 2,5% Manano

##### 6.2.2.2. Animales experimentales

750 doradas juveniles *Sparus aurata* de unos 60 g. de peso de una población aparentemente libre de enfermedades, fueron mantenidas en tanques y alimentadas durante 8 semanas con una dieta extrusionada comercial, a temperatura de 18.5– 19.5°C, hasta que se adaptaron a las condiciones ambientales (4,5Kg/m<sup>3</sup> de densidad media).

### 6.2.2.3. Diseño experimental

Las doradas juveniles fueron distribuidas aleatoriamente en 18 tanques cilíndricos cónicos de fibra de vidrio (6 tratamientos por triplicado, 9 peces por tratamiento) con 1000l de capacidad, para una densidad media de 4,5 Kg/m<sup>3</sup> (40 peces por tanque). El peso inicial promedio fue de 60g ± SD. Los tanques fueron filtrados con agua marina (1.39 l/min) a temperatura de 18.5 – 19,5°C y fotoperíodo (12h luz día/12h luz noche). El Oxígeno disuelto fue mantenido a 8.0 ± 0.2 ppm. Los peces fueron alimentados con comederos automáticos *ad libitum* con 6 dietas experimentales por 9 semanas (3 veces al día, 6 días a la semana). Cada dieta fue ensayada por triplicado.



La primera dieta tratamiento A: le corresponden los tanques 1, 7, 13 (Dietas comerciales control)

El tratamiento B: Tanques 2,8,14	: Dieta comercial + 2,5% Glucano
El tratamiento C: Tanques 3,9,15	: Dieta comercial + 5% Glucano
El tratamiento D: Tanques 4,10,16	: Dieta comercial + 2,5% Manano
El tratamiento E: Tanques 5,11,17	: Dieta comercial + 5% Manano
El tratamiento F: Tanques 6,12,18	: Dieta comercial + 2,5% Glucano + 2,5% Manano

720 peces comenzaron el ensayo y 9 peces por tanque el día 67 fueron muestreados rápidamente. El suero del día 67 se utiliza para determinar la actividad lisozímica y del complemento ACP.

#### 6.2.4.4. Análisis estadístico

Los experimentos se hicieron por triplicado. Un análisis de varianza (ANOVA) fue realizado para evaluar la evolución de las dietas y la manera en se vieron afectados los parámetros inmunes. Se efectuó una ANOVA con factor anidado; la dieta fue un factor anidado dentro del tanque. Se consideró estadísticamente significativa cuando  $p < 0,05$  indicándose en las figuras con un asterisco (\*). Los valores  $n=9$  (3 peces por cada uno de los 3 tanques) fueron representados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (*Mean  $\pm$  S.E.M.*); cuando la ANOVA resultó significativa un análisis adicional fue hecho, para conocer los grupos en que aparecían significaciones con un *Post-hoc* prueba de Scheffé.

### 6.3. Resultados

Durante los tratamientos experimentales no se registró mortalidad. Los parámetros inmunes se vieron afectados por los tratamientos. Cuando se compara el control con las otras dietas, se observó una actividad de la lisozima, similar a la dieta control en los tratamiento B y F, mientras que dicha actividad fue más baja en el resto. Sin embargo, se mostraron tendencias a cambios, aunque no fueron estadísticamente significativos.

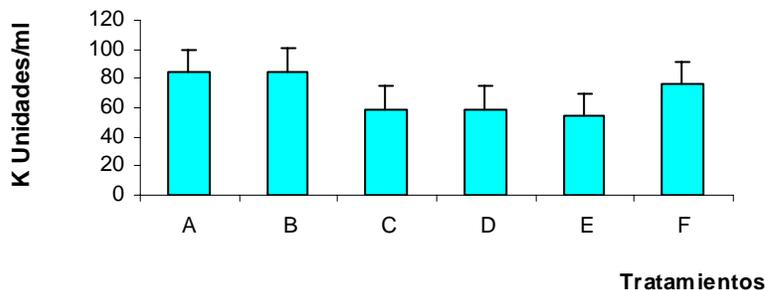


Figura 4. La actividad de la lisozima (en K unidades/ml) según las dietas control (A) suplementadas con los tratamientos (GLU, MOS, GLU/MOS) en diferentes concentraciones. El ANOVA no muestra diferencias significativas (\*)  $p < 0,05$ . Media y error estándar  $n=3$ .

En cuanto al complemento fue mayor su actividad en los tratamientos C y F, comparada con el control. Además, cuando comparamos todos los tratamientos sólo se encontraron diferencias significativas (\*) en el tratamiento C.

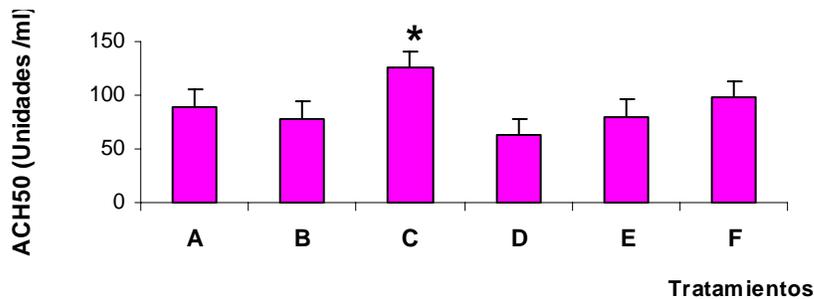


Figura 5. La actividad del complemento en unidades (ACH50/ml) según las dietas control o suplementadas con GLU, Manano-oligosacáridos y GLU/MOS en diferentes concentraciones. El ANOVA muestra una diferencia significativa (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Media y error estándar  $n=3$ .

En la bacteriolisis no se observó una tendencia al incremento de la actividad entre los tratamientos. Sólo se muestra mayor actividad en el tratamiento C, a continuación del tratamiento B y D, a pesar de no encontrarse diferencias significativas.

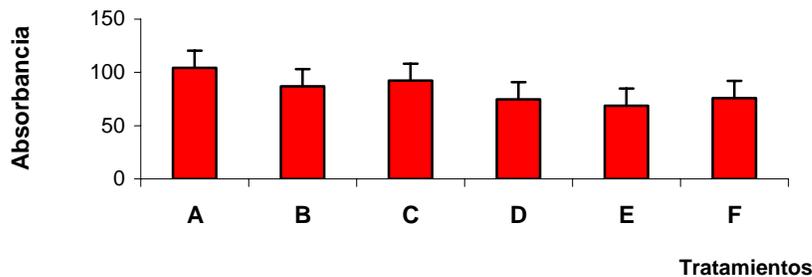


Figura 6. Actividad bacteriolítica según las dietas control o suplementadas con GLU, Manano-oligosacáridos y GLU/MOS en diferentes concentraciones. El ANOVA no muestra diferencias significativas (\*)  $p < 0,05$ . Media y error estándar  $n=3$ .

#### 6.4. Discusión

Los inmunoestimulantes ensayados tienen diferentes efectos en las dos especies marinas, los resultados muestran que con las distintas dietas suplementadas, las doradas juveniles *Sparus aurata* responden con mayor sensibilidad a los parámetros inmunes (bacteriolisis, lisozima y complemento), con porcentajes más altos de glucanos en comparación a los de Manano oligosacáridos (MOS). Por el contrario la lubina *Dicentrarchus labrax* muestra una mayor sensibilidad a los

porcentajes de Manano-oligosacáridos que a los glucanos. Estos resultados son comparables a los obtenidos por Montero (Montero, *et al.* 2005) en la lubina *Dicentrarchus labrax*, donde se observa un mejoramiento en el estatus inmune y la resistencia al estrés en peces alimentados con la mezcla de  $\beta$ -glucano y Manano-oligosacáridos durante 60 días.

Estudios realizados en lubinas juveniles *D. labrax* alimentadas con la dieta suplementada con Manano-oligosacáridos presentan un mayor crecimiento en general (Torrecillas, *et al.* 2007). Otros autores han visto en la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*, el gato de río *Ictalurus punctatus* y en la tilapia híbrida *Morone saxatilis* (Staykov, *et al.* 2007; Welker, *et al.* 2007; Genc, *et al.* 2007) efectos similares. Algunos autores interpretan este aumento en el crecimiento con un mayor funcionamiento de los enterocitos (Dimitroglou, *et al.* 2006; Torrecillas, *et al.* 2007). En la trucha arco iris tampoco se observaron efectos perjudiciales en el intestino por la utilización de los Manano-oligosacáridos en las dietas (Yilmaz, *et al.* 2007). Diversas investigaciones encuentran una correlación positiva entre las dietas suplementadas con Manano oligosacáridos y el incremento en la ingesta alimentaria en diversas especies como lubina (Torrecillas, *et al.* 2007) tilapia roja (Zhou, *et al.* 2004), carpa común (Zhou, *et al.* 2004) y en el pez gato (Welker, *et al.* 2007). Es más, utilizando los Manano-oligosacáridos como suplementación en las dietas de trucha arco iris se observa una mayor superficie de absorción promoviendo la prolongación de los plegamientos la mucosa. El autor observó por microscopía electrónica el aumento de superficie de absorción confirmando que los Manano-oligosacáridos son capaces de aumentar la densidad de microvellosidades y su longitud (Dimitroglou, *et al.* 2009). Otra justificación factible para este incremento en el crecimiento, a ciertas dosis, se relaciona con la mayor eficiencia de la digestión de las proteínas (Waché, *et al.* 2006). Sin embargo en la tilapia híbrida *Oreochromis niloticus x O. aureus* los resultados obtenidos con inmunoestimulantes como el Manano-oligosacáridos no muestran un aumento en el crecimiento (Genc, *et al.* 2007b).

Una explicación posible para los diferentes resultados tiene que ver con la especie de estudio y con los efectos de la concentración de proteínas corporales, las cuales pueden variar dependiendo de los prebióticos en la dieta (Genc, *et al.* 2007a; Genc, *et al.* 2007b; Torrecillas, *et al.* 2007). Además, se sabe que los efectos de los glucanos en el crecimiento pueden variar dependiendo de la especie, de la dosis, de la duración de la alimentación y de la temperatura del ambiente. De esta manera se explicaría la aparente contradicción entre los diversos resultados publicados (Djordjevic, *et al.* 2009).

En nuestro estudio, las lubinas mostraron una activación de la funcionalidad de la lisozima, que depende de la dosis suministrada del inmunoestimulante. Siendo el de mayor porcentaje y el más reactivo el tratamiento con Manano-oligosacáridos a  $4\text{g kg}^{-1}$ . Las doradas mostraron menor sensibilidad a la actividad lisozímica. Sin embargo, se ve mayor activación con las dietas ricas en glucano al  $2,5\text{g kg}^{-1}$  en comparación a la dieta de  $5\text{g kg}^{-1}$ . En investigaciones previas, se ha reportado que el sistema inmune no específico de la trucha arco iris *O. mykiss* fue afectado positivamente cuando la dieta se adicionó con Manano-oligosacáridos (Staykov, *et al.* 2007). En el gato de río africano *Clarias gariepinus* las dietas que contienen  $10\text{g kg}^{-1}$  MOS, incrementaron el número de neutrófilos

activados durante las primeras 2 semanas, disminuyendo luego hasta el nivel del control después de 45 días. La incorporación en la dieta de 4g kg<sup>-1</sup> de Manano-oligosacáridos en la lubina *D. labrax* activa el sistema inmune e incrementa su resistencia a la infección bacteriana por *Vibrio alginolyticus*, inoculada directamente en el intestino por ser uno de los principales sitios de infección en los peces (Torrecillas, *et al.* 2007).

En el gato de río africano *Clarias gariepinus* la actividad de la lisozima sérica es mayor en los peces alimentados con la dieta Manano-oligosacáridos durante 50 días en comparación con los controles. Por el contrario en salmones, estudios anteriores muestran que la actividad de la lisozima es menor o tiende a ser menor cuando las dietas contienen Manano-oligosacáridos en comparación con los alimentados con la dieta control (Grisdale-Helland, *et al.* 2008). De todos modos, algunos autores cuestionan la administración a largo plazo de inmunoestimulantes (Yoshida, *et al.* 1995).

Los resultados econtraos en las lubinas muestran una tendencia a incrementar la actividad del complemento por la vía alternativa a medida que se aumentan los niveles de Manano oligosacáridos en las dietas, lo que está de acuerdo con los resultados de Staykov (Staykov, *et al.* 2007) que encuentra altos niveles de actividad bactericida, lisozímica, del complemento por la vía alternativa y en los niveles de anticuerpos en la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* y en la carpa común *Cyprinus carpio* alimentados con manano oligosacáridos. Por lo tanto, los manano oligosacáridos podrían activar y facilitar el procesamiento de antígenos y utilizarse como estimuladores en etapas iniciales de la respuesta inmune (Sakai, *et al.* 1999), en la actividad del complemento y de la lisozima (Ortuño, *et al.* 2001; Engstad, *et al.* 1993; Thompson, *et al.* 1999; Grisdale-Helland, *et al.* 2008).

Con respecto a las doradas, estas mostraron una gran actividad del complemento que fue significativa para el glucano suministrado a 5g kg<sup>-1</sup>. Se ha visto también un aumento de la actividad del complemento en la tilapia híbrida *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*, la lubina *Dicentrarchus labrax*. En la lubina estriada híbrida *Morone chrysops* x *M. saxatilis* los glucanos proporcionados al 0,1% mejoran la resistencia a la infección por *Streptococcus iniae*, una enfermedad asociada al manejo a escala industrial (Li, *et al.* 2009). En general, la administración de glucanos en la dieta de los peces ha demostrado que aumenta los niveles de lisozima (de Baulny, *et al.* 1996 ; Li, *et al.* 2009).

Estudios anteriores han señalado que los β-glucanos son excelentes estimuladores de la actividad del estallido respiratorio de los fagocitos de la dorada *in vitro* (Siwicki, *et al.* 1994), lo que sugiere que pueden aumentar la resistencia contra *pasteurellosis* (Couso, *et al.* 2003). Sin embargo, la dosis efectiva y el período de administración debería ser investigado para cada caso, ya que son difíciles las comparaciones entre los estudios individuales. Por el contrario, *in vitro* se ha reportado que altas dosis de β-glucanos disminuyen el estallido respiratorio y causan agotamiento celular en el salmón atlántico *Salmo salar* (Engstad, *et al.* 1994). Parece ser que la dosis efectiva de glucanos se da en un reducido margen la lubina estriada híbrida *Morone Chrysops* x *Morone saxatilis*, en comparación con el salmón del Atlántico (Figueras, *et al.* 1998).

Los derivados de la levadura estudiados mejoran significativamente algunas de las respuestas inmunitarias innatas, mientras que la resistencia en otras especies como la corvina amarilla *Pseudosciaena crocea*, el gato de río asiático *Clarias batrachus* y el pargo *Pagrus auratus* no presentan estos cambios (Djordjevic, *et al.* 2009). Se ha demostrado también que los (1-3)  $\beta$ -glucanos estimulan el sistema inmunológico de los invertebrados, activando la cascada de la fenoloxidasa, mientras que en los mamíferos activan la cascada del complemento (Kudrenko, *et al.* 2009). Rice demostró que después de la administración oral, los glucanos solubles en agua se traslocan desde las células epiteliales intestinales al sistema circulatorio, lo que explicaría una mayor tasa de supervivencia en mamíferos, frente a las infecciones por *Staphylococcus aureus* o de *Candida albicans* (Rice, *et al.* 2005). Estos procesos, así como las interacciones con factores de inmunidad humoral y celular afectan a la migración y a la diferenciación de las células inmunes (Djordjevic, *et al.* 2009).

La administración de altas dosis de glucanos puede ser recomendable para mejorar la resistencia de los peces durante periodos cortos. Sin embargo, cuando se administran durante periodos más largos a dosis altas, los glucanos pueden tener efectos negativos en la resistencia de la dorada *S.aurata* (Couso, *et al.* 2003).

En este estudio la actividad bacteriolítica de las lubinas muestra poca sensibilidad; a pesar de ello aumenta su actividad proporcionalmente a la concentración de los MOS. En la dorada se observa también una mayor actividad bacteriolítica relacionada con el porcentaje de glucano y una actividad similar en las dietas suplementadas con los MOS. Se requieren más estudios para entender el papel de los Manano-oligosacáridos en la inmunomodulación de los peces, teniendo en cuenta que su adición en las dietas mejora las actividades bactericida, lisozimica y del complemento, considerándose una herramienta eficiente en las situaciones inmunosupresivas que son comunes en los peces de cultivo.

## **6.5. Conclusión**

Los resultados de este estudio muestran que la incorporación de inmunoestimuladores como suplemento en las dieta, tanto en las doradas juveniles *S. aurata* (glucanos al 5%) como en la lubina *D. labrax* suplementada con Manano-oligosacáridos al 4‰ podrían mejorar de forma general la actividad de los parámetros inmunes, aumentando el potencial del sistema inmune innato a infecciones oportunistas e incrementando la resistencia a las bacterias infecciosas residentes en el intestino. En cuanto a las diferencias entre especies, los resultados de estos dos experimentos indican que mientras en la lubina son los mananos los que potencian la activación del sistema inmune, en la dorada esta activación no se observa y sí, se registra una mayor actividad cuando se administran los glucanos. Otros experimentos deberán llevarse a cabo para aclarar los mecanismos de acción de los inmunoestimulantes manano-oligosacáridos, los glucanos y la mezcla de los manano oligosacáridos + Glucanos. Así como, el periodo óptimo de la alimentación y la administración de las dosis.

## 7. CAPITULO 3: NUEVAS TENDENCIAS EN NUTRICIÓN

### 7.1. Introducción

Los lípidos en la dieta son utilizados como componente estructural y como fuente de energía; además, son los precursores de los eicosanoides, que ayudan en la absorción de las vitaminas liposolubles necesarias para el desarrollo y el crecimiento normal (Diez, *et al.* 2007a). En años anteriores, los piensos acuícolas han aportado una importante cantidad de lípidos en su composición para asegurar un máximo de crecimiento. No obstante, han derivado en dietas hiperenergéticas con el 20% de lípidos (Tocher, *et al.* 2003), que en algunas especies traen como consecuencias un exceso en el almacenamiento de grasas en el tejido adiposo, efecto que no es deseable para la producción acuícola. Estudios recientes muestran variaciones histológicas debidas a la acumulación lipídica en diversos tejidos tales como el hígado (Caballero, *et al.* 2004) y el intestino (Caballero, *et al.* 2002; Olsen, *et al.* 1999; Olsen, *et al.* 2000; Caballero, *et al.* 2003) en la dorada *Sparus aurata* (Caballero, *et al.* 2003; Tocher, *et al.* 2003). La tendencia actual es la de evitar excesiva carga energética que pueda acarrear efectos secundarios.

Por otra parte, el grado de sobreexplotación de los caladeros de pesca hace que sea necesaria la búsqueda de fuentes alternativas a los aceites de pescado ricos en  $\omega$ -3 HUFAs, para la fabricación de piensos para la acuicultura. Además, los aceites de origen vegetal son más económicos que los elaborados de pescado. Sin embargo, no existen aceites vegetales ricos en  $\omega$ -3 HUFAs. De todos modos, los resultados obtenidos hasta la fecha, parecen indicar que al menos, la acumulación de 18:2  $\omega$ -6 en la musculatura del pez, es reversible en parte a corto-medio plazo, mediante la eliminación de este ácido graso en la dieta y la reposición de los  $\omega$ -3 HUFAs en la dieta unos meses anteriormente a la comercialización del pescado (Izquierdo, *et al.* 2005; Montero, *et al.* 2005).

La búsqueda de un mejor conocimiento de los mecanismos fisiológicos que controlan el metabolismo energético así como de los lípidos y de los FAs, determinantes en la homeostasis de los peces, ha llevado a investigar la posible utilidad del Ácido Linoleico Conjugado (CLA). Se define un ácido conjugado como aquel que ha sufrido algún cambio en su estructura molecular; de hecho el nombre de CLA se debe a la posición y geometría de los isómeros *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12. El CLA es un EFA producido por los aceites vegetales de maíz, girasol, soja, etc. Aunque, en menor proporción en los mamíferos como los rumiantes, éste puede alcanzar hasta un 0,65% de los lípidos totales. El CLA incluido como suplemento de la dieta puede tener un papel relevante en la regulación de acumulación de la grasa perivisceral, aspecto que redundaría en una mejor calidad de los peces de acuicultura.

Diversos estudios han mostrado las diferentes funciones del CLA: Reducción de la grasa corporal (Thiel-Cooper, *et al.* 2001; Tischendorf, *et al.* 2002; Yamasaki, *et al.* 2003) y atenuando la obesidad en determinados animales (DeLany, *et al.* 2000; Yang, *et al.* 2003). Los mecanismos anti-obesidad del CLA incluyen la disminución de la energía, el aumento de la ingesta alimenticia y del gasto de la

energía (Ohnuki, *et al.* 2001; Terpstra, *et al.* 2002), la disminución de la diferenciación y la proliferación pre-adipocítica (Evans, *et al.* 2000; Evans, *et al.* 2002) o la disminución de la lipogénesis (Brown, *et al.* 2001; Oku, *et al.* 2003). Asimismo, inducen un aumento en la lipólisis y la oxidación de los Fas, incrementando el metabolismo y el volumen de recambio de los FAs en los preadipocitos, interfiriendo con la actividad de las enzimas claves involucradas en la movilización de los lípidos (Evans, *et al.* 2002; Bandarra, *et al.* 2006)

Los resultados de estudios realizados en diversas especies muestran que la incorporación en la dieta de CLA entre el 0,5% y el 2% no afectan el rendimiento en crecimiento o la ingesta del alimento, o el rango de conversión del alimento comparados con los controles (Figueiredo-Silva, *et al.* 2005) y son concordantes con los trabajos utilizando concentraciones de CLA del 0,5% al 5% en trucha arcoiris (Figueiredo-Silva, *et al.* 2005), en la perca amarilla *Perca flavescens* (Twibell, *et al.* 2001) en el gato de río (Twibell, *et al.* 2003), en salmón Atlántico (Berge, *et al.* 2004) o en la tilapia juvenil *Oreochromis niloticus* (Yasmin, *et al.* 2004). Sin embargo concentraciones de 1% de CLA no incrementan el peso en la carpa (Choi *et al.* 2000), el bacalao *Gadus morhua* ni tampoco mejora sus parámetros de crecimiento o el rango de conversión del alimento o una disminución de los adipocitos o en el depósito de lípidos en el hígado (Kennedy, *et al.* 2007b).

