

Curso 2010/11
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/33
I.S.B.N.: 978-84-15287-61-2

JOSÉ ANTONIO PÉREZ PÉREZ

**Influencia de los ácidos grasos poliinsaturados
en la dieta, sobre la composición corporal
y el transporte intestinal de nutrientes y electrolitos
en juveniles de dorada *Sparus aurata***

Directores

**ANTONIO LORENZO HERNÁNDEZ
COVADONGA RODRÍGUEZ GONZÁLEZ**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

A MI FAMILIA: COVA, MARÍA Y DIEGO

A PEPA Y SENSIO

**“El genio se compone del dos por ciento
de talento y noventa y ocho por ciento
de perseverante aplicación”**

Ludwig van Beethoven

AGRADECIMIENTOS

Siempre he temido el momento de redactar los agradecimientos de la Tesis. Me considero una persona agradecida, pero a mi manera, con pocas palabras, soy más de un gesto, una sonrisa, un guiño de ojo, una palmadita en la espalda, una parida. Siempre me ha resultado difícil plasmar mis sentimientos en un escrito, hasta para felicitar en una tarjeta a un amig@ por su cumpleaños. Por ello, espero sepan perdonarme si no consigo expresar mi inmensa gratitud, como ustedes se merecen. Muchísimas gracias a todos.

Las primeras líneas, sin duda, para agradecer a mi maravillosa familia su imprescindible contribución en este trabajo, que orgulloso estoy de ellos!!!. Cova, María y Diego, protagonistas estelares en la sombra, disfrutar de su compañía ha sido la mejor vitamina para alcanzar el objetivo, capaces de “resetearme” y empujarme hacia adelante en los momentos difíciles, sufridores resignados de mis problemas y malos humores. Cuánto les quiero!!!. Mi esposa, Cova, merece mención aparte, su apoyo y amor sin límites han sido el mejor estímulo para continuar luchando, primero mis cosas y luego las suyas, inteligente, solidaria, siempre amiga, esposa y madre. ¡Qué lotería!, de mayor quiero ser como ella, lo mejor que me ha pasado en la vida. Sólo deseo seguir disfrutando de su compañía durante siglos, porque a su lado el tiempo pasa casi sin darme cuenta.

A mis “madres” Pepa y Sensio, por haberme dado cariño infinito, y la mejor educación que nadie pueda tener, siempre desprendidas, humildes y trabajadoras. Las mejores personas que he conocido. Se que una de sus grandes ilusiones era que llegara este momento y se que, donde quiera que estén, este es el mejor regalo que puedo hacerles.

A mis directores de Tesis, Melo y Cova, grandísimos profesionales y mejores personas. No sólo debo estarles agradecido por los conocimientos que me han sabido transmitir, sino por su disponibilidad absoluta, incluso en periodo de vacaciones, y, sobre todo, por no haber dejado de creer en mi capacidad para terminar lo que empecé en su momento, con mayor convencimiento incluso que yo mismo. No les quede ninguna duda de que este trabajo no se hubiera terminado si no fuera por la persistencia y el empuje de ambos. Aprovecho la ocasión para agradecer de manera muy especial a Melo sus siempre acertados consejos, su preocupación y la tutela

desinteresada durante todos estos años tanto de mi trayectoria profesional como la de Cova.

A mis compañeros de la U.D.I. de Fisiología Animal, porque después de tantos años sin coincidir día a día, me han recibido como si sólo hubiera transcurrido un fin de semana, y eso es de agradecer, y mucho. De verdad que he podido sentir su apoyo desinteresado y sus ganas de que sacara esto pa'lante. Gracias Ana, Marga, Pilar, Mario, Tomás, Miguel por estar siempre dispuestos a echarme una mano en lo que hiciera falta, y mas allá..... No me puedo olvidar de la nueva camada de grandes investigadores y mejores personas que se están “gestando” en la UDI, a todos ellos les ha bastado un segundo para atenderme y ayudarme, brindándome su colaboración siempre que lo he necesitado. Gracias Jorge, Noemí, Deiene, Dani, Mercedes, Inés, por hacerme sentir cómodo a vuestro lado y por hacerme recuperar los almuerzos y tertulias de sobremesa en días laborables. Mención aparte merecen mis veteranos amigos, por lo del tiempo que hace que nos conocemos, que no por la edad, Lupe y Fernando, qué tíos, grandísimos profesionales, eficaces, interesados de veras en lo que haces y en que salga bien, y lo que es más importante, desprendidos y alegres, no pierdan esa sonrisa y buen humor, chicos. Da gusto trabajar rodeado de gente tan profesional y agradable, de veras.

A la vieja guardia de la UDI, más que excompañeros de curro, amigos con los que he compartido horas, dentro y fuera del trabajo. Sixto, Maria José, Rosa, Noe, Mari muchas gracias por los buenos momentos que hemos pasado juntos y por haberme enseñado tantas cosas, espero seguir contando con ustedes.

A Juani, Virginia, Tete y Salva, como decimos en mi pueblo hay que echarles de comer aparte. Siempre buenas formas y total predisposición para sacar adelante el trabajo que hiciera falta, tanto de investigación como empresarial. Particularmente quiero agradecer la confianza que Juani ha depositado en mí durante todos estos años. Al personal de la Planta de Cultivos del IEO, sin cuya colaboración no hubiera sido posible desarrollar la fase experimental de la presente memoria, especialmente a Kiko, Ducheman, Jose Marrero y Víctor, también a Domingo, Juan Crescencio, Cuco, Jose Enrique, Manolo, Bea, porque siempre me han recibido con los brazos abiertos y me han tratado como si fuera uno más de la casa. Gracias.

No me puedo olvidar de Jim, James, Douglas, Gordon *et al.* Cuánto aprendí con ellos y qué buenos ratos pasamos. Recuerdo con especial cariño los almuerzos acompañados de un par o tres de buenas *paints* los viernes por la tarde, y la durísima

vuelta al *lab* donde lo mejor que se podía hacer era disimular leyendo una separata, aunque en la mayoría de las ocasiones no pudiera pasar de la primera página.

A mis hermanas, las mejores hermanas del mundo. Siempre apoyando, siempre interesadas en cómo van las cosas, siempre cariñosas, siempre, siempre, siempre, cuánto las quiero. A Emilio y Fran, tan distintos como un huevo y una castaña, pero con algo muy importante en común, ser grandes personas. Ah!!!!, también coinciden en el amor a un buen vaso de vino en cualquier güachinche, cosa que se agradece.

A mi hermano Vicente, por tanta comprensión y tantos cuidados que me brindó cuando todavía no tenía claro hacia dónde dirigirme en la vida. Además de hermano, fuiste padre y eso no se olvida. Un millón de gracias.

A mis sobrinos/as, siempre he sentido que podía tirar de ellos cuando me han hecho falta, para cuidarnos los niños, para resolver dudas estadísticas, para echarme una mano con la informática, para “liberar estrés” con unas copichuelas, para hacerme entender que volcarse y ayudar al prójimo es vital en esta sociedad, y si encima te pagan,.....

A mi familia política, mis suegros, cuñad@s y sobrin@s que desde el primer día han hecho que me sintiera como uno más de ellos. Debo agradecer especialmente a mi suegra, Marian y Juanra su desinteresado apoyo, se que les hace muchísima ilusión que haya podido terminar por fin, esta tesis. A Juan Antonio, por obligarme a enviarle las fotografías que he utilizado en la memoria, algunas de ellas deterioradas por el paso del tiempo, gran trabajo cuñao. A Fer, por la charla que tuvimos durante las últimas vacaciones de Navidad, sus consejos se quedaron grabados y seguramente sus palabras actuaron como un último estímulo para retomar el trabajo.