Los ensayos realizados en otras especies han mostrado diversos resultados: cuando se incluyó en la dieta CLA al 0,5% se produjo un mayor HSI en el bacalao *Gadus morhua* (Kennedy, *et al.* 2007b). Resultados semejantes se apreciaron en la lubina híbrida estriada *Morone saxatilis* × *M. Chrysops* (Twibell, *et al.* 2000), la perca amarilla *Perca flavescens* (Twibell, *et al.* 2001) y la tilapia *Oreochromis niloticus* (Yasmin, *et al.* 2004). El contenido de lípidos en el hígado se redujo en las dietas suplementadas con CLA, en la lubina estriada y en la perca amarilla (Twibell, *et al.* 2000; Twibell, *et al.* 2001). En el salmón atlántico no se encontraron diferencias en el contenido de lípidos del hígado de los peces alimentados con CLA al 1% y 2%. Es decir, no había redistribución de la grasa entre el hígado y el músculo, ni tampoco modificaciones en el HSI que adviertan de cambios en la distribución general de los lípidos corporales en los salmónidos (Kennedy, *et al.* 2007a;). Similares resultados se han descrito en gato de río juvenil con una dieta con CLA hasta un valor del 1% (Twibell, *et al.* 2003).

Tomando como base estas investigaciones, podemos deducir que las dietas adicionadas con CLA podrían ser beneficiosas para los peces debido a que se incrementan los FAs bioactivos, sin perjudicar los niveles de  $\omega$ -3 PUFAs. Por lo tanto en el experimento siguiente se trató de determinar el efecto de el ácido linolénico conjugado en la respuesta inmunitaria de la lubina

## **7.2. Experimento 4**

### **EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) EN LA DIETA SOBRE LA RESPUESTA INMUNITARIA DE LUBINAS JUVENILES *Dicentrarchus labrax***

#### **7.2.1. Objetivo**

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de las dietas suplementadas con CLA en los parámetros inmunes (lisozima y complemento) en las lubinas *Dicentrarchus labrax*.

*Esta investigación se realizó gracias a la colaboración de los grupos de investigación de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), Departamento de Biología celular, Fisiología e Inmunología y del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM), Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA). El mantenimiento de los peces y el muestreo se realizaron en las instalaciones del ICCM; los análisis de las muestras de los parámetros inmunes se realizaron en la UAB.*

*Los resultados que se exponen en este capítulo son parte de un estudio que pertenece a la tesis doctoral de Alex Makol y han sido publicados en 2009 por el citado autor, con referencia: Makol, A., et al., (2009). Effect of conjugated linoleic acid on dietary lipid utilization, liver morphology and selected immune parameters in sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*). *Comp. Biochem. Physiol.* 154, 179-187*

#### **7.2.2. Materiales y métodos**

##### **7.2.2.1. Dietas**

Se probaron cuatro dietas isonitrógenas e isoenergéticas, basadas en una formulación comercial que contenían 0 % (control), 0,5 % CLA, 1% CLA y 2% de CLA., (Conjugated Linoleic Acid). Las dietas, que cubren los requerimientos nutricionales para estas especies (Izquierdo, *et al.* 2005), fueron manufacturadas por productores de alimentos comerciales.

##### **7.2.2.2. Animales experimentales**

Lubinas juveniles *Dicentrarchus labrax* de una población aparentemente libre de enfermedades de la granja ADSA (San Bartolomé de Tirajana, Islas Canarias, España), arribaron al Instituto Canario de Ciencia Marina (ICCM). Los peces fueron mantenidos en el tanque y alimentados durante 3 semanas con una dieta extrusionada comercial a temperatura de 19 – 20.5°C hasta ser adaptadas a las condiciones ambientales (2Kg/m<sup>2</sup> de densidad media).

##### **7.2.2.3. Diseño experimental**

384 lubinas juveniles fueron distribuidos aleatoriamente en 12 tanques cilíndricos cónicos de fibra de vidrio de 500l de capacidad, para una densidad media de 2 kg/m<sup>3</sup> (32 peces por tanque). El peso inicial promedio (g ± SD) y longitud (cm ± SD) fue de 34,71 ± 7,61 y 13,52 ± 0,90, respectivamente. Los tanques estaban a una temperatura de 20,5 – 23,4°C y fotoperíodo (12h luz día/12h luz noche). El oxígeno disuelto fue mantenido a 8.0 ± 0.2 ppm. Los peces fueron manualmente alimentados hasta su aparente saciación con las cuatro dietas experimentales durante 9 semanas (3 veces al día, 6 días a la semana). Cada dieta fue administrada en tanques triplicados.

#### **7.2.2.4. Preparación de muestras y recogida de sangre**

La sangre se obtuvo por punción de la vena caudal con jeringa plástica de 1 ml; no se utilizó anestésico para evitar posibles efectos en los parámetros sanguíneos y el tiempo de manipulación fue menor a 1 minuto para minimizar los efectos del estrés. Las alícuotas de 1 ml de sangre fueron transferidas a tubos eppendorf y se dividieron en dos porciones, permitiendo coagular a las 2 horas. El suero se separó por centrifugación y se guardó a -80°C para las pruebas del complemento por la vía alternativa (ACP) y determinar la actividad de la lisozima.

##### **7.2.2.4.1. Técnicas analíticas**

###### **7.2.2.4.1.1. Lisozima**

Los niveles de lisozima en el suero fueron determinados por ensayo turbimétrico con el método descrito por Anderson & Siwicki (1994) (Siwicki, *et al.* 1994) que utiliza la lisis del *Micrococcus luteus* para la determinación la actividad enzimática (Rotllant, *et al.* 1997), usando la lisozima de la clara de huevo de gallina (Sigma) en PBS como estándar. Los resultados presentados como lisozima/ml.

###### **7.2.2.4.1.2. Complemento**

La prueba ACP se realizó como la describe Sunyer & Tort (Sunyer *et al.* 1995) para la dorada *Sparus aurata*, utilizando sangre de conejo. La lisis de los eritrocitos de conejo causada por el suero del pez se mide como la dilución de suero que causa el 50% de la lisis sangre del conejo denominada titulación ACH50 y los valores se representan como unidades ACH/ml.

##### **7.2.2.5. Análisis estadístico**

Los experimentos se hicieron por triplicado. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la evolución de las dietas y la manera en que se vieron afectados los parámetros inmunes. Se efectuó un ANOVA con factor anidado, siendo la dieta un factor anidado dentro del tanque. Se consideró estadísticamente significativa cuando  $p < 0,05$  indicándose en las figuras con un asterisco (\*). Los valores  $n=4$  fueron representados como la media ± el error estándar de la media (*Mean ± S.E.M.*); cuando el ANOVA resultó significativo se realizó un análisis adicional para conocer los grupos en que aparecían diferencias significativas con un *Post-hoc* prueba de Scheffé.

### 7.2.3. Resultados

La mortalidad fue despreciable durante el periodo experimental. Los parámetros inmunes mostraron que la actividad de la lisozima muestra cierta tendencia a aumentar a medida que aumentaba el porcentaje del CLA, observándose un mayor incremento en la dieta experimental CLA 1% y encontrándose diferencias significativas.

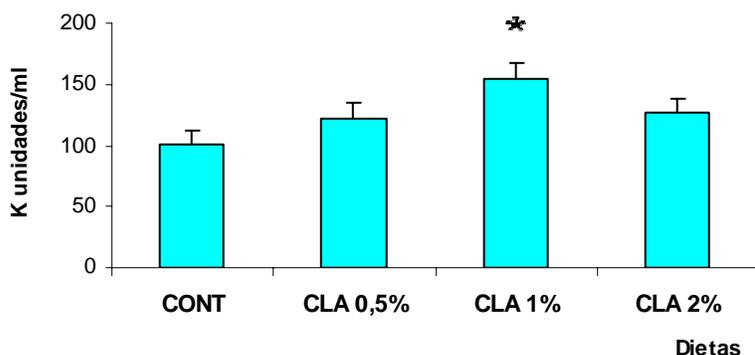


Figura 1. Actividad lisozímica (en K unidades/ml) según las dietas control o suplementadas con diferentes porcentajes CLA. El ANOVA muestra una diferencia significativa (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Media  $\pm$  error estándar  $n=15$ . Posthoc Scheffé con una diferencia (\*)  $p < 0,05$ .

El complemento mostró una actividad muy parecida a la lisozima es decir, incrementándose a medida que aumentaba el porcentaje del CLA en las dietas; a pesar de esto no se encontraron diferencias significativas, presentando el mejor valor de ACH50 los peces alimentados con la dieta suplementada con CLA al 2%.

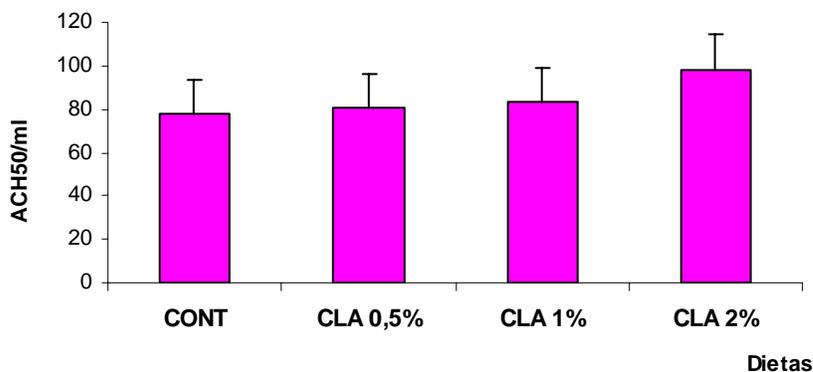


Figura 2. Actividad del complemento por la vía alternativa, (en unidades ACH50/ml) comparando la dieta control y las suplementadas con diferentes porcentajes de CLA. El ANOVA no muestra una diferencia significativa. Media  $\pm$  error estándar  $n=15$ .

### **7.3. Experimento 5**

#### **EFFECTOS DE LA SUSTITUCIÓN TOTAL DE ACEITE DE PESCADO POR ACEITES VEGETALES EN LA DIETA DE DORADAS JUVENILES *Sparus aurata***

##### **7.3.1. Objetivo**

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de la sustitución total del aceite de pescado dietético por diferentes aceites vegetales o una mezcla de ellos sobre algunos parámetros inmunes (lisozima, complemento y bacteriolisis) de juveniles de dorada *Sparus aurata*.

*Esta investigación se realizó gracias a la colaboración de los grupos de investigación de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), Departamento de Biología celular, Fisiología e Inmunología y del Instituto Canario de Ciencias Marinas (ICCM), Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA). El mantenimiento de los peces y el muestreo se realizaron en las instalaciones del ICCM; los análisis de las muestras de los parámetros inmunes se realizaron en la UAB.*

*Los resultados que se exponen en este capítulo son parte de un estudio publicado en 2008 con referencia: Montero et al., (2008) Total substitution of fish oil by vegetable oils in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: effects on hepatic Mx expression and some immune parameters. Fish & Shellfish Immunol. 24, 147-155 y pertenecen al proyecto AGL2004-08151-CO3-02*

##### **7.3.2. Materiales y métodos**

###### **7.3.2.1 Dietas**

Las 4 dietas isonitrógenas e isoenergéticas semicomerciales contenían proteínas al 45% y lípidos al 22%. Las dietas con sustitución de aceite de pescado fueron las siguientes: Dieta número 2 (D2:100 LO), sustitución completa del aceite de pescado (FO) por aceite de linaza (LO). Dieta número 3 (D3:100 SO) sustitución completa del aceite de pescado (FO) por aceite de soja. Dieta 4: mezcla de los aceites anteriores (LO – SO) (D4:50 LO/50 SO). La dieta 1, que contiene FO al 100% es utilizada como dieta control (D1: 100 FO).

###### **7.3.2.2. Animales experimentales**

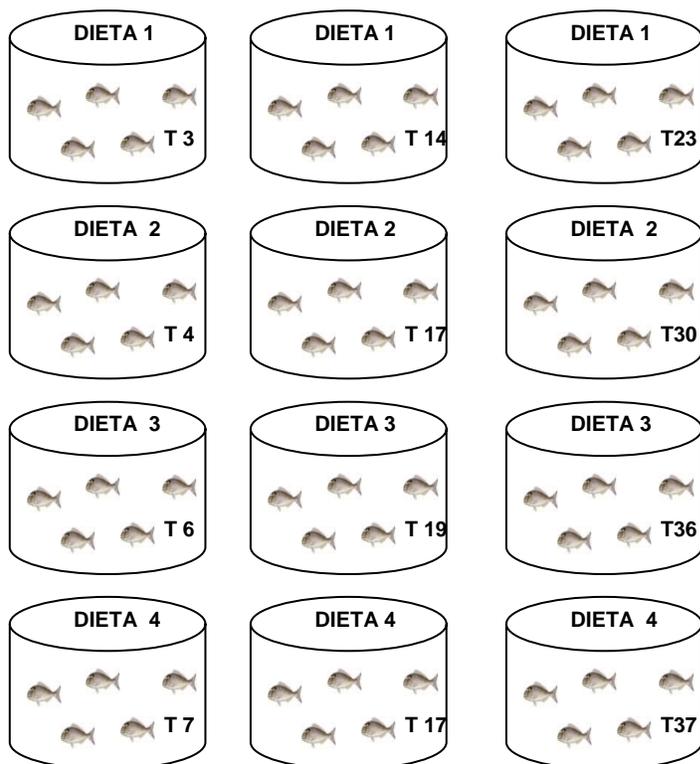
700 peces doradas juveniles *Sparus aurata* de una población aparentemente libre de enfermedades de la granja (ADSA S.A. San Bartolomé de Tirajana, Islas Canarias, España, arribaron al Instituto Canario de Ciencia Marina (ICCM) el primero de junio del 2005. Los peces fueron mantenidos en el tanque y alimentados durante 3 semanas con una dieta extrusionada comercial p (21,8 –

22.4°C) hasta que fueron adaptadas a las condiciones ambientales (3Kg/m<sup>2</sup> de densidad media).

### 7.3.2.3. Diseño experimental

Después 600 doradas juveniles fueron distribuidas aleatoriamente en 12 tanques cilindricos cónicos de fibra de vidrio con 500l de capacidad, a una densidad media de 3 Kg/m<sup>3</sup> (50 peces por tanque). El peso inicial promedio fue de 40g. Los tanques se mantuvieron a la temperatura de 21.8 – 22.4 °C y fotoperíodo (12h luz día/12h luz noche). El Oxígeno disuelto fue mantenido a 5.5 – 7.2 ppm. Los peces fueron manualmente alimentados hasta su aparente saciedad con una de las dietas experimentales por 6 meses (3 veces al día, 6 días a la semana). Cada dieta fue ensayada por triplicado.

Las muestras de sangre para recoger el plasma y el suero fueron tomadas de 30 peces de cada dieta al finalizar el experimento para determinar la actividad lisozímica y del complemento ACP.



600 doradas juveniles en 12 tanques de 500l. Cada tanque con 50 peces. Se ensayaron las 4 dietas por triplicado.

### 7.3.2.4. Análisis estadístico

Los experimentos se hicieron por triplicado. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la evolución de las dietas y la manera en que afectan los parámetros inmunes analizados. Se realizó una ANOVA con factor anidado,

siendo la dieta un factor anidado dentro del tanque. Se consideró estadísticamente significativa cuando  $p < 0,05$ , indicándose en las figuras con un asterisco (\*),  $p < 0,01$  (\*\*)  $p < 0,001$  (\*\*\*). Los valores ( $n=6$ ) fueron representados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (*Mean*  $\pm$  *S.E.M.*). Cuando el ANOVA resultó significativo se realizó un análisis adicional para conocer los grupos en que aparecían significaciones con un *Post-hoc* prueba de Scheffé.

### 7.3.3. Resultados

No se registró mortalidad durante la alimentación experimental. La actividad de la lisozima no mostró efecto según el tipo de aceite utilizado en la dieta, no encontrándose diferencias significativas entre las dietas basadas en aceites vegetales y la dieta control.

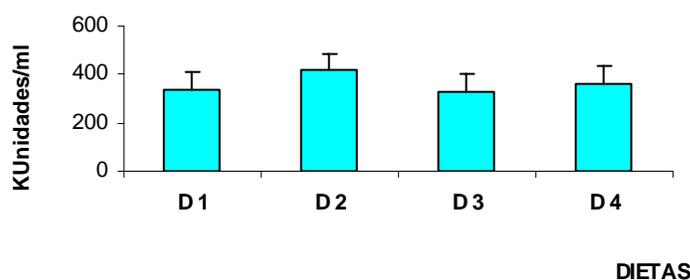


Figura 1. Actividad lisozímica (en K unidades/ml) según las dietas control o suplementadas con diferentes porcentajes de aceites vegetales. El ANOVA no muestra diferencia significativa  $p < 0,05$  (\*). Media  $\pm$  SD  $n=30$ .

La actividad del complemento mostró cambios cuando se compararon las diferentes dietas, encontrándose diferencias significativas en todos los grupos alimentados con las dietas suplementadas con aceites vegetales cuando se compararon con el control, basado en aceite de pescado.

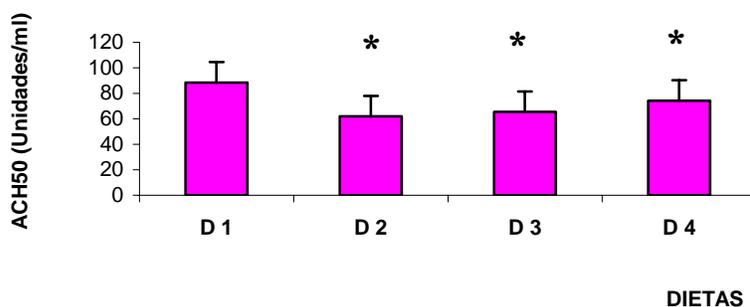


Figura 2. Actividad del complemento por la vía alternativa, (en unidades ACH50/ml) comparando las dietas control y las suplementadas con diferentes porcentajes de aceites vegetales. El ANOVA mostró diferencias significativas  $p < 0,001$  (\*). Media  $\pm$  SD  $n=30$ . En el *Posthoc* Scheffé se encontraron diferencias significativas donde  $p < 0,05$  (\*).

Respecto a la actividad bacteriolítica no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) cuando se compararon las tres dietas sustitutivas con la dieta control D1.

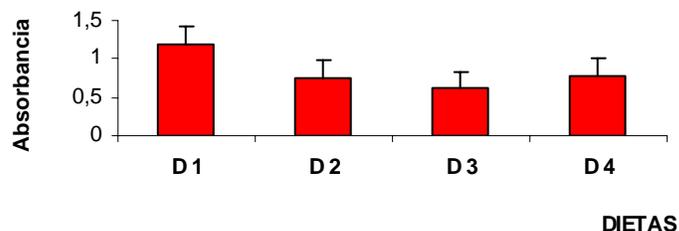


Figura 3. Actividad de la bacteriolisis (en absorbancia) comparando las dietas control y las suplementadas con diferentes porcentajes de aceites vegetales. El ANOVA no mostró diferencias significativa  $P < 0,001$  (\*\*\*) . Media  $\pm$  SD  $n=30$ . En el Posthoc Scheffé tampoco se encontraron diferencias significativas,  $p < 0,05$  (\*).

#### 7.4. Discusión

Históricamente se ha utilizado el aceite de pescado (FO) como fuente de alimentación en la acuicultura marina. El acelerado descenso de la producción del aceite de pescado ha llevado a la búsqueda de fuentes alternativas de los aceites vegetales (VO) por su abundancia en la naturaleza y por su bajo costo. Los esfuerzos hacia la sustitución del aceite de pescado se ha promovido desde hace más de dos décadas, y existe gran cantidad de literatura sobre la sustitución parcial de aceite de pescado por ingredientes de origen vegetal en distintas especies como *S. aurata* (Fountoulaki, *et al.* 2009a; Fountoulaki, *et al.* 2009b; Montero, *et al.* 2008) tilapia híbrida *Oreochromis niloticus x O. aureus* (Bahurmiz, *et al.* 2007) o salmón *S. salar* (Torstensen, *et al.* 2000). Se ha demostrado en salmónidos como la trucha arco iris *O. mykiss*, la trucha común *Salmo trutta* y el salmón del Atlántico *Salmo salar*, que es posible sustituir el aceite de pescado por uno solo o una mezcla de aceites vegetales, sin afectar el crecimiento o la eficiencia de los piensos (Sargent, *et al.* 2002; Bell, *et al.* 2003; Richard, *et al.* 2006).

Estudios en modelos animales mostraron que la composición de los FAs de la dieta altera los ácidos grasos de las células inmunes, siendo posible enriquecer las células inmunes con una dieta que contenga los ácidos grasos deseados en mayor concentración (AA, EPA DHA) (Calder, *et al.* 2008). La sustitución de los FO por los VO puede producir variaciones en el perfil de los ácidos grasos de los glóbulos rojos pudiendo verse alteradas las propiedades de la membrana, y la resistencia osmótica (Mourente, *et al.* 2005). También se ve afectado el tráfico a través de la membrana, lo que sugiere que la alimentación con aceites de origen vegetal podría causar reducciones significativas en los parámetros inmunológicos no específicos tales como el valor hematocrito, el recuento de los glóbulos blancos y rojos, y el estallido respiratorio de los macrófagos (Bell, *et al.* 2003; Mourente, *et al.* 2005).

Las sustituciones parciales o totales por aceites vegetales, se asocian con la modificación de los genes implicados en la biosíntesis del colesterol (Leaver, *et al.* 2008) y de los ácidos grasos (Jordal, *et al.* 2005), encontrándose en los peces alimentados con la dieta 100% vegetal, niveles más altos de la expresión génica en las enzimas involucradas en la biosíntesis del colesterol y del proceso de desaturación de FAs. Ello sugiere una alteración de la ruta de la biosíntesis de los lípidos en el hígado, por ser el centro del metabolismo intermediario y de la utilización de los nutrientes (Panserat, *et al.* 2009). Esto explicaría la mala adaptación metabólica de los peces y la menor eficiencia de la alimentación de los piensos vegetales. Otra posible causa, es la presencia de factores anti-nutricionales que existen en las plantas utilizadas (Dupont-Nivet, *et al.* 2009).

Otras investigaciones sugieren que el epitelio intestinal puede ser alterado para fomentar el transporte de los lípidos específicos de la dieta. Debido a la rápida rotación de componentes de la membrana intestinal los FAs, son altamente influenciados por los cambios en la dieta (Geurden, *et al.* 2009). De ahí, la importancia de poder modular el transporte intestinal por medio de la manipulación de los FAs en la dieta. En los mamíferos o las aves tales cambios han sido demostrados, modificándose la función intestinal y las propiedades de absorción de una gran variedad de transportadores pasivos y activos de los nutrientes como la glucosa, la fructosa, el colesterol, los aminoácidos (Tranchant, *et al.* 1998; Geurden, *et al.* 2009) y los ácidos grasos (Tranchant, *et al.* 1998).

En los peces, sólo hay información limitada acerca de la manera como la ingesta de los FAs afecta la absorción intestinal (Caballero, *et al.* 2006). A pesar de que los ensayos con diferentes dietas de sustitución son superiores a las 4 semanas, se observan efectos en las membranas de los enterocitos, alteraciones del metabolismo de los lípidos y en la composición de los tejidos en el salmón del Atlántico *Salmo salar* (Torstensen, *et al.* 2000; Menoyo, *et al.* 2003) y en la trucha arco iris *O. mykiss* (Caballero, *et al.* 2002). Los índices de digestibilidad de los SFAs se ven afectados también negativamente por los niveles de  $\omega$ -3 FAs de las dietas. Además, influyen en la formación de las micelas en la luz intestinal, y por tanto reducen la absorción de los FAs en la zona apical de los enterocitos (Menoyo, *et al.* 2003) alterando la fluidez, el funcionamiento de la membrana y la unión a las enzimas y las proteínas con los FAs (Geurden, *et al.* 2009).

La suplementación de las dietas con determinados aceites vegetales puede influir de forma negativa en el sistema inmunológico en los peces, observándose alteraciones en las membranas celulares en algunas especies como la trucha arco iris *O. mykiss* (Kiron, *et al.* 1995), la dorada *S. aurata* (Montero, *et al.* 2003), el gato de río *Ictalurus punctatus* (Francalossi, *et al.* 1994), el salmón atlántico *S. Salar* (Jordal, *et al.* 2005) y la lubina *D. labrax* (Mourente, *et al.* 2005; Farndale, *et al.* 1999), a pesar que los mecanismos implicados en tales efectos no son del todo conocidos (Montero, *et al.* 2008).

En el presente estudio se observa que las dietas que incluyen aceites vegetales afectan algunos parámetros inmunes en la dorada *Sparus aurata*. No se aprecian cambios de la actividad de la lisozima entre los peces alimentados con la dieta basada en aceite de pescado y los alimentados con las dietas basadas en aceites vegetales, incluida la mezcla LO-SO. En la actividad del complemento por la vía

alternativa (ACP) sí se muestran cambios significativos para todas las dietas basadas en aceites vegetales. En cuanto a la acción bacteriolítica se muestra una disminución de la actividad general; no obstante, las dietas LO y SO manifiestan una actividad similar. En la dorada *Sparus aurata* varios estudios han demostrado que la sustitución total del FO por el VO por un único aceite o la mezcla de ellos, reduce el crecimiento en la dorada *Sparus aurata* (Izquierdo, *et al.* 2003; Izquierdo, *et al.* 2005; Montero, *et al.* 2003) y en otras especies marinas como la lubina *D. labrax* (Montero, *et al.* 2005; Mourente, *et al.* 2005). Otras especies como el besugo *Pagellus bogaraveo* y el sargo picudo *Diplodus puntazzo* (Hernández, *et al.* 2005) no se ven afectados por la sustitución total del aceite de pescado, ya que la cantidad de aceite suministrado en las dietas de estos estudios es muy pequeña y prácticamente todo el aceite está incluido en la harina. No obstante, también puede haber diferencias relacionadas con las necesidades dietéticas de los EFAs de cada especie, las fuentes y los contenidos de lípidos de los FAs. A pesar de estos resultados, es importante continuar con el estudio de las consecuencias de estas sustituciones totales en la salud de las especies marinas. Se conocen algunos efectos negativos de la sustitución total de FO por aceites vegetales en la dorada *Sparus aurata* (Montero, *et al.* 2003; Caballero, *et al.* 2004) y se sugiere que el aceite vegetal contenido en las dietas puede afectar la barrera intestinal incrementando su permeabilidad (Montero, *et al.* 2008).

Como ya se ha descrito anteriormente, los efectos de las sustituciones de los FAs afectan también el sistema inmune e intervienen en la composición de las membranas celulares, alterando la producción de los EFAs (DHA, AA, EPA) (Ganga, *et al.* 2005). La actividad de los eicosanoides afecta también los mecanismos de transducción de señales de expresión génica (Montero, *et al.* 2008).

En este estudio, se observan diferencias significativas entre las dietas control y las suplementadas con CLA, mejorándose las actividades de la lisozima y encontrándose una tendencia a mejora del complemento con el aumento en la concentración del CLA, sobretodo en el CLA de mayor porcentaje. Una posible explicación para esta correlación podría fundamentarse en la capacidad del CLA para mejorar la respuesta celular inmune. Se conoce que la modulación del sistema inmune por los FAs puede ocurrir a través de la regulación del metabolismo del AA y la producción de eicosanoides (Calder, *et al.* 1995; Tricon, *et al.* 2004; Tricon, *et al.* 2006). Numerosos datos en diferentes modelos animales y en los humanos, muestran que la administración de suplementos dietéticos ricos en CLA aumenta la eficiencia de las funciones efectoras antígeno-específicas de las respuestas humoral y celular, a los antígenos bacterianos y virales (Bassaganya-Riera, *et al.* 2003; Nunes, *et al.* 2008; Diez, *et al.* 2007b).

Por otra parte, las dietas suplementadas con CLA al 0,5%, 1% y el 2% en esta investigación no muestran efectos sobre la composición corporal de las doradas (Makol, *et al.* 2009). Similares resultados se describen en el salmón atlántico *Salmo salar* (Berge, *et al.* 2004; Kennedy, *et al.* 2005), en la tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* (Yasmin, *et al.* 2004), en el bacalao *Gadus morhua* (Kennedy, *et al.* 2007b), en la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* (Kennedy, *et al.* 2007a), en la perca amarilla *Perca flavescens* (Twibell, *et al.* 2001) y en la lubina estriada híbrida *Morone saxatilis* (Twibell, *et al.* 2000). En otros trabajos

se observa también, que los peces alimentados con CLA al 1% muestran una disminución del crecimiento, si bien se mejora la eficiencia alimentaria (Choi, *et al.* 2000). En la lubina se ha visto que el CLA 1% aumenta la actividad plasmática de la lisozima y se correlaciona positivamente con la actividad del complemento que podría estar involucrada en una mejor respuesta de las defensas ante las bacterias (Makol, *et al.* 2009).

Diferentes trabajos publicados revelan una reducción en el peso y en la eficiencia alimentaria en la tilapia del Nilo *Oreochromis niloticus* y en la carpa común *Cyprinus carpio*; pero sólo en los peces alimentados con un mayor contenido de CLA (> 2%). Por el contrario Valente (Valente, *et al.* 2007) reporta en su estudio que la lubina *Dicentrarchus labrax*, no se ve afectada en su crecimiento ni en la eficiencia alimentaria por la incorporación CLA. Otros trabajos muestran que la inclusión de los CLAs al 2% en las dietas de la lubina reducen el almacenamiento de grasa en la cavidad perivisceral. Además, el CLA aumenta la calidad del filete debido al aumento de  $\omega$ -3 HUFAs y a la reducción de los SFAs en el músculo contribuyendo, a la producción de un alimento más funcional (Makol, *et al.* 2009).

Otras investigaciones en la dorada *S. aurata* encuentran que los CLA promocionan la reducción del tejido adiposo, afectando de manera ligeramente negativa el crecimiento y reduciendo la biosíntesis de HUFAs lo cual revela que la inclusión de CLA en las dieta acuícolas sería de poco beneficio (Diez, *et al.* 2007b).

## **7.5. Conclusión**

Los resultados de este estudio muestran la influencia de los FAs de la dieta en los parámetros inmunes. En los peces marinos el efecto de las dietas de sustitución con aceites vegetales modulan el sistema inmune y sus células. Se puede concluir de los resultados presentes que se producen alteraciones de los parámetros inmunes con las sustituciones de aceites vegetales en las mezcla al 50LO/50SO, al 100 % de aceite de linaza-LO, al aceite de soja-SO y por ello sería recomendable que este tipo de sustitución sea no completa. Además, el CLA puede ser utilizado como un eficiente suplemento nutritivo para adicionar a las dietas de los peces con el objeto de mejorar la función inmunológica. Estos resultados son similares a los reportados en otras investigaciones y resultan interesantes en la producción acuícola para que se obtengan ventajas para el consumo humano. Por esta razón, se hacen necesarios nuevos estudios que permitan comprender los mecanismos que intervienen en la modulación del sistema inmune en los peces marinos y como pueden influir las condiciones en las cuales se mantienen los peces en acuicultura. Adicionalmente, los estudios hechos hasta ahora son insuficientes y adolecen de información relevante como las dosis y el tiempo de tratamiento adecuados, y además tienen que ser realizados para cada una de las especies en cuestión. Con estas informaciones se podrán desarrollar piensos de nueva generación, más sostenibles desde el punto de vista de las materias primas, eficaces en cuanto al crecimiento y salud de los peces y saludables desde el punto de vista de la ingesta por los humanos.

## 8. CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

### 8.1. Discusión general

En los cultivos intensivos intervienen diversos factores ambientales estresantes que influyen en la salud de los peces. Los efectos de estos factores ambientales sobre la respuesta inmunitaria de la especie cultivada y su resistencia frente a patógenos han sido estudiados por diversos autores (Fries, *et al.* 1986; Mazon, *et al.* 2004; Maule, *et al.* 2005). Estudios anteriores, probaron que la resistencia a las enfermedades en especies de aguas frías se correlacionan con los parámetros inmunes no-específicos, tales como actividad de la lisozima, del complemento, la actividad bactericida, hemolítica, la explosión respiratoria y la actividad fagocítica, indicando la capacidad de respuesta de estos mecanismos para dar una primera respuesta a patógenos y propiciando una respuesta inmune específica posterior (Røed, *et al.* 1990; Røed, *et al.* 2002; Røed, *et al.* 1993; Marsden, *et al.* 1996; Sarder, *et al.* 2001). Los bajos niveles en los parámetros inmunes afectan a los peces haciéndolos más susceptibles a las infecciones y reducen la supervivencia (Sahoo, *et al.* 2004). Los trabajos en genética han adquirido un interés especial en la determinación de los factores intrínsecos de la resistencia que protege a los peces de diversas enfermedades. Se ha demostrado que hay una fuerte base genética en la base de la respuesta innata y/o mecanismos bioquímicos que confieren resistencia a los parásitos (Sahoo, *et al.* 2008).

Se conoce poco acerca de las señales de las células inmunes hacia el sistema neuroendocrino en los peces. En este sentido, recientemente se ha prestado especial atención al potencial de las citocinas para la recíproca comunicación entre el sistema neuro-endocrino y el sistema inmune en los peces (Engelsma, *et al.* 2002). Recientes investigaciones sugieren, que el factor liberador de la corticotropina (CRH) juega un papel clave en la regulación e integración de los sistemas neuroendocrino, inmune y del comportamiento como respuesta a agentes estresantes (Crespi *et al.* 2004; Lovejoy, *et al.* 2006; Heinrichs, *et al.* 2004; Peppels, *et al.* 2004). No obstante, se requiere un conocimiento más detallado de la función de cada una de las citocinas que participan en este proceso. Nuevos avances en reproducción, plantean que la regulación integrada de los sistemas neuroendocrinos no actúan solos. Se han descubierto otras hormonas con potenciales funciones fisiológicas sobre las gónadas de los peces (Reinecke, *et al.* 2010; Bram, *et al.* 2006)

Diversas enzimas líticas, que se encuentran en los tejidos y fluidos corporales de los peces actuando de forma individual o en cascada, son importantes elementos de defensa especialmente contra las bacterias. Algunas de ellas se utilizan como parámetros inmunes: lisozima, la vía lítica del sistema del complemento y otras enzimas bacteriolíticas y hemolíticas. La lisozima es un parámetro importante en la defensa inmune de invertebrados y vertebrados, es bactericida, actúa hidrolizando los  $\beta$ -glucósidos y peptidoglicanos unidos a la pared celular bacteriana y está principalmente relacionada con la defensa contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Ellis, *et al.* 2001). Funciona también como opsonina y activa el sistema del complemento y los fagocitos (Cuesta, *et al.*

2002; Hernández, *et al.* 2003). Muchas especies muestran buena actividad lisozima en sus tejidos y fluidos corporales (Grinde, *et al.* 1988; Lie, *et al.* 1989). Por el contrario otras especies marinas como el bacalao *Gadus morhua* y el róbalo *Melanogrammus aeglefinus*, muestran menos actividad lisozimica en sus tejidos o fluidos corporales. En general hay una gran diversidad en el nivel de respuesta de la lisozima dependiendo de la especie y el fluido corporal (Saurabh, *et al.* 2008). Otras lisinas naturales en el suero de los peces comúnmente detectada por sus espontáneos efectos hemolíticos en los eritrocitos son usualmente, pero no siempre atribuidas a la activación de la vía alternativa del sistema del complemento (Kilpi, *et al.* 2009).

La modulación del sistema inmune inducida por los FAs depende de varios factores biológicos y metodológicos, tales como el tipo y la concentración de los FAs, tipos de células, las especies de animales de experimentación, el suero utilizado en los cultivos *in vivo* o *in vitro*, etc. (Calder, *et al.* 1998). Los mecanismos que participan en la modulación del sistema inmune por la adición de los ácidos grasos en las dietas son poco conocidos y se sabe poco acerca del papel de los ácidos grasos en la expresión de genes implicados en estos procesos. De hecho, la manipulación en la dieta de la proporción de  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 se ha demostrado que afecta la resistencia contra agentes patógenos en varias especies (Caballero, *et al.* 2002; Caballero, *et al.* 2004; Menoyo, *et al.* 2004; Stubhaug, *et al.* 2006; Thompson, *et al.* 1999; Erdal, *et al.* 1991; Caballero, *et al.* 2006; Hernández, *et al.* 2007) y en diferentes parámetros inmunes tales como la actividad de la vía alternativa del complemento, la actividad fagocitaria de los macrófagos del riñón anterior (Montero, *et al.* 2003). Además, son determinados por la composición de los FAs de las células inmunitarias (Montero, *et al.* 2003; Farndale, *et al.* 1999; Montero, *et al.* 2004) y afectan a la producción de eicosanoides (Bell, *et al.* 2003; Ganga, *et al.* 2005; Mourente, *et al.* 2005). Sin embargo, poco se sabe sobre el efecto de la dieta de FAs en otros procesos, como los relacionados con la infección viral (Montero, *et al.* 2008).

El suministro de lípidos, ante el previsible aumento del coste del aceite de pescado, requiere de la utilización de fuentes alternativas, principalmente vegetales por su alta disponibilidad (Jover, *et al.* 2007). Es decir, la fuente alternativa de lípidos sostenible y autorizada por las autoridades sanitarias para ser utilizada como sustituto del aceite de pescado en la dieta de peces marinos, son los aceites vegetales ricos en PUFAs C18 pero éstos carecen de los EFAs necesarios para los peces marinos (Montero, *et al.* 2008). La cantidad de aceites vegetales incluidos en las dietas para peces marinos está limitada por la cantidad de aceite de pescado incorporado para hacer frente a la exigencia de EFAs para las especies estudiadas y la cantidad total de grasa de la dieta. Las deficiencias dietéticas de EFAs pueden afectar la salud de los peces por la alteración de algunos parámetros inmunes (Kiron, *et al.* 1995; Montero, *et al.* 2004) y la disminución de la resistencia a patógenos (Sheldon, *et al.* 1991).

Las dietas experimentales suplementadas con inmunoestimuladores como los probióticos aumentan la actividad del complemento, cuando se comparan con el grupo control (Díaz-Rosales, *et al.* 2006); en los trabajos en los que se encuentran cambios significativos, se concluye que los valores más elevados se alcanzan al final del experimento de acuerdo con los resultados encontrados por

Panigrahi (Panigrahi, *et al.* 2004). La mayoría de parámetros inmunes innatos evaluados tuvieron los valores más altos la tercera semana, por lo que no serían necesarios periodos experimentales más largos (Salinas, *et al.* 2005).

Existen numerosos trabajos en este sentido, pero sería necesario evaluar, además del crecimiento y eficiencia nutritiva, los aspectos económicos estimando el óptimo nivel económico de inclusión y determinar si ello sería suficiente o haría falta una alimentación de finalización. En este sentido la realimentación final con un pienso rico en harina de pescado podría ser interesante (Cuesta, *et al.* 2007).

Las investigaciones sobre las dietas suplementadas con diversas combinaciones de vitaminas, sustancias inmunomoduladoras e inmunoestimuladora intentan mejorar la respuesta del sistema inmune, mejorando la salud y la calidad de los peces.

## **8.2. Conclusiones generales**

1. Los parámetros inmunes no-específicos resultan ser herramientas muy útiles para el estudio de los factores de estrés agudo más comunes en los animales de cultivo.
2. Se observa una diferencia significativa entre los peces estresados por manejo o infección y los peces control, aunque los efectos de manipulación son importantes en ambos grupos.
3. En nuestro experimento los grupos de peces alimentados con una dieta inmunoestimuladora (Manano oligosacáridos,  $\beta$ -glucanos) muestran pocas diferencias significativas. Sin embargo en alguno de los parámetros inmunes, se observa cierta tendencia a incrementar la actividad sobre todo con las dietas suplementadas con los porcentajes mayores.
4. A diferencia de las múltiples bibliografías que manifiestan el mejoramiento y optimización de los piensos mediante dietas suplementadas con productos inmuno moduladores e inmuno estimuladores, en nuestro estudio los resultados han sido muy discretos.

## 9. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS

Los trabajos realizados con las dietas experimentales y los resultados obtenidos en relación a la respuesta inmunitaria y de estrés sugieren los siguientes campos de futuro:

- *Sistema inmune en peces: posibles líneas de estudio*

En relación a la función del sistema inmune: las enfermedades y la dieta constituyen dos de los mayores limitantes en el desarrollo de la industria acuícola afectando la producción y comercialización e incrementando la vulnerabilidad del sector; a pesar de que la mayoría de enfermedades bacterianas y virales no se consideran peligrosas para la salud y el consumo humano, sí influyen negativamente en la producción y también la venta y en la confianza de los consumidores (APROMAR, *et al.* 2007)

Se considera que las pentraxinas juegan un importante papel en la función inmune demostrándose que pueden iniciar la clásica cascada del complemento (Cook, *et al.* 2003). La CRP cumple un rol clave en la defensa innata del huésped especialmente en vertebrados inferiores, está evolutivamente conservada en vertebrados e invertebrados con un rango amplio de propiedades. La unión CRP-CPS o APS puede activar el sistema del complemento y suprimir el crecimiento bacteriano en trucha arco iris (Nakanishi, *et al.* 1991).

Existen evidencias de que algunas dietas mejoran la resistencia de algunos animales a ciertas condiciones de estrés. Tales dietas son enriquecidas con vitaminas como la C y E, inositol, ácidos grasos insaturados y fosfolípidos (Tort, *et al.* 2005; Montero, *et al.* 1998; Ortuño, *et al.* 1999; Ortuño, *et al.* 2001; Montero, *et al.* 1999). Una de las estrategias con mayor potencial es el enriquecimiento de las dietas con productos inmunoestimulantes o inmunomoduladores, tales como los probióticos, levaduras de diversos hongos, etc. La potenciación de la respuesta inmune adaptativa mediante inmunoestimulantes es también considerada como una prometedora vía complementaria a la vacunación y la cría selectiva, que siguen siendo las estrategias clave para la prevención de enfermedades en los peces de acuicultura (Djordjevic, *et al.* 2009). Todo ello enmarcado en las estrictas normas existentes para la utilización de antibióticos, vacunas vivas etc. En consecuencia, se hacen necesarios estudios para conocer el verdadero alcance fisiológico de estas substituciones en la alimentación de los peces afectando lo menos posible su salud y, por lo tanto, su rendimiento comercial.

- *Estudio del estrés: nuevos indicadores inmunitarios*

En el campo de la investigación sobre nuevos indicadores inmunitarios del estrés, parece que un parámetro interesante podría ser el número y la distribución de los glóbulos blancos. Sin embargo, no hay suficientes estudios que muestren un panorama completo de estos parámetros por ejemplo, el número de células

(leucocitos o linfocitos) en la sangre y en los órganos linfoides (bazo, riñón anterior y timo) (Tort, *et al.* 2005).