Tengo la fortuna de tener multitud de amigos incondicionales, de los de verdad. Todos ellos, han sido un soporte inmejorable en los momentos de duda, gracias por estar siempre cerca. Gracias Alfonso, Marivi, Juanillo, Inma, Rafa, Mariane, Joe Palmis y Marisa, Héctor, Juan A., Joxean, Cleofé, Javi, Felipe, Melgui, Oscar, Adriana, y a los chicos del ping-pong, Raúl, Nano, David, Pedro y Ana, qué bien me lo paso cuando estamos juntos y cuánto me ha valido vuestro apoyo, e interés en ver cómo iba todo. De verdad que también son parte importante de todo esto.

FINANCIACIÓN

La realización de este trabajo de investigación fue posible gracias a las siguientes fuentes de financiación:

Proyecto: **“Requerimiento en ácidos grasos poliinsaturados e influencia de los mismos en el transporte de nutrientes y electrolitos en alevines de la dorada (*Sparus aurata*)”** Ref.: AGF93-0632-C02-01. Entidad financiadora: MEC-CICYT Periodo de vigencia: 1993-1996. Investigador principal: Dr. D. Antonio Lorenzo Hernández.

Beca de Formación de Personal Investigador del MEC. Periodos: 1994, 1995, 1996 y 1997. Bajo la dirección del Dr. Antonio Lorenzo Hernández y asignada al Proyecto MEC-CICYT Ref.: AGF93-0632-C02-01; “Requerimiento en ácidos grasos poliinsaturados e influencia de los mismos en el transporte de nutrientes y electrolitos en alevines de la dorada (*Sparus aurata*)”.

Estancias de Investigación asociadas a la beca FPI/MEC, en Unit of Aquatic Biochemistry, Universidad de Stirling, Escocia. AÑOS: 1995 y 1996; DURACIÓN: 6,5 meses. Aprendizaje de técnicas de análisis lipídico. Seguimiento metabólico de ácidos grasos en enterocitos aislados de peces. Realización de análisis de clases lipídicas y ácidos grasos de tejidos y órganos de las doradas objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral.

ÍNDICE

1.- Introducción	1
1.1.- Perspectiva actual y futura de la acuicultura	1
1.2.- Los lípidos en la nutrición de peces.....	7
<i>Sustitución del aceite de pescado en la nutrición de peces</i>	9
1.3.- El transporte intestinal en peces.....	14
<i>Características del transporte intestinal</i>	14
<i>Influencia de los lípidos en el transporte intestinal</i>	18
<i>Regulación de los procesos de transporte</i>	20
2.- Objetivos	23
3.- Material y métodos	25
3.1.- Condiciones experimentales.....	25
3.2.- Alimentación	25
<i>Elaboración de las dietas</i>	26
3.3.- Parámetros biométricos.....	31
3.4.- Recogida de muestras.....	31
3.4.1.- Extracción de sangre	31
3.4.2.- Extracción de órganos	32
3.5.- Incubación del tracto intestinal	35
3.5.1.- Determinación de parámetros eléctricos	37
3.5.2.- Medición de flujos unidireccionales	38
3.6.- Análisis bioquímicos	40
3.6.1.- Humedad	40
3.6.2.- Cenizas.....	40
3.6.3.- Proteína total	40
3.6.4.- Lípido total	41
3.6.5.- Clases lipídicas.....	42
<i>Separación y cuantificación</i>	42
<i>Extracción</i>	44
3.6.6.- Ésteres metílicos de ácidos grasos	45
<i>Calidad nutricional del pescado</i>	46