Por otro lado, mediante métodos genómicos y proteómicos, se espera que se detecten procesos inmunes, tales como los mecanismos siguientes a la infección o durante el desarrollo embrionario y larvario, y que esto conduzca a un avance considerable en el campo de la inmunología de los peces (Magnadóttir, *et al.* 2006). En este sentido el pez cebra *Danio rerio* surge como un poderoso y ventajoso modelo en el estudio del desarrollo de la inmunidad, entre otras cosas por su tamaño, alta fecundidad y transparencia óptica de sus embriones (Mulero, *et al.* 2007)

En esta línea de investigación, las pruebas experimentales de exposición a patógenos son siempre herramientas útiles para determinar la eficiencia del sistema inmune bajo condiciones de estudio requeridas. Las pruebas de resistencia a enfermedades con algún patógeno específico u oportunista, indican la capacidad del sistema inmune de vencer los cambios (Tort, *et al.* 2005) y por tanto, constituyen un buen modelo para el estudio del estrés.

Existen discrepancias en cuanto al efecto de ciertos factores estresantes sobre algunos factores fisiológicos, que pueden ser debidas por ejemplo al tiempo transcurrido desde la iniciación del efecto del estresante y la dinámica del mecanismo inmune particular (Tort, *et al.* 1998). Parece, pues, conveniente realizar estudios que tuvieran es cuentan más sistemáticamente la evolución del efecto del estresante en función del tiempo.

El uso de marcadores moléculares pueden ser interesante para revelar los posibles mecanismos de expresión génica que están involucrados en el crecimiento de los peces alimentados con productos 100% vegetales (Panserat, *et al.* 2009).

- *Interrelación entre sistemas: nervioso, endocrino e inmune*

En los peces al igual que en los mamíferos se ha visto una interrelación entre los tres sistemas: nervioso, endocrino e inmune. Por ejemplo, se conoce poco acerca de las señales de las células inmunes hacia el sistema neuroendocrino en peces. En este sentido, parece que debería ponerse especial atención en el potencial de las citocinas para la recíproca comunicación entre el sistema neuro-endocrino y el sistema inmune en los peces (Engelsma, *et al.* 2002). Se sabe muy poco sobre las interacciones reproductiva-inmune en los vertebrados no mamíferos (Bram, *et al.* 2006 ). En los peces, se han determinado interacciones entre el eje HPG y los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) (Reinecke, *et al.* 2010). El desconocimiento de información genética tales como marcadores de superficie celular, proteínas recombinantes ha obstaculizado su utilización experimental (Bram, *et al.* 2006).

Los lipopolisacáridos bacterianos (LPS), también denominados endotoxinas, son considerados como un importante factor inmunogénico, en algunos casos son los desencadenantes de los efectos letales y manifestaciones clínicas de

enfermedades en los seres humanos y animales; a pesar de que se ha estudiado su toxicidad en diferentes peces, también ejerce efectos neuro-inmunológicos, patológicos, fisiológicos, inmuno-endocrinológicos en varias especies de peces. Los efectos inmunoestimulantes de la endotoxina activarían diversos parámetros inmunitarios como los linfocitos T y B, los macrófagos y el sistema del complemento en los teleósteos. La investigación sobre las endotoxinas (LPS) es de suma importancia en la alimentación humana y animal debido a sus múltiples efectos biológicos (Swain, *et al.* 2008).

- *Interés económico del estudio del estrés*

Por lo que respecta al punto de vista del interés económico del estudio del estrés en peces, resulta obvio por cuanto en la piscicultura es fundamental la correcta adaptación del animal a las condiciones de cultivo (Davis, *et al.* 2002). Cuanto mejor es la adaptación (es decir, menor estrés soportado), tanto mejor serán las posibilidades del mantenimiento en cautividad, el crecimiento y la reproducción de la especie, y en consecuencia, la productividad comercial y la rentabilidad de estas explotaciones. Finalmente, las condiciones de cultivo deben evitar o minimizar las situaciones de estrés; en los procesos de producción de las especies acuícolas (Weyts, *et al.* 1999; Van Weerd, *et al.* 1998).

El futuro de la acuicultura requiere para su desarrollo y sostenibilidad una evaluación adecuada de los planes y estrategias globales de los cultivos y está determinado por los avances en el campo tecnológico: El mundo de la alta tecnología determina también el futuro de la acuicultura: viveros esféricos, sistemas hidráulicos sumergibles, fondeadero de punto único o de puntos múltiples, transporte aéreo de los alevines, plataforma inteligente de alimentación, vigilancia y control a través de cámaras submarinas, etc. (APROMAR, *et al.* 2007); todo ello encaminado al nuevo reto de la industria que es el cultivo en mar abierto y en el cual los estudios sobre la influencia del estrés en estas nuevas condiciones se hace necesario.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anonymous (Áreas de aguas Cabildo de tenerife /agricultura/pesca) <http://www.tenerife.es/areasgc/agricultura/pesca/imagenes/peces16.gif>. 12 dic 2007.
2. Abbas, A. K. and Andrew, H. L. (2007) *Cellular and molecular immunology*, 6th ed. ed., Saunders Elsevier.
3. Abe, H. (2000) Role of histidine-related compounds as intracellular proton buffering constituents in vertebrate muscle. *Biochemistry-Moscow* 65, 757-765.
4. Acerete, L., Balasch, J. C., Espinosa, E., Josa, A. and Tort, L. (2004) Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture*, 237, 167-178.
5. Ai, Q. H., Mai, K. S., Zhang, L., Tan, B., Zhang, W., Xu, W. and Li, H. (2007) Effects of dietary  $\beta$ -1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Fish & Shellfish Immunology* 22, 394-402.
6. Ainsworth, A. J. (1994) A Beta-Glucan Inhibitable Zymosan Receptor on Channel Catfish Neutrophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 41, 141-152.
7. Aksnes, A., Hope, B., Hostmark, O. and Albrektsen, S. (2006) Inclusion of size fractionated fish hydrolysate in high plant protein diets for Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture* 261, 1102-1110.
8. Albrektsen, S., Mundheim, H. and Aksnes, A. (2006) Growth, feed efficiency, digestibility and nutrient distribution in Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed two different fish meal qualities at three dietary levels of vegetable protein sources. *Aquaculture* 261, 626-640.
9. Alexander, J. B. and Ingram, G. A. (1992) Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases* 2, 249-279.
10. Altimiras, J., Champion, S. R., Puigcerver, M. and Tort, L. (1994) Physiological-responses of the gilthead sea bream *Sparus aurata* to hypoosmotic shock. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* 108, 81-85.
11. Anderson, D. P. (1997) Adjuvants and immunostimulants for enhancing vaccine potency in fish. *Fish Vaccinology* 90, 257-265.
12. Anderson, D. P. and Jeney, G. (1992) Immunostimulants Added to Injected A  $\beta$  eromonas-Salmonicida Bacterin Enhance the Defense-Mechanisms and Protection in Rainbow-Trout (*Oncorhynchus-Mykiss*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 34, 379-389.
13. Anderson, D. P. and Siwicki, A. K. (1994) Duration of Protection Against Aeromonas-Salmonicida in Brook Trout Immunostimulated with Glucan Or Chitosan by Injection Or Immersion. *Prog. Fish-Cult.* 56, 258-261.
14. Ando, S. and Mori, Y. (1993) Characteristics of Serum-Lipoprotein Features Associated with Lipid-Levels of Muscle and Liver from 5 Species of Fish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59, 1565-1571.
15. APROMAR, Vela Vallejo, S. and Ojeda Gonzalez, J. (2007) *Revolución azul*, APROMAR, Madrid.
16. Arai, S., Mueller, R., Skimma, Y. and Nose, T. (1975) Nutrition and minerals in fish. *Bull. freshw. Fish Res. Lab.* 25, 33-40.

17. Arai, S., Nose, T. and Kawatsu, H. (1974) *Bull. freshw. Fish Res. Lab.* 24, 95-99.
18. Aragao, C., Corte-Real, J., Costas, B., Dinis, M. T. and Conceicao, L. E. (2008) Stress response and changes in amino acid requirements in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Amino Acids* 34, 143-148.
19. Arends, R. J., Mancera, J. M., Muñoz, J. L., Wendelaar Bonga, S. E. and Flik, G. (1999) The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *J. Endocrinol.* 163, 149-157.
20. Auwerx, J., Leroy, P. and Schoonjans, K. (1992) Lipoprotein-Lipase - Recent Contributions from Molecular-Biology. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 29, 243-268.
21. Babin, P. J. and Vernier, J. M. (1989) Plasma-Lipoproteins in Fish. *J. Lipid Res.* 30, 467-489.
22. Baeverfjord, G., Refstie, S., Krogedal, P. and Asgard, T. (2006) Low feed pellet water stability and fluctuating water salinity cause separation and accumulation of dietary oil in the stomach of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 261, 1335-1345.
23. Bagni, M., Archetti, L., Amadori, M. and Marino, G. (2000) Effect of long-term oral administration of an immunostimulant diet on innate immunity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 47, 745-751.
24. Bagni, M., Romano, N., Finoia, M. G., Abelli, L., Scapigliati, G., Tiscar, P. G., Sarti, M. and Marino, G. (2005) Short- and long-term effects of a dietary yeast beta-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Shellfish Immunol.* 18, 311-325.
25. Bahurmiz, O. M. and Ng, W. K. (2007) Effects of dietary palm oil source on growth, tissue fatty acid composition and nutrient digestibility of red hybrid tilapia, *Oreochromis sp.*, raised from stocking to marketable size. *Aquaculture* 262, 382-392.
26. Baigent, S. M. (2001) Peripheral corticotropin-releasing hormone and urocortin in the control of the immune response. *Peptides* 22, 809-820.
27. Bakke-McKellep, A. M., Press, C. M., Baeverfjord, G., Krogdahl, A. and Landsverk, T. (2000) Changes in immune and enzyme histochemical phenotypes of cells in the intestinal mucosa of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with soybean meal-induced enteritis. *J. Fish Dis.* 23, 115-127.
28. Bandarra, N. M., Nunes, M. L., Andrade, A. M., Prates, J. A. M., Pereira, S., Monteiro, M., Rema, P. and Valente, L. M. P. (2006) Effect of dietary conjugated linoleic acid on muscle, liver and visceral lipid deposition in rainbow trout juveniles (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 254, 496-505.
29. Barry, T. P., Lapp, A. F., Kayes, T. B. and Malison, J. A. (1993) Validation of a microtitre plate ELISA for measuring cortisol in fish and comparison of stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Aquaculture* 117, 351-363.
30. Barton, B. A., Iwama, G. K. and Pickering, A. D. (1997) Fish Stress and Health in Aquaculture. *Soc. Exp. Biol. Seminar Series.* 62.
31. Barton, B. A., Rahn, A. B., Feist, G., Bollig, H. and Schreck, C. B. (1998) Physiological stress responses of the freshwater chondrosteian paddlefish (*Polyodon spathula*) to acute physical disturbances. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 120, 355-363.

32. Barton, B. A., Ribas, L., Acerete, L. and Tort, L. (2005) Effects of chronic confinement on physiological responses of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., to acute handling. *Aquacult. Res.* 36, 172-179.
33. Bassaganya-Riera, J., Pogranichniy, R. M., Jobgen, S. C., Halbur, P. G., Yoon, K., O'Shea, M., Mohede, I. C. M. and Hontecillas, R. (2003) Conjugated linoleic acid ameliorates viral infectivity in a pig model of virally induced immunosuppression. *J. Nutr.* 133, 3204-3214.
34. Beegle, D. B., Carton, O. T. and Bailey, J. S. (2000) Nutrient management planning: Justification, theory, practice. *J. Environ. Qual.* 29, 72-79.
35. Bell, J. G., Henderson, R. J., Tocher, D. R., McGhee, F., Dick, J. R., Porter, A. R., Smullen, R. P. and Sargent, J. R. (2002) Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. *J. Nutr.* 132, 222-230.
36. Bell, J. G., McEvoy, J., Tocher, D. R., McGhee, F., Campbell, P. J. and Sargent, J. R. (2001) Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *J. Nutr.* 131, 1535-1543.
37. Bell, J. G. and Sargent, J. R. (2003) Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture* 218, 491-499.
38. Bendich, A. and Langseth, L. (1989) Safety of Vitamin-a. *Am. J. Clin. Nutr.* 49, 358-371.
39. Bendich, A. and Machlin, L. J. (1988) Safety of oral intake of vitamin E. *Am. J. Clin. Nutr.* 48, 612-619.
40. Bendiksen, E. A., Arnesen, A. M. and Jobling, M. (2003) Effects of dietary fatty acid profile and fat content on smolting and seawater performance in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 225, 149-163.
41. Benedito-Palos, L., Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J., Kaushik, S. and Pérez-Sánchez, J. (2007) Combined replacement of fish meal and oil in practical diets for fast growing juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): Networking of systemic and local components of GH/IGF axis. *Aquaculture* 267, 199-212
42. Berge, G., Ruyter, B. and Åsgård, T. (2004) Conjugated linoleic acid in diets for juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*); effects on fish performance, proximate composition, fatty acid and mineral content. *Aquaculture*, 237, 365-380.
43. Berge, R. K., Madsen, L., Vaagenes, H., Tronstad, K. J., Gottlicher, M. and Rustan, A. C. (1999) In contrast with docosahexaenoic acid, eicosapentaenoic acid and hypolipidaemic derivatives decrease hepatic synthesis and secretion of triacylglycerol by decreased diacylglycerol acyltransferase activity and stimulation of fatty acid oxidation. *Biochem. J.* 343, 191-197.
44. Bernier, N. J. (2006) The corticotropin-releasing factor system as a mediator of the appetite-suppressing effects of stress in fish. *General and Comparative Endocrinology* 146, 45-55.
45. Bernier, N. J. and Peter, R. E. (2001) Appetite-suppressing effects of urotensin I and corticotropin-releasing hormone in goldfish (*Carassius auratus*). *Neuroendocrinology* 73, 248-260.
46. Berthoud, H. (2002) Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 393-428.

47. Biswas, P., Pal, A. K., Sahu, N. P., Reddy, A. K., Prusty, A. K. and Misra, S. (2007) Lysine and/or phytase supplementation in the diet of *Penaeus monodon* (Fabricius) juveniles: Effect on growth, body composition and lipid profile. *Aquaculture* 265, 253-260.
48. Black, D. and Skinner, E. R. (1987) Changes in Plasma-Lipoproteins and Tissue Lipoprotein-Lipase and Salt-Resistant Lipase Activities during Spawning in the Rainbow-Trout (*Salmo-Gairdnerii* R). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 88, 261-267.
49. Blazer, V. S. (1992). Nutrition and disease resistance in fish. *Fish Dis.* 2, 309-323.
50. Blazer, V. S. and Wolke, R. E. (1984) Effect of Diet on the Immune-Response of Rainbow-Trout (*Salmo-Gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41, 1244-1247.
51. Bly, J. E., Quiniou, S. M. A. and Clem, L. W. (1997) Environmental effects on fish immune mechanisms. *Fish Vaccinology* 90, 33-43.
52. Boesgaard, L., Nielsen, M. E. and Rosenkilde, P. (1993) Moderate exercise decreases plasma cortisol levels in atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 106, 641-643.
53. Borlongan, I. G. and Coloso, R. M. (1993) Requirements of Juvenile Milkfish (*Chanos-Chanos Forsskal*) for Essential Amino-Acids (Vol 123, Pg 125, 1993). *J. Nutr.* 123, 972-972.
54. Boshra, H., Li, J. and Sunyer, J. O. (2006) Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20, 239-262.
55. Botana López, L. M., Landoni, M. F. and Martín-Jiménez, T. (2002) *Farmacología y terapéutica veterinaria*, McGraw-Hill, Madrid etc.
56. Bram L. and, I. C. (2006) Evolution of reproductive-immune interactions. *Integr. Comp. Biol.* 46, 1060-1071.
57. Bremer, J. (1990) The Role of Carnitine in Intracellular Metabolism. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 28, 297-301.
58. Brodtkorb, T., Rosenlund, G. and Lie, O. (1997) Effects of dietary levels of 20:5n-3 and 22:6n-3 on tissue lipid composition in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*, with emphasis on brain and eye. *Aquacult. Nutr.* 3, 175-187.
59. Brown, J. M., Halvorsen, Y. D., Lea-Currie, Y. R., Geigerman, C. and McIntosh, M. K. (2001) Trans-10, cis-12, but not cis-9, trans-11, conjugated linoleic acid attenuates lipogenesis in primary cultures of stromal vascular cells from human adipose tissue. *J. Nutr.* 131, 2316-2321.
60. Burrells, C., Williams, P. D., Southgate, P. J. and Wadsworth, S. L. (2001) Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds 2. Effects on vaccination, salt water transfer, growth rates and physiology of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 199, 171-184.
61. Caballero, M. J., Gallardo, G., Robaina, L. E., Montero, D., Fernández, A. J. and Izquierdo, M. S. (2006) Vegetable lipid sources affect in vitro biosynthesis of triacylglycerols and phospholipids in the intestine of sea bream (*Sparus aurata*). *Br. J. Nutr.* 95, 448-454.
62. Caballero, M. J., Izquierdo, M. S., Kjørsvik, E., Fernández, A. J. and Rosenlund, G. (2004) Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. *J. Fish Dis.* 27, 531-541.

63. Caballero, M. J., Izquierdo, M. S., Kjorsvik, E., Montero, D., Socorro, J., Fernández, A. J. and Rosenlund, G. (2003) Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture* 225, 325-340.
64. Caballero, M. J., Obach, A., Rosenlund, G., Montero, D., Gisvold, M. and Izquierdo, M. S. (2002) Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 214, 253-271.
65. Caballero, M. J., Torstensen, B. E., Robaina, L. E., Montero, D. and Izquierdo, M. S. (2006) Vegetable oils affect the composition of lipoproteins in sea bream (*Sparus aurata*). *Br. J. Nutr.* 96, 830-839.
66. Calder, P. C. (2008) The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids* 79, 101-108.
67. Calder, P. C. (1998) Dietary fatty acids and the immune system. *Nutr. Rev.* 56, S70-83.
68. Calder, P. C. (1995) Fatty-Acids, Dietary Lipids and Lymphocyte Functions. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 302-309.
69. Canario, A. V. M., J. C., M. P., D. and M. I.,P. (1998) The effect of stocking density on growth in the gilthead sea-bream, *Sparus aurata* (L.). *Aquacult. Res.* 29, 177-181.
70. Cannon, W. B. (1929) Bodily changes in Pain, Hunger, Fear and Rage. *Branford, Boston*.
71. Castell, J. D., Sinnhuber, R. O. and Lee, D. J. (1972) Essential Fatty-Acids in Diet of Rainbow-Trout (*Salmo-Gairdneri*) - Lipid-Metabolism Ad Fatty-Acid Composition. *J. Nutr.* 102, 93-&.
72. Castillo, J., Teles, M., Mackenzie, S. and Tort, L. (2009) Stress-related hormones modulate cytokine expression in the head kidney of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish & Shellfish Immunology [Fish Shellfish Immunol. ]*. Vol. 27 27, 493-499.
73. Cerezuela, R., Cuesta, A., Meseguer, J. and Angeles Esteban, M. (2009) Effects of dietary vitamin D3 administration on innate immune parameters of seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 26, 243-248.
74. Chapman, M. J. (1980) Animal Lipoproteins - Chemistry, Structure, and Comparative Aspects. *J. Lipid Res.* 21, 789-853.
75. Chen, D. and Ainsworth, A. J. (1992) Glucan Administration Potentiates Immune Defense-Mechanisms of Channel Catfish, *Ictalurus-Punctatus Rafinesque*. *J. Fish Dis.* 15, 295-304.
76. Chen, R. G., Lochmann, R., Goodwin, A., Praveen, K., Dabrowski, K. and Lee, K. J. (2003) Alternative complement activity and resistance to heat stress in golden shiners (*Notemigonus crysoleucas*) are increased by dietary vitamin C levels in excess of requirements for prevention of deficiency signs. *J. Nutr.* 133, 2281-2286.
77. Chen, R. G., Lochmann, R., Goodwin, A., Praveen, K., Dabrowski, K. and Lee, K. (2004) Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). *Aquaculture* 242, 553-569.

78. Cheng, Z. J. and Hardy, R. W. (2002) Effect of microbial phytase on apparent nutrient digestibility of barley, canola meal, wheat and wheat middlings, measured in vivo using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult. Nutr.* 8, 271-277.
79. Chien, L. T. and Hwang, D. F. (2001) Effects of thermal stress and vitamin C on lipid peroxidation and fatty acid composition in the liver of thornfish *Terapon jarbua*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 128, 91-97.
80. Choi, Y., Kim, Y. C., Han, Y. B., Park, Y., Pariza, M. W. and Ntambi, J. M. (2000) The trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid downregulates stearyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr.* 130, 1920-1924.
81. Chou, B. S. and Shiau, S. Y. (1999) Both n-6 and n-3 fatty acids are required for maximal growth of juvenile hybrid tilapia. *N. Am. J. Aquacult.* 61, 13-20.
82. Combs, G. F. (1998) *The Vitamins, Fundamental Aspects in Nutrition and Health. Academic Press, California, 2nd ed.* 107-153.
83. Cook, M. T., Hayball, P. J., Birdseye, L., Bagley, C., Nowak, B. F. and Hayball, J. D. (2003) Isolation and partial characterization of a pentraxin-like protein with complement-fixing activity from snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae) serum. *Developmental & Comparative Immunology* 27, 579-588.
84. Cook, M. T., Hayball, P. J., Hutchinson, W., Nowak, B. F. and Hayball, J. D. (2001) The efficacy of a commercial beta-glucan preparation, EcoActiva (TM), on stimulating respiratory burst activity of head-kidney macrophages from pink snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae). *Fish Shellfish Immunol.* 11, 661-672.
85. Coop, R. L., Huntley, J. F. and Smith, W. D. (1995) Effect of dietary protein supplementation on the development of immunity to *Ostertagia circumcincta* in growing lambs. *Res. Vet. Sci.* 59, 24-29.
86. Coop, R. L. and Kyriazakis, I. (1999) Nutrition-parasite interaction. *Vet. Parasitol.* 84, 187-204.
87. Couso, N., Castro, R., Magarinos, B., Obach, A. and Lamas, J. (2003) Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. *Aquaculture [Aquaculture]. Vol. 219* 219, 99-4, pp.
88. Cowey, C. B., Adron, J. W., Walton, M. J., Murray, J., Youngson, A. and Knox, D. (1981) Tissue Distribution, Uptake, and Requirement for Alpha-Tocopherol of Rainbow-Trout (*Salmo Gairdneri*) Fed Diets with a Minimal Content of Unsaturated Fatty-Acids. *J. Nutr.* 111, 1556-1567.
89. Cowey, C. B. (1994) Amino-Acid-Requirements of Fish - a Critical-Appraisal of Present Values. *Aquaculture* 124, 1-11.
90. Cowey, C. B. and Cho, C. Y. (1993) Nutritional-Requirements of Fish. *Proc. Nutr. Soc.* 52, 417-426.
91. Crespi, E. J. and Denver, R. J. (2004) Ontogeny of corticotropin-releasing factor effects on locomotion and foraging in the Western spadefoot toad (*Spea hammondi*). *Horm. Behav.* 46, 399-410.
92. Crockett, E. L. and Sidell, B. D. (1993) Substrate Selectivities Differ for Hepatic Mitochondrial and Peroxisomal Beta-Oxidation in an Antarctic Fish, *Notothenia-Gibberifrons*. *Biochem. J.* 289, 427-433.

93. Cubero, L. and Molinero, A. (1997) Handling, confinement and anaesthetic exposure induces changes in the blood and tissue immune characteristics of gilthead sea bream. *Dis. Aquat. Org.* 31, 89-94.
94. Cuesta, A., Ortuño, J., Rodríguez, A., Esteban, M. A. and Meseguer, J. (2002) Changes in some innate defence parameters of seabream (*Sparus aurata* L.) induced by retinol acetate. *Fish Shellfish Immunol.* 13, 279-291.
95. Cuesta, A., Rodríguez, A., Salinas, I., Meseguer, J. and Esteban, M. A. (2007) Early local and systemic innate immune responses in the teleost gilthead seabream after intraperitoneal injection of whole yeast cells. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 242-251.
96. Cuesta, A. and Vargas-Chacoff, L. (2007). Efecto de la temperatura y salinidad sobre parámetros humorales del sistema inmunitario de la dorada (*Sparus aurata* L.), XI Congreso Nacional de Acuicultura (Vigo, 24-28, Septiembre, 2007).
97. Cupps, T. R. and Fauci, A. S. (1982) Corticosteroid-mediated immunoregulation in man. *Immunol. Rev.* 65, 133-155.
98. Cutts, C. J., Metcalfe, N. B. and Taylor, A. C. (1998) Aggression and growth depression in juvenile Atlantic salmon: the consequences of individual variation in standard metabolic rate. *J. Fish Biol.* 52, 1026-1037.
99. Dalmo, R. A. and Seljelid, R. (1995) The Immunomodulatory Effect of Lps, Laminaran and Sulfated Laminaran [Beta 1,3)-D-Glucan] on Atlantic Salmon, *Salmo-Salar* L, Macrophages In-Vitro. *J. Fish Dis.* 18, 175-185.
100. Dalmo, R. A. and Bøgwald, J. (2008)  $\beta$ -glucans as conductors of immune symphonies. *Fish & Shellfish Immunology*, 25, 384-396.
101. Dannevig, B. H. and Norum, K. R. (1979) Esterification of Cholesterol in Fish Plasma - Studies on the Cholesterol Esterifying Enzyme in Plasma of Artic Char (*Salmo-Alpinus* L). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 63, 537-541.
102. Dautremepuits, C., Betoulle, S., Paris-Palacios, S. and Vernet, G. (2004) Humoral immune factors modulated by copper and chitosan in healthy or parasitised carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Aquatic Toxicology* 68, 325-338.
103. Davis, C. R., Okihiro, M. S. and Hinton, D. E. (2002) Effects of husbandry practices, gender, and normal physiological variation on growth and reproduction of Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquatic Toxicology* 60, 185-201.
104. Davis, L. E. and Schreck, C. B. (1997) The energetic response to handling stress in juvenile coho salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 126, 248-258.
105. Davis, T. L. O. (1986) Migration Patterns in Barramundi, *Lates-Calcarifer* (Bloch), in Vandiemmen Gulf, Australia, with Estimates of Fishing Mortality in Specific Areas. *Fisheries Research* 4, 243-258.
106. de Baulny, M. O., Quentel, C., Fournier, V., Lamour, F. and LeGouvello, R. (1996) Effect of long-term oral administration of beta-glucan as an immunostimulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *Scophthalmus maximus*. *Dis. Aquat. Org.* 26, 139-147.
107. Decamp, O., Moriarty, D. J. W. and Lavens, P. (2008) Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. *Aquacult. Res.* 39, 334-338.

108. Dedi, J., Takeuchi, T., Seikai, T. and Watanabe, T. (1995) Hypervitaminosis and Safe Levels of Vitamin-a for Larval Flounder (*Paralichthys-Olivaceus*) Fed Artemia Nauplii. *Aquaculture* 133, 135-146.
109. DeLany, J. P. and West, D. B. (2000) Changes in body composition with conjugated linoleic acid. *J. Am. Coll. Nutr.* 19, 487S-493S.
110. Demers, N. E. and Bayne, C. J. (1997) The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.* 21, 363-373.
111. Díaz-Rosales, P., Salinas, I., Rodriguez, A., Cuesta, A., Chabrilón, M., Balebona, M. C., Moriñigo, M. A., Esteban, M. A. and Meseguer, J. (2006) Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response after dietary administration of heat-inactivated potential probiotics. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 482-492.
112. Diez, A., Menoyo, D., Perez-Benavente, S., Calduch-Giner, J. A., de Celis, S. V. R., Obach, A., Favre-Krey, L., Boukouvala, E., Leaver, M. J., Tocher, D. R., Perez-Sanchez, J., Krey, G. and Bautista, J. M. (2007a) Conjugated linoleic acid affects lipid composition, metabolism, and gene expression in Gilthead sea bream (*Sparus aurata* L). *J. Nutr.* 137, 1363-1369.
113. Diez, A., Menoyo, D., Pérez-Benavente, S., Calduch-Giner, J. A., Vega-Rubin de Celis, S., Obach, A., Favre-Krey, L., Boukouvala, E., Leaver, M. J., Tocher, D. R., Pérez-Sanchez, J., Krey, G. and Bautista, J. M. (2007b) Conjugated linoleic acid affects lipid composition, metabolism, and gene expression in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L). *J. Nutr.* 137, 1363-1369.
114. Dietschy, J. M. (1998) Dietary fatty acids and the regulation of plasma low density lipoprotein cholesterol concentrations. *J. Nutr.* 128, 444-448S.
115. Djordjevic, B., Skugor, S., Jorgensen, S. M., Overland, M., Mydland, L. T. and Krasnov, A. (2009) Modulation of splenic immune responses to bacterial lipopolysaccharide in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed lentinan, a beta-glucan from mushroom *Lentinula edodes*. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 201-209.
116. Dimitroglou, A., Janssens, T. and Davies, S. (2006) Effect of BIO.MOS on sole (*Solea senegalensis*) gut integrity (histological perspectives). *Nutritional biotechnology in the feed and food industries:Proceedings of Alltech's 22nd annual symposium.*
117. Dimitroglou, A., Merrifield, D. L., Moate, R., Davies, S. J., Spring, P., Sweetman, J. and Bradley, G. (2009) Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Anim. Sci.* 87, 3226-3234.
118. Dossantos, J., Burkow, I. C. and Jobling, M. (1993) Patterns of Growth and Lipid Deposition in Cod (*Gadus-Morhua* L) Fed Natural Prey and Fish-Based Feeds. *Aquaculture* 110, 173-189.
119. Dupont-Nivet, M., Médale, F., Leonard, J., Le Guillou, S., Tiquet, F., Quillet, E. and Geurden, I. (2009) Evidence of genotype–diet interactions in the response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) clones to a diet with or without fishmeal at early growth. *Aquaculture* 295, 15-21.
120. Durve, V. S. and Lovell, R. T. (1982) Vitamin-C and Disease Resistance in Channel Catfish (*Ictalurus-Punctatus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39, 948-951.
121. Eisenberg, S. (1984) High-Density Lipoprotein Metabolism. *J. Lipid Res.* 25, 1017-1058.

122. Ellis, A. E. (2001) Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 827-839.
123. El-Mowafi, A., Ruohonen, K., Hevroy, E. M. and Espe, M. (2010) Impact of digestible energy levels at three different dietary amino acid levels on growth performance and protein accretion in Atlantic salmon. *Aquacult. Res.* 41, 373-384.
124. Engel, B. T. (1998) An historical and critical review of the articles on blood pressure published in Psychosomatic Medicine between 1939 and 1997. *Psychosom. Med.* 60, 682-696.
125. Engelsma, M. Y., Hougee, S., Nap, D., Hofenk, M., Rombout, J. H. W. M., van Muiswinkel, W. B. and Lidy Verburg-van Kemenade, B. M. (2003) Multiple acute temperature stress affects leucocyte populations and antibody responses in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 397-410.
126. Engelsma, M. Y., Huising, M. O., van Muiswinkel, W. B., Flik, G., Kwang, J., Savelkoul, H. F. J. and Verburg-van Kemenade, B. M. (2002) Neuroendocrine-immune interactions in fish: a role for interleukin-1. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 467-479.
127. Engstad, R. E. and Robertsen, B. (1994) Specificity of a Beta-Glucan Receptor on Macrophages from Atlantic Salmon (*Salmo-Salar* L). *Dev. Comp. Immunol.* 18, 397-408.
128. Engstad, R. E. and Robertsen, B. (1993) Recognition of Yeast-Cell Wall Glucan by Atlantic Salmon (*Salmo-Salar* L) Macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* 17, 319-330.
129. Erdal, J. I., Evensen, O., Kaurstad, O. K., Lillehaug, A., Solbakken, R. and Thorud, K. (1991) Relationship between diet and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after feeding various levels of ascorbic acid and omega-3 fatty acids. *Aquaculture* 98, 363-379.
130. Evans, M., Geigerman, C., Cook, J., Curtis, L., Kuebler, B. and McIntosh, M. K. (2000) Conjugated linoleic acid suppresses triglyceride accumulation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *Lipids* 35, 899-910.
131. Evans, M., Lin, X., Odle, J. and McIntosh, M. K. (2002) Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid increases fatty acid oxidation in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Nutr.* 132, 450-455.
132. Farndale, B. M., Bell, J. G., Bruce, M. P., Bromage, N. R., Oyen, F., Zanuy, S. and Sargent, J. R. (1999) Dietary lipid composition affects blood leucocyte fatty acid compositions and plasma eicosanoid concentrations in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 179, 335-350.
133. Farrell, A. P. and Munt, B. (1983) Cholesterol Levels in the Blood of Atlantic Salmonids. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* 75, 239-242.
134. Farrell, A. P., Saunders, R. L., Freeman, H. C. and Mommsen, T. P. (1986) Arteriosclerosis in Atlantic Salmon - Effects of Dietary-Cholesterol and Maturation. *Arteriosclerosis* 6, 453-461.
135. Figueiredo-Silva, A. C., Rema, P., Bandarra, N. M., Nunes, M. L. and Valente, L. M. P. (2005) Effects of dietary conjugated linoleic acid on growth, nutrient utilization, body composition, and hepatic lipogenesis in rainbow trout juveniles (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 248, 163-172.
136. Figueras, A., Santarem, M. M. and Novoa, B. (1998) Influence of the sequence of administration of beta-glucans and a *Vibrio damsela* vaccine on the immune response of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 64, 59-68.

137. Flik, G., Klaren, P. H. M., Van den Burg, E. H., Metz, J. R. and Huising, M. O. (2006) CRF and stress in fish. *General and Comparative Endocrinology* 146, 36-44.
138. Fonseca-Madrigal, J., Karalazos, V., Campbell, P. J., Bell, J. G. and Tocher, D. R. (2005) Influence of dietary palm oil on growth, tissue fatty acid compositions, and fatty acid metabolism in liver and intestine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult. Nutr.* 11, 241-250.
139. Foote, C. S. (1984) Chemistry of Active Oxygen Species. *Food Technol.* 38, 48-48.
140. Foote, C. S., Shook, F. C. and Abakerli, R. B. (1984) Characterization of Singlet Oxygen. *Meth. Enzymol.* 105, 36-47.
141. Fountoulaki, E., Vasilaki, A., Hurtado, R., Grigorakis, K., Karacostas, I., Nengas, I., Rigos, G., Kotzamanis, Y., Venou, B. and Alexis, M. N. (2009a) Fish oil substitution by vegetable oils in commercial diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.); effects on growth performance, flesh quality and fillet fatty acid profile. *Aquaculture [Aquaculture]*. Vol. 289 289, 317-4, pp.
142. Fountoulaki, E., Vasilaki, A., Hurtado, R., Grigorakis, K., Karacostas, I., Nengas, I., Rigos, G., Kotzamanis, Y., Venou, B. and Alexis, M. N. (2009b) Fish oil substitution by vegetable oils in commercial diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.); effects on growth performance, flesh quality and fillet fatty acid profile: Recovery of fatty acid profiles by a fish oil finishing diet under fluctuating water temperatures. *Aquaculture* 289, 317-326.
143. Fracalossi, D. M. and Lovell, R. T. (1994) Dietary-Lipid Sources Influence Responses of Channel Catfish (*Ictalurus-Punctatus*) to Challenge with the Pathogen *Edwardsiella-Ictaluri*. *Aquaculture* 119, 287-298.
144. Francis, G., Makkar, H. P. S. and Becker, K. (2001) Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, 197-227.
145. Fries, C. R. (1986) Effects of Environmental Stressors and Immunosuppressants on Immunity in *Fundulus-Heteroclitus*. *Am. Zool.* 26, 271-282.
146. Fujiki, K. and Yano, T. (1997) Effects of sodium alginate on the non-specific defence system of the common carp (*Cyprinus carpio* L). *Fish Shellfish Immunol.* 7, 417-427.
147. Furones, M. D., Alderman, D. J., Bucke, D., Fletcher, T. C., Knox, D. and White, A. (1992) Dietary Vitamin-E and the Response of Rainbow-Trout, *Oncorhynchus-Mykiss* (Walbaum), to Infection with *Yersinia-Ruckeri*. *J. Fish Biol.* 41, 1037-1041.
148. Galeotti, M. (1998) Some aspects of the application of immunostimulants and a critical review of methods for their evaluation. *J. Appl. Ichthyol.* 14, 189-199.
149. Gamperl, A. K., Vijayan, M. M. and Boutilier, R. G. (1994) Experimental control of stress hormone levels in fishes - techniques and applications. *Rev. Fish Biol. Fish.* 4, 215-255.
150. Ganga, R., Bell, J. G., Montero, D., Robaina, L. E., Caballero, M. J. and Izquierdo, M. S. (2005) Effect of dietary lipids on plasma fatty acid profiles and prostaglandin and leptin production in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 142, 410-418.
151. Gorjão, R., Azevedo-Martins, A. K., Rodrigues, H., Abdulkader, F., Arcisio-Miranda, M., Procopio, J. and Curi, R. (2009) Comparative effects of DHA and EPA on cell function. *Pharmacol. Ther.* 122, 56-64.

152. Genc, M. A., Aktas, M., Genc, E. and Yilmaz, E. (2007a) Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth, body composition and hepatopancreas histology of *Penaeus semisulcatus* (de Haan 1844). *Aquacult. Nutr.* 13, 156-161.
153. Genc, M. A., Yilmaz, E., Genc, E. and Aktas, M. (2007b) Effects of dietary mannan oligosaccharides (MOS) on growth, body composition, and intestine and liver histology of the hybrid Tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*). *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 59, 10-16.
154. Gerwick, L., Demers, N. E. and Bayne, C. J. (1999) Modulation of stress hormones in rainbow trout by means of anesthesia, sensory deprivation and receptor blockade. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 124, 329-334.
155. Geurden, I., Jutfelt, F., Olsen, R. and Sundell, K. S. (2009) A vegetable oil feeding history affects digestibility and intestinal fatty acid uptake in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.* 152, 552-559.
156. Gilman, C. I., Leusch, F. D. L., Breckenridge, W. C. and MacLatchy, D. L. (2003) Effects of a phytosterol mixture on male fish plasma lipoprotein fractions and testis P450scc activity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 130, 172-84
157. Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1997) The SREBP pathway: Regulation of cholesterol and fatty acid metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Faseb Journal* 11, A858-A858.
158. Grinde, B., Lie, O., Poppe, T. and Salte, R. (1988) Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture. *Aquaculture* 68, 299-304.
159. Grisdale-Helland, B., Helland, S. J. and Gatlin III, D. M. (2008) The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 283, 163-167.
160. Gross, R. L. and Newberne, P. M. (1980) Role of Nutrition in Immunological Function. *Physiol. Rev.* 60, 188-302.
161. Guderley, H. (2004) Metabolic responses to low temperature in fish muscle. *Biological Reviews* 79, 409-427.
162. Gurr, M. I. (1992) Dietary Lipids and Coronary Heart-Disease - Old Evidence, New Perspective. *Prog. Lipid Res.* 31, 195-243.
163. Gurure, R., Atkinson, J. and Moccia, R. D. (2007) Amino acid composition of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.) and the prediction of dietary requirements for essential amino acids. *Aquacult. Nutr.* 13, 266-272.
164. Halver, J. E. (2001) Research in fish nutrition. *Aquacult. Res.* 32, 611-614.
165. Hamre, K., Baeverfjord, G. and Harboe, T. (2005) Macronutrient composition of formulated diets for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) juveniles, II: protein/lipid levels at low carbohydrate. *Aquaculture* 244, 283-291.
166. Hamre, K., Ofsti, A., Naess, T., Nortvedt, R. and Holm, J. C. (2003) Macronutrient composition of formulated diets for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.) juveniles. *Aquaculture* 227, 233-244.
167. Hamre, K., Waagbo, R., Berge, R. K. and Lie, O. (1997) Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *Free Radical Biology and Medicine* 22, 137-149.

168. Hardie, L. J., Fletcher, T. C. and Secombes, C. J. (1990) The Effect of Vitamin-E on the Immune-Response of the Atlantic Salmon (*Salmo-Salar* L). *Aquaculture* 87, 1-13.
169. Harris, J. and Bird, D. J. (2000) Modulation of the fish immune system by hormones. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 77, 163-176.
170. Harris, L. E. and Kearl, L. C. (1976) International Network of Feed Information-Centers. *Feedstuffs* 48, 34-34.
171. Harris, L. E., Kearl, L. C. and Fannesbeck, P. V. (1981) International Feed Systems. *Utah Sci.* 42, 40-43.
172. Harris, W. S., Connor, W. E. and Mcmurry, M. P. (1983) The Comparative Reductions of the Plasma-Lipids and Lipoproteins by Dietary Poly-Unsaturated Fats - Salmon Oil Versus Vegetable-Oils. *Metabolism-Clinical and Experimental* 32, 179-184.
173. Haug, T., Ringo, E. and Pettersen, G. W. (1988) Total Lipid and Fatty-Acid Composition of Polar and Neutral Lipids in Different Tissues of Atlantic Halibut, *Hippoglossus-Hippoglossus* (L). *Sarsia* 73, 163-168.
174. Heinrichs, S. C. and Koob, G. F. (2004) Corticotropin-releasing factor in brain: A role in activation, arousal, and affect regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311, 427-440.
175. Henrique, M. M. F., Gouillou-Coustans, M. F. and Gomes, E. (2002) Effect of dietary ascorbic acid supplementation and chronic hypoxia on sea bream growth and vitamin C status. *J. Fish Biol.* 60, 442-452.
176. Hernandez, A. and Tort, L. (2003) Annual variation of complement, lysozyme and haemagglutinin levels in serum of the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Fish & Shellfish Immunology* 15, 479-481.
177. Hernandez, L. H. H., Teshima, S. I., Ishikawa, M., Alam, S., Koshio, S. and Tanaka, Y. (2005) Dietary vitamin A requirements of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquacult. Nutr.* 11, 3-9.
178. Hernandez, L. H. H., Teshima, S. I., Koshio, S., Ishikawa, M., Tanaka, Y. and Alam, M. S. (2007) Effects of vitamin A on growth, serum anti-bacterial activity and transaminase activities in the juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 262, 444-450.
179. Hernández, M. D., Martínez, F. J., Jover, M. and García García, B. (2007) Effects of partial replacement of fish meal by soybean meal in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) diet. *Aquaculture* 263, 159-167.
180. Hilton, J. W. (1983) Hypervitaminosis-a in Rainbow-Trout (*Salmo-Gairdneri*) - Toxicity Signs and Maximum Tolerable Level. *J. Nutr.* 113, 1737-1745.
181. Hoffman, A. F. (1976) The Interaction of Lipid Digestion Products with Micellar Bile Acid Solutions. In: Rommel, K., Bohmer, R. (Eds). 3-18.
182. Hung, S. S. O., Cho, C. Y. and Slinger, S. J. (1981) Effect of Oxidized Fish Oil, D1-Alpha-Tocopheryl Acetate and Ethoxyquin Supplementation on the Vitamin-E Nutrition of Rainbow-Trout (*Salmo-Gairdneri*) Fed Practical Diets. *J. Nutr.* 111, 648-657.
183. Iijima, N., Gotou, T. and Kayama, M. (1995) Isolation and Characterization of Serum-Lipoproteins in Red-Sea Bream. *Fisheries Science* 61, 297-303.