3.6.7.- AMPc intracelular.....	47
3.6.8.- Determinaciones plasmáticas	48
3.7.- Análisis estadístico	49
4.- Resultados	51
<i>Composición bioquímica de las dietas experimentales.....</i>	51
<i>Comparación de los órganos al inicio del periodo experimental.....</i>	52
4.1.- Parámetros biométricos.....	57
4.2.- Efecto de la composición lipídica de la dieta sobre la composición lipídica del músculo.....	59
4.2.1.- Perfil lipídico del músculo en condiciones control.....	59
4.2.2.- Efecto de la deficiencia dietaria de HUFA en el músculo	61
4.3.- Efecto de la composición lipídica de la dieta sobre la composición lipídica del hígado, hematocrito, cerebro y tracto intestinal	69
4.3.1.- Perfil lipídico del hígado en condiciones control	69
4.3.2.- Efecto de la deficiencia dietaria de HUFA en el hígado.....	70
4.3.3.- Perfil lipídico del hematocrito en condiciones control	76
4.3.4.- Efecto de la deficiencia dietaria de HUFA en el hematocrito	78
4.3.5.- Perfil lipídico del cerebro en condiciones control.....	86
4.3.6.- Efecto de la deficiencia dietaria de HUFA en el cerebro.....	88
4.3.7.- Perfil lipídico del tracto intestinal en condiciones control	95
4.3.8.- Efecto de la deficiencia dietaria de HUFA en el tracto intestinal.....	99
4.4.- Transporte transepitelial de cloruro, sodio y glucosa	113
4.4.1.- Parámetros bioeléctricos y movimientos unidireccionales y netos de cloruro y sodio en los segmentos anterior y posterior del intestino. Efectos de la adición de teofilina y forskolina. Niveles de AMPc intracelular.....	113
<i>Parámetros bioeléctricos.....</i>	113
<i>Movimientos transepiteliales de cloruro</i>	115
<i>Movimientos transepiteliales de sodio</i>	116
ADICIÓN DE TEOFILINA (3mM)	121
<i>Efectos sobre los parámetros bioeléctricos</i>	121
<i>Efectos sobre el transporte de cloruro.....</i>	122
ADICIÓN DE FORSKOLINA (10^{-5} M).....	127
<i>Efectos sobre los parámetros bioeléctricos</i>	127
<i>Efectos sobre el transporte de cloruro.....</i>	128

PRODUCCIÓN DE AMPc INTRACELULAR	133
4.4.2.- Movimientos unidireccionales y netos de glucosa en los segmentos anterior y posterior del intestino. Efectos de la adición de floricina	135
4.5.- Análisis bioquímico del medio interno. Parámetros plasmáticos	138
5.- Discusión	139
<i>Influencia de la composición en ácidos grasos de la dieta sobre el crecimiento de los ejemplares</i>	140
<i>Influencia de la composición en ácidos grasos de la dieta control (DC) sobre la composición lipídica de los órganos y células sanguíneas.....</i>	142
<i>Influencia de la composición en ácidos grasos de la dieta deficiente en HUFA (DD) sobre la composición lipídica de los órganos y células sanguíneas</i>	155
<i>Efectos de la dieta deficiente en HUFA sobre los parámetros bioeléctricos y flujos iónicos y de nutrientes, a través del tracto intestinal </i>	165
6.- Conclusiones	177
7.- Bibliografía	179
Apéndice 1. Índice de tablas	215
Apéndice 2. Índice de figuras	219

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AGE	Ácidos grasos esenciales
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AOA	Aceite de origen animal
AP	Aceite de pescado
ARA	Ácido araquidónico, 20:4(n-6)
AV	Aceite vegetal
BHT	hidroxitolueno butilado
C16, 18, C20 ó C22	Ácidos grasos de 16, 18, 20 ó 22 átomos de carbono
DC	Dieta control
DD	Dieta deficiente en HUFA
DE	Desviación estándar
DHA	Ácido docosahexanoico, 22:6(n-3)
DMA	Dimetilacetales
DP	Diferencia de potencial
DPA	Ácido docosapentanoico, 22:5(n-3)
EE	Ésteres de esterol
EEM	Error estándar de la media
EPA	Ácido eicosapentanoico, 20:5(n-3)
FAME	Ésteres metílicos de ácidos grasos
FAO	Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FC	Fosfatidilcolina
FE	Fosfatidiletanolamina
FI	Fosfatidilinositol
FS	Fosfatidilserina
Gt	Conductancia tisular
HPTLC	Cromatografía en capa fina de alta resolución
HUFA	Ácidos grasos altamente insaturados (de 20 o más átomos de carbono y 3 o más dobles enlaces)
IA	Intestino anterior
IAt	Índice de aterogenicidad
Icc	Intensidad de corriente de cortocircuito
ICP	Índice de calidad de los lípidos del pescado
IHS	Índice hepatosomático
IP	Intestino posterior
IT	Índice de trombogenicidad
Jm-s	Flujo unidireccional de mucosa a serosa