184. Iijima, N., Tanaka, S. and Ota, Y. (1998) Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.* 18, 59-69.
185. Illingwo, Dr, Portman, O. W., Robertso, Al and Magyar, W. A. (1973) Exchange of Phospholipids between Plasma Lipoproteins and Rapidly Dividing Human Cells Grown in Tissue-Culture. *Biochim. Biophys. Acta* 306, 422-436.
186. Iwama, G. K. (1991) Interactions between aquaculture and the environment. *Critical Reviews in Environmental Control* 21, 177-216.
187. Iwama, G. K., Mcgeer, J. C. and Pawluk, M. P. (1989) The effects of 5 fish anesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood-gases, cortisol, and adrenaline in rainbow-trout. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 67, 2065-2073.
188. Izquierdo, M. S. and Henderson, R. J. (1998) The determination of lipase and phospholipase activities in gut contents of turbot (*Scophthalmus maximus*) by fluorescence-based assays. *Fish Physiol. Biochem.* 19, 153-162.
189. Izquierdo, M. S., Montero, D., Robaina, L. E., Caballero, M. J., Rosenlund, G. and Gines, R. (2005) Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long terin period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture* 250, 431-444.
190. Izquierdo, M. S., Obach, A., Arantzamendi, L., Montero, D., Robaina, L. E. and Rosenlund, G. (2003) Dietary lipid sources for seabream and seabass: growth performance, tissue composition and flesh quality. *Aquacult. Nutr.* 9, 397-407.
191. Izquierdo, M. S., Socorro, J., Arantzamendi, L. and Hernandez-Cruz, C. M. (2000) Recent advances in lipid nutrition in fish larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 22, 97-107.
192. Janeway, C. A. (2005) Immunobiology : the immune system in health and disease. *Garland Science, cop. 2005* 55-59.
193. Jeney, G., Galeotti, M., Volpatti, D., Jeney, Z. and Anderson, D. P. (1997) Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture* 154, 1-15.
194. Jeney, G., Nemcsok, J., Jeney, Z. and Olah, J. (1992) Acute Effect of Sublethal Ammonia Concentrations on Common Carp (*Cyprinus-Carpio* L) .2. Effect of Ammonia on Blood-Plasma Transaminases (Got, Gpt), Gldh Enzyme-Activity, and Atp Value. *Aquaculture* 104, 149-156.
195. Jobling, M., Koskela, J. and Winberg, S. (1999) Feeding and growth of whitefish fed restricted and abundant rations: influences on growth heterogeneity and brain serotonergic activity. *J. Fish Biol.* 54, 437-449.
196. Jolly, C. A., Jiang, Y. H., Chapkin, R. S. and McMurray, D. N. (1997) Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids suppress murine lymphoproliferation, interleukin-2 secretion, and the formation of diacylglycerol and ceramide. *J. Nutr.* 127, 37-43.
197. Jordal, A. E., Torstensen, B. E., Tsoi, S., Tocher, D. R., Lall, S. P. and Douglas, S. E. (2005) Dietary rapeseed oil affects the expression of genes involved in hepatic lipid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Nutr.* 135, 2355-2361.
198. Jorgensen, J. B., Lunde, H. and Robertsen, B. (1993) Peritoneal and Head Kidney-Cell Response to Intraperitoneally Injected Yeast Glucan in Atlantic Salmon, *Salmo-Salar* L. *J. Fish Dis.* 16, 313-325.

199. Jover, M. (2007) *Alternativas de futuro para la producción de la dorada (Sparus aurata)*, Vigo -España ed., XI Congreso Nacional de Acuicultura /Vigo, 24-28 Septiembre.
200. Jung, S. H., Sim, D. S., Park, M. S., Jo, Q. T. and Kim, Y. C. (2003) Effects of formalin on haematological and blood chemistry in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquacult. Res.* 34, 1269-1275.
201. Kaushik, S. J., Cravedi, J. P., Lalles, J. P., Sumpster, J. P., Fauconneau, B. and Laroche, M. (1995) Partial Or Total Replacement of Fish-Meal by Soybean Protein on Growth, Protein-Utilization, Potential Estrogenic Or Antigenic Effects, Cholesterolemia and Flesh Quality in Rainbow-Trout, *Oncorhynchus-Mykiss*. *Aquaculture* 133, 257-274.
202. Kennedy, S. R., Bickerdike, R., Berge, R. K., Dick, J. R. and Tocher, D. R. (2007a) Influence of conjugated linoleic acid (CLA) or tetradecylthioacetic acid (TTA) on growth, lipid composition, fatty acid metabolism and lipid gene expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). *Aquaculture*, 272, 489-501.
203. Kennedy, S. R., Bickerdike, R., Berge, R., Porter, A. R. and Tocher, D. R. (2007b) Influence of dietary conjugated linoleic acid (CLA) and tetradecylthioacetic acid (TTA) on growth, lipid composition and key enzymes of fatty acid oxidation in liver and muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture*, 264, 372-382.
204. Kennedy, S. R., Campbell, P. J., Porter, A. R. and Tocher, D. R. (2005) Influence of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on lipid and fatty acid composition in liver and flesh of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 141, 168-178.
205. kentuckylake.com. (2007) [www.kentuckylake.com/.../pics/Fish-Anatomy.jpg](http://www.kentuckylake.com/.../pics/Fish-Anatomy.jpg).
206. Ketola, H. G. (1975b) Nutrition and minerals in fish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 3, 548-551.
207. Keusch, G. T. (1992) Cytokines, Metabolism, and Nutrition - Overview. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 200, 218-219.
208. Keusch, G. T. and Farthing, M. J. G. (1986) Nutrition and Infection. *Annu. Rev. Nutr.* 6, 131-154.
209. Kiessling, A., Kiessling, K. H., Storebakken, T. and Asgard, T. (1991) Changes in the Structure and Function of the Epaxial Muscle of Rainbow-Trout (*Oncorhynchus-Mykiss*) in Relation to Ration and Age .2. Activity of Key Enzymes in Energy-Metabolism. *Aquaculture* 93, 357-372.
210. Kiessling, A., Pickova, J., Johansson, L., Asgard, T., Storebakken, T. and Kiessling, K. H. (2001) Changes in fatty acid composition in muscle and adipose tissue of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age. *Food Chem.* 73, 271-284.
211. Kiessling, K. H. and Kiessling, A. (1993) Selective Utilization of Fatty-Acids in Rainbow-Trout (*Oncorhynchus-Mykiss* Walbaum) Red Muscle Mitochondria. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 71, 248-251.
212. Kilpi, M. K., Atosuo, J. T. and Lilius, E. E. (2009) Bacteriolytic activity of the alternative pathway of complement differs kinetically from the classical pathway. *Developmental & Comparative Immunology [Dev. Comp. Immunol. ]*. Vol. 33 33, 1102-1110.
213. Kiron, V., Fukuda, H., Takeuchi, T. and Watanabe, T. (1995) Essential Fatty-Acid Nutrition and Defense-Mechanisms in Rainbow-Trout *Oncorhynchus-Mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* 111, 361-367.

214. Kogan, G. and Kocher, A. (2007) Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livestock Science* 109, 161-165.
215. Korzan, W. J., Overli, O., Watt, M. J., Forster, G. L., Höglund, E. and Summers, C. H. (2002) Behavior in established social hierarchies are influenced by visual sympathetic signals. *Integrative and Comparative Biology* 42, 1259-1259.
216. Krogdahl, A., Hemre, G., Mommsen, T. P. (2005) Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquacult. Nutr.* 11, 103-122.
217. Kudrenko, B., Snape, N. and Barnes, A. C. (2009) Linear and branched beta(1-3) D-glucans activate but do not prime teleost macrophages in vitro and are inactivated by dilute acid: Implications for dietary immunostimulation. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 443-450.
218. Kumari, J. and Sahoo, P. K. (2006) Dietary immunostimulants influence specific immune response and resistance of healthy and immunocompromised Asian catfish *Clarias batrachus* to *Aeromonas hydrophila* infection. *Dis. Aquat. Org.* 70, 63-70.
219. Kumari, J. and Sahoo, P. K. (2005) High dietary vitamin C affects growth, non-specific immune responses and disease resistance in Asian catfish, *Clarias batrachus*. *Mol. Cell. Biochem.* 280, 25-33.
220. Laidley, C. W. and Leatherland, J. F. (1988a) Circadian studies of plasma cortisol, thyroid hormone, protein, glucose and ion concentration, liver glycogen concentration and liver and spleen weight in rainbow trout, *Salmo gairdneri richardson*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 89, 495-502.
221. Laidley, C. W. and Leatherland, J. F. (1988b) Circadian studies of plasma cortisol, thyroid hormone, protein, glucose and ion concentration, liver glycogen concentration and liver and spleen weight in rainbow trout, *Salmo gairdneri richardson*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 89, 495-502.
222. Laiz-Carrión, R., Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán, J. M., Martín del Río, M. P., Soengas, J. L. and Mancera, J. M. (2005) Growth performance of gilthead sea bream *Sparus aurata* in different osmotic conditions: Implications for osmoregulation and energy metabolism. *Aquaculture*, 250, 849-861.
223. Lall, S. P. and Lewis-McCrea, L. M. (2007) Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish — An overview. *Aquaculture* 267, 3-19.
224. Lall, S. P., Paterson, W. D., Hines, J. A. and Adams, N. J. (1985) Control of Bacterial Kidney-Disease in Atlantic Salmon, *Salmo-Salar L*, by Dietary Modification. *J. Fish Dis.* 8, 113-124.
225. Leaver, M.J., Villeneuve, L., Obach, A., Jensen, L., Bron, J., Tocher, D. and Taggart, J. (2008) Functional genomics reveals increases in cholesterol biosynthetic genes and highly unsaturated fatty acid biosynthesis after dietary substitution of fish oil with vegetable oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics* 9, 299.
226. Lee, S. M. (2001) Review of the lipid and essential fatty acid requirements of rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquacult. Res.* 32, 8-17.
227. Legendre, M., Kerdchuen, N., Corraze, G. and Bergot, P. (1995) Larval rearing of an African catfish *Heterobranchus longifilis* (Teleostei, Clariidae): Effect of dietary lipids on growth, survival and fatty acid composition of fry. *Aquat. Living Resour.* 8, 355-363.
228. Leger, C. (1990) Nutritional Fats, Composition and Physiology of Biological-Membranes - Information from the Biomembrane and Nutrition Conference - Paris, June 12-14, 1989. *Rev. Fr. Corps Gras* 37, 189-190.

229. Lemaire, P., Draï, P., Mathieu, A., Lemaire, S., Carriere, S., Giudicelli, J. and Lafaurie, M. (1991a) Changes with Different Diets in Plasma Enzymes (Got, Gpt, Ldh, Alp) and Plasma-Lipids (Cholesterol, Triglycerides) of Sea-Bass (*Dicentrarchus-Labrax*). *Aquaculture* 93, 63-75.
230. Lemaire, P., Draï, P., Mathieu, A., Lemaire, S., Carriere, S., Giudicelli, J. and Lafaurie, M. (1991b) Changes with Different Diets in Plasma Enzymes (Got, Gpt, Ldh, Alp) and Plasma-Lipids (Cholesterol, Triglycerides) of Sea-Bass (*Dicentrarchus-Labrax*). *Aquaculture* 93, 63-75.
231. Levine, S. & U.,H. (1991) What is Stress? *Stress, Neurobiology and Endocrinology* 3-21.
232. Lewis-McCrea, L. M. and Lall, S. P. (2007) Effects of moderately oxidized dietary lipid and the role of vitamin E on the development of skeletal abnormalities in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* 262, 142-155.
233. Li, M. H. and Lovell, R. T. (1992) Comparison of Satiated Feeding and Restricted Feeding of Channel Catfish with various Concentrations of Dietary-Protein in Production Ponds. *Aquaculture* 103, 165-175.
234. Li, Y. and Lovell, R. T. (1985) Elevated Levels of Dietary Ascorbic-Acid Increase Immune-Responses in Channel Catfish. *J. Nutr.* 115, 123-131.
235. Li, P. (2009) Dose-dependent influences of dietary beta-1,3-glucan on innate immunity and disease resistance of hybrid striped bass *Morone chrysops x Morone saxatilis*. *Aquacult. Res.* 40, 1578-1584.
236. Liao, C. H., Erdman, J. W., Voss, E. W. and Johnston, P. V. (1996) Dietary vitamin A deficiency and the immune system in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Nutr. Res.* 16, 279-292.
237. Lie, O., Evensen, O., Sorensen, A. and Froystad, E. (1989) Study on lysozyme in some fish species. *Dis Aquat Org* 6,1-5.
238. Lie, O., Lied, E. and Lambertsen, G. (1986) Liver Retention of Fat and of Fatty-Acids in Cod (*Gadus-Morhua*) Fed Different Oils. *Aquaculture* 59, 187-196.
239. Lie, O., Sandvin, A. and Waagbo, R. (1993) Influence of Dietary Fatty-Acids on the Lipid-Composition of Lipoproteins in Farmed Atlantic Salmon (*Salmo-Salar*). *Fish Physiol. Biochem.* 12, 249-260.
240. Lim, B. O., Yamada, K., Hung, P., Watanabe, T., Taniguchi, S. and Sugano, M. (1996) Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids and lectins on immunoglobulin production by spleen lymphocytes of Sprague-Dawley rats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 60, 1025-1027.
241. Lin, Y. H. and Shiau, S. Y. (2007) Effects of dietary blend of fish oil with corn oil on growth and non-specific immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquacult. Nutr.* 13, 137-144.
242. Liu, K. K. M., Barrows, F. T., Hardy, R. W. and Dong, F. M. (2004) Body composition, growth performance, and product quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing poultry fat, soybean/corn lecithin, or menhaden oil. *Aquaculture* 238, 309-328.
243. Lloris, D. and Meseguer, S. (2002) Recursos marins del Mediterrani: fauna i flora del mar català. 240 p. : il. ; 18 x 25 cm.

244. López, N., Cuzon, G., Gaxiola, G., Taboada, G., Valenzuela, M., Pascual, C., Sánchez, A. and Rosas, C. (2003) Physiological, nutritional, and immunological role of dietary  $\beta$  1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 224, 223-243.
245. Lovejoy, D. A. and Jahan, S. (2006) Phylogeny of the corticotropin-releasing factor family of peptides in the metazoa. *General and Comparative Endocrinology* 146, 1-8.
246. Magnadóttir, B. (2006) Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology* 20, 137-151.
247. Makol, A., Torrecillas, S., Fernández-Vaquero, A., Robaina, L., Montero, D., Caballero, M. J., Tort, L. and Izquierdo, M. (2009) Effect of conjugated linoleic acid on dietary lipids utilization, liver morphology and selected immune parameters in sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 154, 179-187.
248. Marsden, M. J., Freeman, L. C., Cox, D. and Secombes, C. J. (1996) Non-specific immune responses in families of Atlantic salmon, *Salmo salar*, exhibiting differential resistance to furunculosis. *Aquaculture* 146, 1-16.
249. Martins, D. A., Valente, L. M. P. and Lall, S. P. (2007) Effects of dietary lipid level on growth and lipid utilization by juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, L.). *Aquaculture* 263, 150-158.
250. Matsuo, K. and Miyazono, I. (1993) The Influence of Long-Term Administration of Peptidoglycan on Disease Resistance and Growth of Juvenile Rainbow-Trout. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59, 1377-1379.
251. Matteri, R. L. and Becker, B. A. (1994) Somatotroph, lactotroph and thyrotroph function in three-week-old gilts reared in a hot or cool environment. *Domestic Animal Endocrinology* 11, 217-226.
252. Matty, A. J. (1985) Nutrition and aquaculture. *Outlook Agric.* 14, 14-20.
253. Maule, A. G. and Schreck, C. B. (1991) Stress and cortisol treatment changed affinity and number of glucocorticoid receptors in leukocytes and gill of *coho salmon*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 84, 83-93.
254. Maule, A. G., Tripp, R. A., Kaattari, S. L. and Schreck, C. B. (1989) Stress alters immune function and disease resistance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Endocrinol.* 120, 135-142.
255. Maule, A. G., Joergensen, E. H., Vijayan, M. M. and Killie, J. (2005) Aroclor 1254 exposure reduces disease resistance and innate immune responses in fasted Arctic charr. *Environmental Toxicology and Chemistry [Environ. Toxicol. Chem. J. Vol. 24]* 24, 117-124.
256. Mazon, A. F., Nolan, D. T., Lock, R. A. C., Fernandes, M. N. and Wendelaar Bonga, S. E. (2004) A short-term in vitro gill culture system to study the effects of toxic (copper) and non-toxic (cortisol) stressors on the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Toxicol. In Vitro.* 18, 691-701.
257. Mazur, C. F. and Iwama, G. K. (1993) Effect of handling and stocking density on hematocrit, plasma-cortisol, and survival in wild and hatchery-reared chinook salmon (*Oncorhynchus-tshawytscha*) *Aquaculture* 112, 291-299.

258. McKay, L. I. and Cidlowski, J. A. (1999) Molecular control of immune. *Endocr. Rev.* 20, 435-459.
259. Menoyo, D., Izquierdo, M. S., Robaina, L. E., Gines, R., Lopez-Bote, C. J. and Bautista, J. M. (2004) Adaptation of lipid metabolism, tissue composition and flesh quality in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to the replacement of dietary fish oil by linseed and soyabean oils. *Br. J. Nutr.* 92, 41-52.
260. Menoyo, D., Lopez-Bote, C. J., Bautista, J. M. and Obach, A. (2003) Growth, digestibility and fatty acid utilization in large Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed varying levels of n-3 and saturated fatty acids. *Aquaculture* 225, 295-307.
261. Meseguer, J. (1992) Effects of dietary oxidized fish oil and antioxidant deficiency on histopathology, haematology, tissue and plasma biochemistry of sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquat. Living Resour* 5, 205-214.
262. Mock, A. and Peters, G. (1990) Lysozyme activity in rainbow-trout, *oncorhynchus-mykiss* (walbaum), stressed by handling, transport and water-pollution. *J. Fish Biol.* 37, 873-885.
263. Mommsen, T. P., Vijayan, M. M. and Moon, T. W. (1999) Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.* 9, 211-268.
264. Montero, D., Fernandez-Vaquero, A., Tort, L., Caballero, M. J. and Izquierdo, M. S. (2005) Efecto de los inmunoestimulantes en la resistencia a estrés en dorada (*Sparus aurata*) y lubina (*Dicentrarchus labrax*). Comunicación oral. X Congreso Nacional de Acuicultura. GANDIA 2005.
265. Montero, D., Grasso, V., Izquierdo, M. S., Ganga, R., Real, F., Tort, L., Caballero, M. J. and Acosta, F. (2008) Total substitution of fish oil by vegetable oils in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: Effects on hepatic Mx expression and some immune parameters. *Fish & Shellfish Immunology* 24, 147-155.
266. Montero, D., Izquierdo, M. S., Tort, L., Robaina, L. E. and Vergara, J. M. (1999) High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiol. Biochem.* 20, 53-60.
267. Montero, D., Kalinowski, T., Obach, A., Robaina, L. E., Tort, L., Caballero, M. J. and Izquierdo, M. S. (2003) Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health. *Aquaculture* 225, 353-370.
268. Montero, D., Marrero, M., Izquierdo, M. S., Robaina, L. E., Vergara, J. M. and Tort, L. (1999) Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture* 171, 269-278.
269. Montero, D., Socorro, J., Tort, L., Caballero, M. J., Robaina, L. E., Vergara, J. M. and Izquierdo, M. S. (2004) Glomerulonephritis and immunosuppression associated with dietary essential fatty acid deficiency in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., juveniles. *J. Fish Dis.* 27, 297-306.
270. Montero, D., Tort, L., Izquierdo, M. S., Robaina, L. E. and Vergara, J. M. (1998) Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead seabream caused by alpha-tocopherol and n-3 HUFA dietary deficiencies. *Fish Physiol. Biochem.* 18, 399-407.
271. Moon, T. W., Busby, E. R., Cooper, G. A. and Mommsen, T. P. (1999) Fish hepatocyte glycogen phosphorylase - a sensitive indicator for hormonal modulation. *Fish Physiol. Biochem.* 21, 15-24.

272. Moreira, I. S., Peres, H., Couto, A., Enes, P. and Oliva-Teles, A. (2008) Temperature and dietary carbohydrate level effects on performance and metabolic utilisation of diets in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 274, 153-160.
273. Moriarty, D. J. W. (1998) Control of luminous *Vibrio species* in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164, 351-358.-351-358.
274. Mourente, G., Diaz-Salvago, E., Bell, J. G. and Tocher, D. R. (2002) Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidised oil: attenuation by dietary vitamin E. *Aquaculture* 214, 343-361.
275. Mourente, G., Diaz-Salvago, E., Tocher, D. R. and Bell, J. G. (2000) Effects of dietary polyunsaturated fatty acid/vitamin E (PUFA). *Fish Physiol. Biochem.* 23, 337-351.
276. Mourente, G., Dick, J. R., Bell, J. G. and Tocher, D. R. (2005) Effect of partial substitution of dietary fish oil by vegetable oils on desaturation and beta-oxidation of [1-C-14]18 : 3n-3 (LNA) and [1-C-14]20 : 5n-3 (EPA) in hepatocytes and enterocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 248, 173-186.
277. Mourente, G., Good, J. E. and Bell, J. G. (2005) Partial substitution of fish oil with rapeseed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E-2 and F-2 alpha, immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Aquacult. Nutr.* 11, 25-40.
278. Mulero, I., Garcia-Ayala, A., Meseguer, J. and Mulero, V. (2007) Maternal transfer of immunity and ontogeny of autologous immunocompetence of fish: A minireview. *Aquaculture* 268, 244-250.
279. Mulero, V., Esteban, M. A., Muñoz, J. L. and Meseguer, J. (1998b) Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 8, 49-62.
280. Mundheim, H., Aksnes, A. and Hope, B. (2004) Growth, feed efficiency and digestibility in salmon (*Salmo salar* L.) fed different dietary proportions of vegetable protein sources in combination with two fish meal qualities. *Aquaculture* 237, 315-331.
281. Munkittrick, K. R., Miller, P. A., Barton, D. R. and Dixon, D. G. (1991) Altered performance of white sucker populations in the manitouwadge chain of lakes is associated with changes in benthic macroinvertebrate communities as a result of copper and zinc contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 21, 318-326.
282. Murakami, Y. (1970) *Hiroshimaken Tansuigyo Shidosho* 9, 33-45.
283. Murray, C. K. and Fletcher, T. C. (1976) The immuno histochemical localization of lysozyme in plaice *pleuronectes platessa* tissues. *J. Fish Biol.* 9, 329-334.
284. Nakanishi, Y., Kodama, H., Murai, T., Mikami, T. and Izawa, H. (1991) Activation of Rainbow-Trout Complement by C-Reactive Protein. *Am. J. Vet. Res.* 52, 397-401.
285. Nakano, T. and Tomlinso, N. (1967) Catecholamine and carbohydrate concentrations in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in relation to physical disturbance. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 24, 1701-&.
286. Nanton, D. A., Lall, S. P. and McNiven, M. A. (2001) Effects of dietary lipid level on liver and muscle lipid deposition in juvenile haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L. *Aquacult. Res.* 32, 225-234.
287. Nanton, D. A., Lall, S. P., Ross, N. W. and McNiven, M. A. (2003) Effect of dietary lipid level on fatty acid  $\beta$ -oxidation and lipid composition in various tissues of haddock,

*Melanogrammus aeglefinus* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 135, 95-108.

288. Narnaware, Y. K. and Baker, B. I. (1996) Evidence That Cortisol May Protect against the Immediate Effects of Stress on Circulating Leukocytes in the Trout. *General and Comparative Endocrinology* 103, 359-366.
289. Navarre, O. and Halver, J. E. (1989) Disease Resistance and Humoral Antibody-Production in Rainbow-Trout Fed High-Levels of Vitamin-C. *Aquaculture* 79, 207-221.
290. Nayak, D. K., Asha, A., Shankar, K. M. and Mohan, C. (2004) Evaluation of biofilm of *Aeromonas hydrophila* for oral vaccination of *Clarias batrachus* - a carnivore model. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 613-619.
291. Nelson, J. S. (1999) Editorial and introduction: The species concept in fish biology. *Rev. Fish Biol. Fish.* 9, 277-280.
292. Ng, W. K. (2002) Potential of palm oil utilisation in aquaculture feeds. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 11, S473-S476.
293. Ng, W. K., Lim, P. K. and Boey, P. L. (2003) Dietary lipid and palm oil source affects growth, fatty acid composition and muscle alpha-tocopherol concentration of African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture* 215, 229-243.
294. Ng, W. K., Sigholt, T. and Bell, J. G. (2004a) The influence of environmental temperature on the apparent nutrient and fatty acid digestibility in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed finishing diets containing different blends of fish oil, rapeseed oil and palm oil. *Aquacult. Res.* 35, 1228-1237.
295. Ng, W. K., Wang, Y., Ketchimenin, P. and Yuen, K. H. (2004b) Replacement of dietary fish oil with palm fatty acid distillate elevates tocopherol and tocotrienol concentrations and increases oxidative stability in the muscle of African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture* 233, 423-437.
296. Nikinmaa, M. and Soivio, A. (1982) Blood-oxygen transport of hypoxic *salmo-gairdneri*. *J. Exp. Zool.* 219, 173-178.
297. Nikinmaa, M., Soivio, A. and Railo, E. (1981) Blood-volume of *salmo-gairdneri* - influence of ambient-temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* 69, 767-769.
298. Nilsson, S. (1984) Adrenergic control-systems in fish. *Marine Biology Letters* 5, 127-146.
299. Nordgarden, U., Torstensen, B. E., Froyland, L., Hansen, T. and Hemre, G. I. (2003) Seasonally changing metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) II - beta-oxidation capacity and fatty acid composition in muscle tissues and plasma lipoproteins. *Aquacult. Nutr.* 9, 295-303.
300. Nose, T. (1972) *Suisan Zoshoku*. *Aquaculture* 20, 289.
301. NRC (National Research Council). (1993). Nutrient Requirements of Fish. *National Academic Press, Washington D.C. USA* 21-25.
302. Nunes, E. A., Bonatto, S. J., de Oliveira, H. H. P., Rivera, N. L. M., Maiorka, A., Krabbe, E. L., Tanhoffer, R. A. and Fernandes, L. C. (2008) The effect of dietary supplementation with 9-cis:12-trans and 10-trans:12-cis conjugated linoleic acid (CLA) for nine months on serum cholesterol, lymphocyte proliferation and polymorphonuclear cells function in Beagle dogs. *Research in Veterinary Science*, 84, 62-67.

303. Ogino, C. and Kamizono, M. (1976) Nutrition in fish. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 42, 71-75.
304. Ogino, C., Takeuchi, L., Takeda, H. and Watanabe, T. (1979) Mineral Requirements in Fish .8. Availability of Dietary Phosphorus in Carp and Rainbow-Trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 45, 1527-1532.
305. Ohnuki, K., Haramizu, S., Ishihara, K. and Fushiki, T. (2001) Increased energy metabolism and suppressed body fat accumulation in mice by a low concentration of conjugated linoleic acid. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 65, 2200-2204.
306. Oku, H., Wongtangtintharn, S., Iwasaki, H. and Toda, T. (2003) Conjugated linoleic acid (CLA) inhibits fatty acid synthetase activity in vitro. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 67, 1584-1586.
307. Olli, J. J., Hjelmeland, K. and Krogdahl, A. (1994) Soybean Trypsin-Inhibitors in Diets for Atlantic Salmon (*Salmo-Salar*, L) - Effects on Nutrient Digestibilities and Trypsin in Pyloric Ceca Homogenate and Intestinal Content. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* 109, 923-928.
308. Olsen, R. E., Dragnes, B. T., Myklebust, R. and Ringo, E. (2003) Effect of soybean oil and soybean lecithin on intestinal lipid composition and lipid droplet accumulation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *Fish Physiol. Biochem.* 29, 181-192.
309. Olsen, R. E. and Henderson, R. J. (1997) Muscle fatty acid composition and oxidative stress indices of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), in relation to dietary polyunsaturated fatty acid levels and temperature. *Aquacult. Nutr.* 3, 227-238.
310. Olsen, R. E., Myklebust, R., Kaino, T. and Ringo, E. (1999) Lipid digestibility and ultrastructural changes in the enterocytes of Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.) fed linseed oil and soybean lecithin. *Fish Physiol. Biochem.* 21, 35-44.
311. Olsen, R. E., Myklebust, R., Ringo, E. and Mayhew, T. M. (2000) The influences of dietary linseed oil and saturated fatty acids on caecal enterocytes in Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.): a quantitative ultrastructural study. *Fish Physiol. Biochem.* 22, 207-216.
312. Ortuño, J., Cuesta, A., Angeles Esteban, M. and Meseguer, J. (2001) Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 79, 167-180.
313. Ortuño, J., Esteban, M. A. and Meseguer, J. (2003/2) The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 14, 145-156.
314. Ortuño, J., Esteban, M. A. and Meseguer, J. (2000) High dietary intake of alpha-tocopherol acetate enhances the non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 10, 293-307.
315. Ortuño, J., Esteban, M. A. and Meseguer, J. (1999) Effect of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 9, 429-443.
316. Overli, O., Harris, C. A. and Winberg, S. (1999) Short-term effects of fights for social dominance and the establishment of dominant-subordinate relationships on brain monoamines and cortisol in rainbow trout. *Brain Behav. Evol.* 54, 263-275.
317. Overli, O., Korzan, W. J., Larson, E. T., Winberg, S., Lepage, O., Pottinger, T. G., Renner, K. J. and Summers, C. H. (2004) Behavioral and neuroendocrine correlates of displaced aggression in trout. *Horm. Behav.* 45, 324-329.

318. Overli, O., Pottinger, T. G., Carrick, T. R., Overli, E. and Winberg, S. (2001) Brain monoaminergic activity in rainbow trout selected for high and low stress responsiveness. *Brain Behav. Evol.* 57, 214-224.
319. Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S. and Sugita, H. (2004) Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102, 379-388.
320. Panush, R. S. and Delafuente, J. C. (1985) Vitamins and immunocompetence. *World Rev. Nutr. Diet.* 45, 97-132.
321. Panserat, S., Hortopan, G. A., Plagnes-Juan, E., Kolditz, C., Lansard, M., Skiba-Cassy, S., Esquerre, D., Geurden, I., Medale, F., Kaushik, S. and Corraze, G. (2009) Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture [Aquaculture]*. Vol. 294 294, 123-2, pp.
322. Parihar, M. S., Dubey, A. K., Javeri, T. and Prakash, P. (1996) Changes in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity, ascorbic acid and phospholipid content in liver of freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to elevated temperature. *J. Therm. Biol.* 21, 323-330.
323. Parks, J. S., Huggins, K. W., Gebre, A. K. and Burleson, E. R. (2000) Phosphatidylcholine fluidity and structure affect lecithin : cholesterol acyltransferase activity. *J. Lipid Res.* 41, 546-553.
324. Payan, D. G., Wong, M. Y. S., Chernovrogan, T., Gold, W. M., Pickett, W. C. and Goetzl, E. J. (1986) Specific Alterations in Leukocyte Function Associated with Ingestion of Eicosapentaenoic Acid (Epa) by Asthmatics. *J. Allergy Clin. Immunol.* 77, 176-176.
325. Peddie, S., Zou, J. and Secombes, C. J. (2002) Immunostimulation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intraperitoneal administration of Ergosan. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 86, 101-113.
326. Peng, S., Chen, L., Qin, J. G., Hou, J., Yu, N., Long, Z., Ye, J. and Sun, X. (2008) Effects of replacement of dietary fish oil by soybean oil on growth performance and liver biochemical composition in juvenile black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. *Aquaculture [Aquaculture]*. Vol. 276 276, 154-4, pp.
327. Pepels, P. P. L. M. and Balm, P. H. M. (2004) Ontogeny of corticotropin-releasing factor and of hypothalamic-pituitary-interrenal axis responsiveness to stress in tilapia (*Oreochromis mossambicus*; Teleostei). *Gen. Comp. Endocrinol.* 139, 251-265.
328. Pepels, P. P. L. M., Pesman, G., Korsten, H., Wendelaar Bonga, S. E. and Balm, P. H. M. (2002) Corticotropin-releasing hormone (CRH) in the teleost fish *Oreochromis mossambicus* (tilapia): in vitro release and brain distribution determined by a novel radioimmunoassay. *Peptides* 23, 1053-1062.
329. Peres, H. and Oliva-Teles, A. (2007) Effect of the dietary essential amino acid pattern on growth, feed utilization and nitrogen metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 267, 119-128.
330. Perez-Jimenez, A., Hidalgo, M. C., Morales, A. E., Arizcun, M., Abellan, E. and Cardenete, G. (2009) Use of different combinations of macronutrients in diets for dentex (*Dentex dentex*): Effects on intermediary metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 152, 314-321.

331. Perry, S. F., Reid, S. G., Gilmour, K. M., Bojink, C. L., Lopes, J. M., Milsom, W. K. and Rantin, F. T. (2004) A comparison of adrenergic stress responses in three tropical teleosts exposed to acute hypoxia. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 287, R188-R197.
332. Pickering, A. D., Pottinger, T. G., Sumpter, J. P., Carragher, J. F. and Le Bail, P. Y. (1991) Effects of acute and chronic stress on the levels of circulating growth hormone in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83, 86-93.
333. Piedecausa, M. A., Mazón, M. J., García García, B. and Hernández, M. D. (2007/3/6) Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils in the diets of sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Aquaculture* 263, 211-219.
334. Poston, H. A., Combs, G. F. and Leibovitz, L. (1976) Vitamin-E and Selenium Interrelations in Diet of Atlantic Salmon (*Salmo-Salar*) - Gross, Histological and Biochemical Deficiency Signs. *J. Nutr.* 106, 892-904.
335. Pottinger, T. G., Balm, P. H. M. and Pickering, A. D. (1995) Sexual maturity modifies the responsiveness of the pituitary-interrenal axis to stress in male rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 98, 311-320.
336. Provincia di Venezia.  
<http://www.provincia.venezia.it/cacciapesca/manifest/pescimare/orata.gif>.
337. Pulsford, A. L., Crampe, M., Langston, A. and Glynn, P. J. (1995) Modulatory Effects of Disease, Stress, Copper, Tbt and Vitamin-E on the Immune-System of Flatfish. *Fish Shellfish Immunol.* 5, 631-643.
338. Raisz, L. G. (1993) Bone Cell Biology - New Approaches and Unanswered Questions. *Journal of Bone and Mineral Research* 8, S457-S465.
339. Regost, C., Arzel, J., Cardinal, M., Rosenlund, G. and Kaushik, S. J. (2003a) Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in Turbot (*Psetta maxima*) 2. Flesh quality properties. *Aquaculture* 220, 737-747.
340. Regost, C., Arzel, J., Robin, J., Rosenlund, G. and Kaushik, S. J. (2003b) Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*) - 1. Growth performance, flesh fatty acid profile, and lipid metabolism. *Aquaculture* 217, 465-482.
341. Reid, S. G., Bernier, N. J. and Perry, S. F. (1998) The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 120, 1-27.
342. Reid, G. (2006) Safe and efficacious probiotics: what are they? *Trends in Microbiology [Trends Microbiol.]. Vol. 14* 14, 348-352.
343. Reinecke, M. (2010) Insulin-like Growth Factors and Fish Reproduction. *Biol. Reprod.* 82, 656-661.
344. Rekiel, A., Wiecek, J., Bielecki, W., Gajewska, J., Cichowicz, M., Kulisiewicz, J., Batorska, M., Roszkowski, T. and Beyga, K. (2007) Effect of Addition of Feed Antibiotic Flavomycinor Prebiotic BIO-MOS on Production Results of Fatteners, Blood BiochemicalParameters, Morphometric Indices of Intestine and Composition of Microflora. *Arch. Tierz. Dummerstorf* 50, 172-180.
345. Rice, P. J., Adams, E. L., Ozment-Skelton, T., Gonzalez, A. J., Goldman, M. P., Lockhart, B. E., Barker, L. A., Breuel, K. F., Deponti, W. K., Kalbfleisch, J. H., Ensley, H. E., Brown, G. D., Gordon, S. and Williams, D. L. (2005) Oral delivery and gastrointestinal

- absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 1079-1086.
346. Richard, N., Kaushik, S. and Larroque, L. (2006b) Replacing dietary fish oil by vegetable oils has little effects on lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr* 96, 299-309.
  347. Richard, N., Mourente, G., Kaushik, S. and Corraze, G. (2006) Replacement of a large portion of fish oil by vegetable oils does not affect lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*. Vol. 261 261, 1077-1087.
  348. Richardson, N. L., Higgs, D. A. and Beames, R. M. (1986) The Susceptibility of Juvenile Chinook Salmon (*Oncorhynchus-Tshawytscha*) to Cataract Formation in Relation to Dietary-Changes in Early Life. *Aquaculture* 52, 237-243.
  349. Ricque Marie, D., Cruz Suárez, L. E., Zavala-Chavez, B. M., Nieto- Lopez, M. G., Guajardo, C., Tapia-Salazar, M., McCallum, I. M. and Newkirk, R. (2004). Effect of a phytase product on protein and phosphorus digestibility in shrimp *Litopenaeus vannamei* fed an air classified pea protein flour (Ppf) based diet. In: Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U.González, M. (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII. Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*.
  350. Ristori, M. T. and Laurent, P. (1985) Plasma-catecholamines and glucose during moderate exercise in the trout - comparison with bursts of violent activity. *Exp. Biol.* 44, 247-253.
  351. Ribas, L., Planas, J. V., Barton, B. A., Monetti, C., Bernadini, G., Saroglia, A., Tort, L. and MacKenzie, S. (2004) A differentially expressed enolase gene isolated from the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) under high-density conditions is up-regulated in brain after in vivo lipopolysaccharide challenge. *Aquaculture* 241, 195-206.
  352. Robaina, L. E., Izquierdo, M. S., Moyano, F. J., Socorro, J., Vergara, J. M. and Montero, D. (1998) Increase of the dietary n-3/n-6 fatty acid ratio and addition of phosphorus improves liver histological alterations induced by feeding diets containing soybean meal to gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 161, 281-293.
  353. Robaina, L. E., Izquierdo, M. S., Moyano, F. J., Socorro, J., Vergara, J. M., Montero, D. and Fernandez-Palacios, H. (1995) Soybean and Lupin Seed Meals as Protein-Sources in Diets for Gilthead Seabream (*Sparus-Aurata*) - Nutritional and Histological Implications. *Aquaculture* 130, 219-233.
  354. Roberts Ronald J. (1981) Patología de los peces. *Mundi-Prensa* 1981
  355. Roberts, M. L., Davies, S. J. and Pulsford, A. L. (1995) The influence of ascorbic acid (vitamin C) on non-specific immunity in the turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 5, 27-38.
  356. Robertsen, B., Rorstad, G., Engstad, R. E. and Raa, J. (1990) Enhancement of Nonspecific Disease Resistance in Atlantic Salmon, *Salmo-Salar* L, by a Glucan from *Saccharomyces-Cerevisiae* Cell-Walls. *J. Fish Dis.* 13, 391-400.
  357. Røed, K. H., Brun, E., Larsen, H. J. and Refstie, T. (1990) The genetic influence on serum haemolytic activity in rainbow trout. *Aquaculture* 85, 109-117.
  358. Røed, K. H., Fevolden, S. - and Fjalestad, K. T. (2002) Disease resistance and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for lysozyme activity. *Aquaculture* 209, 91-101.

359. Røed, K. H., Larsen, H. J. S., Linder, R. D. and Refstie, T. (1993) Genetic variation in lysozyme activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 109, 237-244.
360. Rosenlund, G., Obach, A., Sandberg, M. G., Standal, H. and Tveit, K. (2001) Effect of alternative lipid sources on long-term growth performance and quality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquacult. Res.* 32, 323-328.
361. Rotllant, J., Arends, R. J., Mancera, J. M., Flik, G., Bonga, S. E. W. and Tort, L. (2000a) Inhibition of HPI axis response to stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) with physiological plasma levels of cortisol. *Fish Physiol. Biochem.* 23, 13-22.
362. Rotllant, J., Balm, P. H. M., Ruane, N. M., Perez-Sanchez, J., Wendelaar Bonga, S. E. and Tort, L. (2000b) Pituitary proopiomelanocortin-derived peptides and hypothalamus-pituitary-interrenal axis activity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during prolonged crowding stress: Differential regulation of adrenocorticotropin hormone and alpha-melanocyte-stimulating hormone release by corticotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 119, 152-163.
363. Rotllant, J., Pavlidis, M., Kentouri, M., Adad, M. E. and Tort, L. (1997) Non-specific immune responses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress. *Aquaculture* 156, 279-290.
364. Rotllant, J. and Tort, L. (1997) Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. *J. Fish Biol.* 51, 21-28.
365. Ruff, N., Fitzgerald, R. D., Cross, T. F., Hamre, K. and Kerry, J. P. (2003) The effect of dietary vitamin E and C level on market-size turbot (*Scophthalmus maximus*) fillet quality. *Aquacult. Nutr.* 9, 91-103.
366. Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J. A., Prunet, P. and Pérez-Sánchez, J. (2009) Dynamics of liver GH/IGF axis and selected stress markers in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) exposed to acute confinement: Differential stress response of growth hormone receptors. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 154, 197-203
367. Sahoo, P. K., Mahapatra, K. D., Saha, J. N., Barat, A., Sahoo, M., Mohanty, B. R., Gjerde, B., Ødegård, J., Rye, M. and Salte, R. (2008) Family association between immune parameters and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection in the Indian major carp, *Labeo rohita*. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 163-169.
368. Sahoo, P. K., Meher, P. K., Mahapatra, K. D., Saha, J. N., Jana, R. K. and Reddy, P. V. G. K. (2004) Immune responses in different fullsib families of Indian major carp, *Labeo rohita*, exhibiting differential resistance to *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture* 238, 115-125.
369. Sahoo, P. K. and Mukherjee, S. C. (2002) The effect of dietary immunomodulation upon *Edwardsiella tarda* vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp (*Labeo rohita*). *Fish Shellfish Immunol.* 12, 1-16.
370. Sahoo, P. K. and Mukherjee, S. C. (2001) Effect of dietary beta-1,3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B-1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita* Hamilton). *Fish Shellfish Immunol.* 11, 683-695.
371. Sakai, M. (1999) Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172, 63-92.
372. Saleh, G., Eleraky, W. and Gropp, J. M. (1995) A short note on the effects of vitamin A hypervitaminosis and hypovitaminosis on health and growth of *Tilapia nilotica*