Js-m	Flujo unidireccional de serosa a mucosa
Jneto	Flujo neto
LA	Ácido linoleico, 18:2(n-6)
LN	Lípidos neutros
LNA	Ácido linolénico, 18:3(n-3)
LP	Lípidos polares
LT	Lípido total
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
OA	Ácido oleico, 18:1(n-9)
PPARs	Receptores nucleares activadores de la proliferación de peroxisomas
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
t₀, t₃₀, t₆₀, t₉₀ ó t₁₂₀	0, 30, 60, 90 ó 120 minutos de experimentación
TG	Triglicéridos
TLC	Cromatografía en capa fina
TLN	Total de lípidos neutros
TLP	Total de lípidos polares

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Perspectiva actual y futura de la acuicultura

El desarrollo que la acuicultura ha experimentado en las últimas décadas, está asociado a la imposibilidad de cubrir, mediante la pesca extractiva, la creciente demanda de proteína como fuente de alimento. Los factores más relevantes que han contribuido al fulgurante desarrollo del sector acuícola, han sido, el incremento de la población mundial, que alcanzará los 9.000 millones de personas en el año 2045 (Naciones Unidas, 2009), el aumento en el consumo per cápita de productos acuáticos destinados al consumo humano (cerca de 20 kg/habitante/año en 2009 frente a los 11,5 kg/habitante/año en la década de los 70) y el estado de sobreexplotación de muchos caladeros internacionales, que ha dado lugar a que el nivel de capturas sea prácticamente el máximo que puede alcanzarse. A pesar de la ampliación de la capacidad tecnológica y campo de acción de las flotas pesqueras, desde el último cuarto del siglo XX, las capturas mundiales se han estabilizado en torno a 90-95 millones de toneladas (MTm) anuales y, según la FAO (2008), hay pocas opciones de que se produzcan incrementos significativos en los próximos años. La producción acuícola, por el contrario, ha mantenido un crecimiento sostenido desde 1950 hasta finales del siglo XX. Mientras que en el año 1980, tan sólo el 9% del pescado para consumo humano procedía de la acuicultura, en 2008, el sector acuícola suministró más de la mitad de los productos acuáticos destinados al consumo humano, 68,4 MTm, frente a las cerca de 67 MTm aportadas por la pesca extractiva (**Figura 1.1**). Otras 24 MTm capturadas por pesca fueron destinadas a usos diversos, principalmente a la fabricación de piensos para ganadería terrestre, peces y langostinos (APROMAR, 2010).

A pesar de estos alentadores datos para el sector acuícola, desde principios del siglo XXI se aprecia una ligera desaceleración en su tasa de crecimiento a nivel mundial, y un preocupante estancamiento de la producción en la Unión Europea, con una media de crecimiento por año del 1,3%, frente a medias cercanas al 10% anual alcanzadas en décadas anteriores (Tidwell y Allan, 2001).

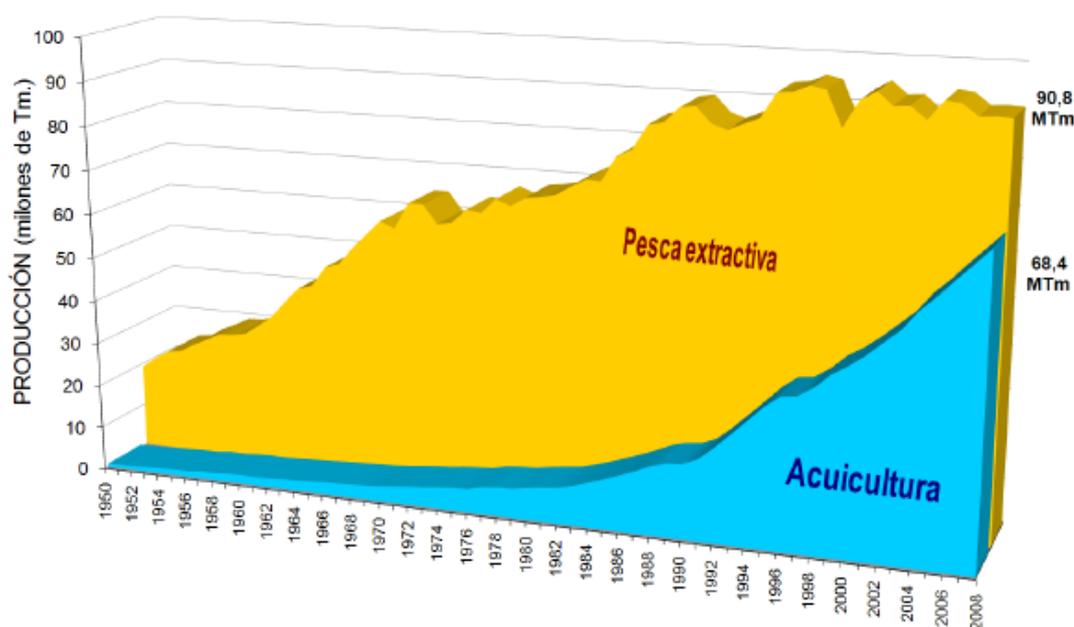


Figura 1.1. Evolución de la producción acuática mundial en el periodo 1950-2008 (APROMAR, 2010).

En Europa, los principales productos de la acuicultura son los pescados de alto valor comercial y los moluscos. En 2008, la producción de peces supuso un 49% de las cerca de 1,3 MTm de productos acuícolas obtenidos en el continente. En 2009, la dorada (*Sparus aurata*), con más de 165.000 Tm, fue la especie marina más ampliamente cultivada, seguida de la lubina (*Dicentrarchus labrax*) que superó las 120.000 Tm y el rodaballo (*Psetta maxima*) con alrededor de 9.500 Tm (APROMAR, 2010).

Tradicionalmente, España ha sido un país con un alto consumo de productos marinos, origen del desarrollo de una de las mayores flotas pesqueras mundiales y de una eficaz red de distribución. La media anual de consumo de productos pesqueros por persona en el periodo 2005-2007 fue de 44,2 Kg, lo que nos sitúa, junto con Noruega (51,5 kg) y Portugal (57,2 kg), próximos a países con una arraigada cultura de consumo de pescado como Japón, con 58,6 kg, aunque a cierta distancia de países como Islandia, con 91,0 kg *per cápita* para ese mismo periodo (FAO, 2008).

La relevancia económica y social que ha alcanzado la acuicultura de peces marinos en nuestro país es notoria. En el año 2009, la producción llegó hasta 48.393 Tm, y su comercialización dió lugar a una facturación total en primera venta de 222,4 millones de euros, a los que hay que añadir otros 26,8 millones correspondientes a la venta de los alevines de las principales especies. Las especies marinas de crianza con mayor producción fueron la dorada, la lubina y el rodaballo, con 23.690, 13.840 y 8.320 Tm, respectivamente (APROMAR, 2010). No obstante, se viene apreciando, al igual que en el conjunto de la Unión Europea, una preocupante desaceleración del crecimiento del sector en los últimos años, preveándose una disminución de la producción para el año 2010 cercana al 1%. Canarias, con 7.910 Tm de dorada y lubina producidas conjuntamente en 2009, lo que supone un 21% de la producción nacional, es la tercera Comunidad Autónoma productora, por detrás de la Comunidad Valenciana (29%) y Murcia (28%). Sin embargo, nuestra Comunidad ha experimentado una drástica reducción del 28% de la producción de dorada en el periodo interanual 2008-2009, pasando de un total de 4.810 Tm producidas, a 3.460. Las previsiones indican que la producción total de pescado marino de crianza en nuestra comunidad, seguirá descendiendo en los próximos años. De hecho, de las 22 instalaciones que tenían actividad en 2008, sólo 13 quedaban en activo a final de 2010, cifra que muy probablemente se verá reducida a lo largo del presente año.