- (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Ichthyology-Zeitschrift Fur Angewandte Ichthyologie* 11, 382-385.
373. Salinas, I., Cuesta, A., Esteban, M. Á and Meseguer, J. (2005) Dietary administration of *Lactobacillus delbrückii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. *Fish & Shellfish Immunology* 19, 67-77.
  374. Sankaran K, G. S. (1972) On the variation in the catalytic activity of lysozyme in fishes. *Indian J Biochem Biophys.* 9, 162-165.
  375. Santulli, A., Messina, C., Modica, A., Curatolo, A. and DAmelio, V. (1996) Lipid and apolipoprotein composition of lipoproteins of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 114, 321-326.
  376. Sarder, M. R. I., Thompson, K. D., Penman, D. J. and McAndrew, B. J. (2001) Immune responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) clones: I. Non-specific responses. *Developmental & Comparative Immunology* 25, 37-46.
  377. Sargent, J. R., Tocher, D. R. and Bell, J. G. (2002) Fish Nutrition. 3rd edition 182-246.
  378. Saurabh, S. (2008) Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquacult. Res.* 39, 223-239.
  379. Schreck, C. B. (1982) Stress and rearing of salmonids. *Aquaculture* 28, 241-249.
  380. Secombes, C. J., Hardie, L. J. and Daniel, G. (1996) Cytokines in fish: an update. *Fish & Shellfish Immunology* 6, 291-304.
  381. Selye, H. (1950) Stress. *Acta, Montreal.*
  382. Sheldon, W. H. and Blazer, V. S. (1991) Influence of dietary lipid and temperature on bactericidal activity of channel catfish macrophages. *J Aquat Anim Health* 3, 87-93.
  383. Sheridan, M. A. (1988) Lipid Dynamics in Fish - Aspects of Absorption, Transportation, Deposition and Mobilization. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 90, 679-690.
  384. Shimeno, S., Masumoto, T., Hujita, T., Mima, T. and Ueno, S. (1993) Alternative Protein-Sources for Fish-Meal in Diets of Young Yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59, 137-143.
  385. Shimeno, S., Takeda, M., Takayama, S., Fukui, A., Sasaki, H. and Kajiyama, H. (1981) Metabolic-Regulation in Fishes .2. Adaptation of Hepatopancreatic Enzymes to Dietary Carbohydrate in Carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 47, 71-77.
  386. Sire, M. F., Lutton, C. and Vernier, J. M. (1981) New Views on Intestinal-Absorption of Lipids in Teleostean Fishes - an Ultrastructural and Biochemical-Study in the Rainbow-Trout. *J. Lipid Res.* 22, 81-94.
  387. Siwicki, A. K., Anderson, D. P. and Rumsey, G. L. (1994) Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 41, 125-139.
  388. Skjermo, J., Storseth, T. R., Hansen, K., Handå, A. and Øie, G. (2006) Evaluation of  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3, 1  $\rightarrow$  6)-glucans and High-M alginate used as immunostimulatory dietary

- supplement during first feeding and weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture* 261, 1088-1101.
389. Sloman, K. A., Montpetit, C. J. and Gilmour, K. M. (2002) Modulation of catecholamine release and cortisol secretion by social interactions in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 127, 136-146.
  390. Soyland, E., Lea, T., Sandstad, B. and Drevon, A. (1994) Dietary Supplementation with very Long-Chain N-3 Fatty-Acids in Man Decreases Expression of the Interleukin-2 Receptor (Cd25) on Mitogen-Stimulated Lymphocytes from Patients with Inflammatory Skin Diseases. *Eur. J. Clin. Invest.* 24, 236-242.
  391. Stapleton, P. P., Charles, R. P., Redmond, H. P. and BouchierHayes, D. J. (1997) Taurine and human nutrition. *Clinical Nutrition* 16, 103-108.
  392. Stapleton, P. P., Redmond, H. P. and BouchierHayes, D. J. (1997) Taurine and inflammation - A new approach to an old problem? *J. Leukoc. Biol.* 61, 231-232.
  393. Staurnes, M., Andorsdottir, G. and Sundby, A. (1990) Distended, Water-Filled Stomach in Sea-Farmed Rainbow-Trout. *Aquaculture* 90, 333-343.
  394. Staykov, Y., Spring, P. and Denev, S. (2007) Influence of dietary Bio-Mos® on growth, survival and immune status of rainbow trout (*Salmo gairdneri irideus* G.) and common carp (*Cyprinus carpio* L.).
  395. Staykov, Y., Spring, P., Denev, S. and Sweetman, J. (2007) Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult. Int.* 15, 153-161.
  396. Stubhaug, I., Froyland, L. and Torstensen, B. E. (2005a) beta-oxidation capacity of red and white muscle and liver in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) - Effects of increasing dietary rapeseed oil and olive oil to replace capelin oil. *Lipids* 40, 39-47.
  397. Stubhaug, I., Lie, O. and Torstensen, B. E. (2007) Fatty acid productive value and beta-oxidation capacity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed on different lipid sources along the whole growth period. *Aquacult. Nutr.* 13, 145-155.
  398. Stubhaug, I., Lie, O. and Torstensen, B. E. (2006) beta-oxidation capacity in liver increases during parr-smolt transformation of Atlantic salmon fed vegetable oil and fish oil. *J. Fish Biol.* 69, 504-517.
  399. Summers, C. H., Forster, G. L., Korzan, W. J., Watt, M. J., Larson, E. T., Overli, O., Höglund, E., Ronan, P. J., Summers, T. R., Renner, K. J. and Greenberg, N. (2005) Dynamics and mechanics of social rank reversal. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 191, 241-252.
  400. Sunyer, J. O. and Tort, L. (1995) Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by alternative complement pathway. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 45, 333-345.
  401. Sunyer, J. O., Tort, L. and Lambris, J. D. (1997) Diversity of the third form of complement, C3, in fish: Functional characterization of five forms of C3 in the diploid fish *Sparus aurata*. *Biochem. J.* 326, 877-881.
  402. Sures, B., Knopf, K. and Kloas, W. (2001) Induction of stress by the swimbladder nematode *Anguillicola crassus* in European eels, *Anguilla anguilla*, after repeated experimental infection. *Parasitology* 123, 179-184.
  403. Sures, B., Lutz, I. and Kloas, W. (2006) Effects of infection with *Anguillicola crassus* and simultaneous exposure with Cd and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) on the

- levels of cortisol and glucose in European eel (*Anguilla anguilla*). *Parasitology* 132, 281-288.
404. Swain, P., Nayak, S. K., Nanda, P. K. and Dash, S. (2008) Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: A review. In Press, Corrected Proof,
405. Takeuchi, T., Dedi, J., Haga, Y., Seikai, T. and Watanabe, T. (1998) Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 169, 155-165.
406. Takeuchi, T., Shiina, Y. and Watanabe, T. (1991) Suitable Protein and Lipid-Levels in Diet for Fingerlings of Red-Sea Bream *Pagrus-Major*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57, 293-299.
407. Takeuchi, A., Okano, T., Ayame, M., Yoshikawa, H., Teraoka, S., Murakami, Y. and Kobayashi, T. (1984) High-performance liquid chromatographic determination of vitamin D sub(3) in fish liver oils and eel body oils. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. Vol. 30 30, 421-430.
408. Tengerdy, R. P. (1990) The Role of Vitamin-E in Immune-Response and Disease Resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 587, 24-33.
409. Terpstra, A. H. M., Beynen, A. C., Everts, H., Kocsis, S., Katan, M. B. and Zock, P. L. (2002) The decrease in body fat in mice fed conjugated linoleic acid is due to increases in energy expenditure and energy loss in the excreta. *J. Nutr.* 132, 940-945.
410. Thibault, M., Blier, P. U. and Guderley, H. (1997) Seasonal variation of muscle metabolic organization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* 16, 139-155.
411. Thiel-Cooper, R. L., Parrish, F. C., Sparks, J. C., Wiegand, B. R. and Ewan, R. C. (2001) Conjugated linoleic acid changes swine performance and carcass composition. *J. Anim. Sci.* 79, 1821-1828.
412. Thompson, I., Choubert, G., Houlihan, D. F. and Secombes, C. J. (1995) The Effect of Dietary Vitamin-a and Astaxanthin on the Immunocompetence of Rainbow-Trout. *Aquaculture* 133, 91-102.
413. Thompson, I., Fletcher, T. C., Houlihan, D. F. and Secombes, C. J. (1994) The Effect of Dietary Vitamin-a on the Immunocompetence of Atlantic Salmon (*Salmo-Salar* L). *Fish Physiol. Biochem.* 12, 513-523.
414. Thompson, K. D., Lilley, J. H., Chen, S. C., Adams, A. and Richards, R. H. (1999) The immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Aphanomyces invadans*. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 195-210.
415. Thornburg, J. T., Parks, J. S. and Rudel, L. L. (1995) Dietary Fatty-Acid Modification of HDL Phospholipid Molecular-Species Alters Lecithin-Cholesterol Acyltransferase Reactivity in Cynomolgus Monkeys. *J. Lipid Res.* 36, 277-289.
416. Thorpe, J. E. and Cho, C. Y. (1995) Minimizing waste through bioenergetically and behaviorally based feeding strategies. *Water Science and Technology* 31, 29-40.
417. Thuvander, A., Wichardt, U. P. and Reitan, L. J. (1993) Humoral Antibody-Response of Brown Trout *Salmo-Trutta* Vaccinated Against Furunculosis. *Dis. Aquat. Org.* 17, 17-23.
418. Tischendorf, F., Schone, F., Kirchheim, U. and Jahreis, G. (2002) Influence of a conjugated linoleic acid mixture on growth, organ weights, carcass traits and meat quality in growing pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 86, 117-128.

419. Tocher, D. R. (2003) Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish. Sci.* 11, 107-184.
420. Tocher, D. R., Mourente, G., Van der Eecken, A., Evjemo, J. O., Diaz, E., Wille, M., Bell, J. G. and Olsen, Y. (2003) Comparative study of antioxidant defence mechanisms in marine fish fed variable levels of oxidised oil and vitamin E. *Aquacult. Int.* 11, 195-216.
421. Torstensen, B. E., Lie, O. and Froyland, L. (2000) Lipid metabolism and tissue composition in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) - Effects of capelin oil, palm oil, and oleic acid-enriched sunflower oil as dietary lipid sources. *Lipids* 35, 653-664.
422. Tort, L. (1998) Stress and immunosuppression in fish. *Trends in Comparative Biochem. & Physiol.* 5, 17-29.
423. Tort, L., Balasch, J. and MacKenzie, S. (2003) Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *SEI* 22, 277-286.
424. Tort, L., Balasch, J. C. and MacKenzie, S. (2005) Fish health challenge after stress. Indicators of immunocompetence. *Contributions to Science* 2-4, 443-454.
425. Tort, L., Gomez, E., Montero, D. and Sunyer, J. O. (1996) Serum haemolytic and agglutinating activity as indicators of fish immunocompetence: Their suitability in stress and dietary studies. *Aquacult. Int.* 4, 31-41.
426. Tort, L., Gonzalezarch, F. and Balasch, J. (1994) Plasma-glucose and lactate and hematological-changes after handling stresses in the dogfish. *Rev. Esp. Fisiol.* 50, 41-46.
427. Tort, L., Gonzalezarch, F., Torres, P. and Hidalgo, J. (1991) On the blood-volume of the mediterranean dogfish, *Scyliorhinus-canícula*. *Fish Physiol. Biochem.* 9, 173-177.
428. Tort, L. and Hernandezpascual, M. D. (1990) Hematological effects in dogfish (*Scyliorhinus-canícula*) after short-term sublethal cadmium exposure. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 18, 379-383.
429. Tort, L., Kargacin, B., Torres, P., Giralt, M. and Hidalgo, J. (1996a) The effect of cadmium exposure and stress on plasma cortisol, metallothionein levels and oxidative status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* 114, 29-34.
430. Tort, L., Sunyer, J. O., Gomez, E. and Molinero, A. (1996b) Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 51, 179-188.
431. Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M. J., Montero, D., Robaina, L., Real, F., Sweetman, J., Tort, L. and Izquierdo, M. S. (2007) Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 969-981.
432. Tranchant, T., Besson, P., Hoinard, C., Pinault, M., Alessandri, J. M., Delarue, J. and Couet, C. and Goré, J. (1998) Long-term supplementation of culture medium with essential fatty acids alters a-linolenic acid uptake in Caco-2 clone TC7. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76, 621-629.
433. Tricon, S., Burdige, G. C., Jones, E. L., Russell, J. J., El-Khazen, S., Moretti, E., Hall, W. L., Gerry, A. B., Leake, D. S., Grimble, R. F., Williams, C. M., Calder, P. C. and Yaqoob, P. (2006) Effects of dairy products naturally enriched with cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid on the blood lipid profile in healthy middle-aged men. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 744-753.

434. Tricon, S., Burdge, G. C., Kew, S., Banerjee, T., Russell, J. J., Grimble, R. F., Williams, C. M., Calder, P. C. and Yaqoob, P. (2004) Effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on immune cell function in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 1626-1633.
435. Tripodi, A., Loria, P., Dilengite, M. A. and Carulli, N. (1991) Effect of Fish Oil and Coconut Oil Diet on the LDL Receptor Activity of Rat-Liver Plasma-Membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1083, 298-304.
436. Turnbull, A. V. and Rivier, C. L. (1999) Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol. Rev.* 79, 1-71.
437. Twibell, R. G., Watkins, B. A. and Brown, P. B. (2001) Dietary conjugated linoleic acids and lipid source alter fatty acid composition of juvenile yellow perch, *Perca flavescens*. *J. Nutr.* 131, 2322-2328.
438. Twibell, R. G., Watkins, B. A., Rogers, L. and Brown, P. B. (2000) Effects of dietary conjugated linoleic acids on hepatic and muscle lipids in hybrid striped bass. *Lipids* 35, 155-161.
439. Twibell, R. G. and Wilson, R. P. (2003) Effects of dietary conjugated linoleic acids and total dietary lipid concentrations on growth responses of juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 221, 621-628.
440. Valente, L. M. P., Bandarra, N. M., Figueiredo-Silva, A. C., Cordeiro, A. R., Simões, R. M. and Nunes, M. L. (2007) Influence of conjugated linoleic acid on growth, lipid composition and hepatic lipogenesis in juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 267, 225-235.
441. Van Hai, N. and Fotedar, R. (2009) Comparison of the effects of the prebiotics (Bio-Mos super(®) and beta -1,3-D-glucan) and the customised probiotics (*Pseudomonas synxantha* and *P. aeruginosa*) on the culture of juvenile western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). *Aquaculture [Aquaculture]*. Vol. 289 289, 310-4, pp.
442. Van Veldhoven, P. P. and Mannaerts, G. P. (1999) Role and organization of peroxisomal beta-oxidation. *Current Views of Fatty Acid Oxidation and Ketogenesis* 466, 261-272.
443. Van Weerd, J. H. and Komen, J. (1998) The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 120, 107-112.
444. vandenIngh, T. S. G. A. M., Olli, J. J. and Krogdahl, A. (1996) Alcohol-soluble components in soybeans cause morphological changes in the distal intestine of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 19, 47-53.
445. Verlhac, V., Gabaudan, J., Obach, A., Schuep, W. and Hole, R. (1996) Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 143, 123-133.
446. Verlhac, V., Obach, A., Gabaudan, J., Schuep, W. and Hole, R. (1998) Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 8, 409-424.
447. Virella, G., Kilpatrick, J. M., Rugeles, M. T., Hyman, B. and Russell, R. (1989) Depression of Humoral Responses and Phagocytic Functions In vivo and In vitro by Fish Oil and Eicosapentanoic Acid. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 52, 257-270.

448. Volkoff, H. (2006) The role of neuropeptide Y, orexins, cocaine and amphetamine-related transcript, cholecystokinin, amylin and leptin in the regulation of feeding in fish. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 144, 325-331.
449. Volkoff, H., Canosa, L. F., Unniappan, S., Cerdá-Reverter, J. M., Bernier, N. J., Kelly, S. P. and Peter, R. E. (2005) Neuropeptides and the control of food intake in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 3-19.
450. Waché, Y., Auffray, F., Gatesoupe, F., Zambonino, J., Gayet, V., Labbé, L. and Quentel, C. (2006) Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. *Aquaculture* 258, 470-478.
451. Waldroup, P. W., Oviedo- Rondon, E. O. and Fritts, C. A. (2003) Comparison of Bio-Mos® and antibiotic feeding programs in broiler diets containing copper sulfate. *International. Journal of Poultry Science* 2, 28-31.
452. Walton, M. J., Cowey, C. B. and Adron, J. W. (1984) The Effect of Dietary Lysine Levels on Growth and Metabolism of Rainbow-Trout (*Salmo-Gairdneri*). *Br. J. Nutr.* 52, 115-122.
453. Watanabe, T. (1982) Lipid Nutrition in Fish. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 73, 3-15.
454. Watanabe, T., Takeuchi, T. and Ogino, C. (1980) *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 46, 1521-1525.
455. Watanabe, T., Verakunpiriya, V., Watanabe, K., Kiron, V. and Satoh, S. (1997) Feeding of rainbow trout with non-fish meal diets. *Fisheries Science* 63, 258-266.
456. Watkins, B. A., Shen, C. L., McMurtry, J. P., Xu, H., Bain, S. D., Allen, K. G. D. and Seifert, M. F. (1997) Dietary lipids modulate bone prostaglandin E-2 production, insulin-like growth factor-I concentration and formation rate in chicks. *J. Nutr.* 127, 1084-1091.
457. Wedemeyer, G. A. and Ross, A. J. (1973) Nutritional Factors in Biochemical Pathology of Corynebacterial Kidney Disease in Coho Salmon (*Oncorhynchus-Kisutch*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 30, 296-298.
458. Welker, T. L., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., Shelby, R. and Klesius, P. H. (2007) Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri* challenge in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed diets containing commercial whole-cell yeast or yeast subcomponents. *J. World Aquacult. Soc.* 38, 24-35.
459. Wendelaar Bonga, S. E. (1997) The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591-625.
460. Weyts, F. A., Cohen, N., Flik, G. and Verburg-van Kemenade, B. M. (1999) Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish. *Fish & Shellfish Immunology* 9, 1-20.
461. Weyts, F. A., Flik, G., Rombout, J. H. W. M. and Verburg-van Kemenade, B. M. (1998) Cortisol induces apoptosis in activated B cells, not in other lymphoid cells of the common carp, *Cyprinus carpio* L. *Dev. Comp. Immunol.* 22, 551-562.
462. Wilson, R. P. and Moreau, Y. (1996) Nutrient requirements of catfishes (*Siluroidei*). *Aquat. Living Resour.* 9, 103-111.

463. Williams, C. M. (1998) Dietary interventions affecting chylomicron and chylomicron remnant clearance. *Atherosclerosis* 141, S87-S92.
464. Woodward, B. (1994) Dietary Vitamin Requirements of Cultured Young Fish, with Emphasis on Quantitative Estimates for Salmonids. *Aquaculture* 124, 133-168.
465. Xu, H., Watkins, B. A. and Adkisson, H. D. (1994) Dietary Lipids Modify the Fatty-Acid Composition of Cartilage, Isolated Chondrocytes and Matrix Vesicles. *Lipids* 29, 619-625.
466. Xu, H., Watkins, B. A. and Seifert, M. F. (1995) Vitamin-E Stimulates Trabecular Bone-Formation and Alters Epiphyseal Cartilage Morphometry. *Calcif. Tissue Int.* 57, 293-300.
467. Yamasaki, M., Ikeda, A., Oji, M., Tanaka, Y., Hirao, A., Kasai, M., Iwata, T., Tachibana, H. and Yamada, K. (2003) Modulation of body fat and serum leptin levels by dietary conjugated linoleic acid in Sprague-Dawley rats fed various fat-level diets. *Nutrition*, 19, 30-35.
468. Yang, L., Huang, Y., Wang, H. Q. and Chen, Z. Y. (2003) Isomeric distribution of conjugated linoleic acids (CLA) in the tissues of layer hens fed a CLA diet. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5654-5660.
469. Yasmin, A., Takeuchi, T., Hayashi, M., Hirota, T., Ishizuka, W. and Ishida, S. (2004) Effect of conjugated linoleic and docosahexaenoic acids on growth of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Science* 70, 473-481.
470. Yilmaz, E., Genc, M. A. and Genc, E. (2007) Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth, body composition, and intestine and liver histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 59, 182-188.
471. Yin, Z., Lam, T. J. and Sin, Y. M. (1996) The role of specific antiserum of catfish, *Clarias gariepinus*, as a defence against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 6, 57-69.
472. Yin, Z., Lam, T. J. and Sin, Y. M. (1995) The effects of crowding stress on the non-specific immuneresponse in fancy carp (*Cyprinus carpio L.*). *Fish Shellfish Immunol.* 5, 519-529
473. Yoshida, T., Kruger, R. and Inglis, V. (1995) Augmentation of Nonspecific Protection in African Catfish, *Clarias-Gariepinus* (Burchell), by the Long-Term Oral-Administration of Immunostimulants. *J. Fish Dis.* 18, 195-198.
474. Zarate, D. D. and Lovell, R. T. (1997) Free lysine (L-lysine center dot HCl) is utilized for growth less efficiently than protein-bound lysine (soybean meal) in practical diets by young channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 159, 87-100.
475. Zhou, X. Q. and Li, Y. (2004) The effects of BIO-MOS on ontestinal microflora and immune function of juvenile Jian Carp (*Cyprinus carpio Var. Jian*). *Nutritional biotechnology in the feed and food industries:Proceedings of Alltech's 20nd annual symposium*

## **11. AGRADECIMIENTOS**

Durante este período de mi vida he tenido la oportunidad de crecer tanto personal como intelectualmente y cuando miro hacia atrás observo con cierto encanto que mi paso por Barcelona y en particular por la UAB, me ha dado la oportunidad de compartir con muchas personas que en menor o mayor grado me han enseñado, compartido su tiempo y su amistad conmigo. Así que debo agradecerle a muchas personas que han hecho posible lograr este objetivo, acompañándome y muchas veces apoyándome en las múltiples decisiones que han sido necesarias para culminación de esta tesis doctoral.

Iniciaré agradeciéndole al grupo de investigación de la UAB bajo la dirección de Luis Tort por su apoyo y comprensión, a Daniel Montero por sus consejos. A Ignasi Gichs por ayudarme por los intrincados caminos de la estadística.

Debo agradecerle también a mi familia, especialmente a mis padres por ser mi pilar y dejarme perseguir mis metas y sembrar las primeras semillas de mi educación, a mis hermanos por enseñarme la importancia de la unión y el apoyo.

A mis amigos Blanca y Francisco por recordarme que la tenacidad y la dedicación son un valor en alza en la ciencia para la consecución de la metas, así como a Claudia, Zoila, Santiago por ser mis aliados en las buenas y malas épocas. A Sergio por ser mi compañero durante gran parte de este ciclo y a Vanessa, Raúl, José A. y Miguel por apoyarme en este último y crítico final.

Finalmente agradezco a la vida la oportunidad de realizar uno de mis grandes sueños.