Dos son los factores que más determinadamente han influido en la inquietante realidad de la acuicultura española en general, y canaria en particular. Por un lado, la situación de crisis por la que atraviesa la economía nacional, que ha generado serias dificultades para la financiación de las empresas dedicadas a un sector, caracterizado por largos ciclos de producción y altas necesidades de capital circulante. Por otro, la paulatina reducción en el precio de venta de los productos acuícolas, en ocasiones, por debajo incluso del coste de producción.

No obstante, la FAO sigue considerando la acuicultura como una herramienta básica para luchar contra la mala distribución de la proteína en el mundo, así como para contribuir de manera decisiva a reducir el hambre de las regiones más desfavorecidas. En el año 2030, se estima que habiten el planeta 8.300 millones de personas. El posible aumento de producción de las llamadas “carnes terrestres” (porcino, pollo, bovino y ovino) y las capturas pesqueras con una aportación

estabilizada en los valores actuales, seguirán siendo totalmente insuficientes para abastecer las necesidades de la población. Para una previsión de consumo mundial *per cápita* de 30 kg, se necesitaría 249 MTm de pescado para consumo directo, más otras 35 MTm para otros usos, es decir, un total de 284 MTm. La pesca extractiva aportaría 95 MTm a esta cantidad, por lo que la acuicultura debería suministrar 189 MTm, es decir, casi debería triplicar la producción actual en estos próximos 20 años. Este supuesto parece alcanzable, si tenemos en cuenta que en las últimas décadas del siglo XX, las tasas medias de crecimiento rondaron el 10% anual.

Paradójicamente, el sector acuícola, especialmente el cultivo de peces carnívoros y crustáceos marinos, es todavía altamente dependiente de las capturas de la pesca extractiva. En el año 2006, la acuicultura consumió el 68,2% del total de harina de pescado producida en el mundo y el 88,5% del aceite de pescado (Tacon y Metian, 2008). Estos datos revelan claramente, lo crítico de la continuidad de la expansión productiva de un sector, que se cimienta en las reservas finitas de pescado de los océanos. Esta situación, especialmente agravada en condiciones medioambientales que generan escasez de capturas, como cuando ocurre el fenómeno de El Niño en el Sureste del Pacífico, lleva asociada el incremento progresivo en el precio de la materia prima, que incide directamente en el encarecimiento de las dietas y, consecuentemente, en la rentabilidad de la actividad. Para determinar la cantidad de pescado bruto necesario para producir 1 kg de producto procedente de acuicultura, se utiliza el balance FI-FO (del inglés "Fish-in:Fish-out ratio"). La relación se calcula a partir de la cantidad de harina y aceite de pescado utilizados en la fabricación de piensos para acuicultura, de sus tasas de recuperación a partir del pequeño pescado pelágico utilizado en su fabricación (22,5% y 5%, respectivamente), y del factor de conversión del alimento (FCR), es decir, la cantidad de alimento ingerido para producir un incremento de biomasa en el pez cultivado. A pesar de que esta relación ha ido disminuyendo considerablemente en los últimos años, en 2006, se necesitaron aproximadamente 2,2 kg de pescado bruto para producir 1 kg de pescado marino de crianza como la dorada (Tacon y Metian, 2008). Investigaciones recientes llevadas a cabo por Benedito-Palos (2010), indican que este valor puede ser reducido hasta 1,7-1,9, a través de una sustitución parcial conjunta de harina y aceite de pescado, sin afectar al crecimiento de los individuos. Por tanto, si la acuicultura quiere seguir

suministrando una cuota cada vez mayor de la demanda mundial de pescado, debe abordar, ineludiblemente, la sustitución parcial o total de harinas/aceites de origen marino como ingredientes de los piensos de engorde, por fuentes alternativas de materias primas de alta calidad y origen sostenible.

Peces y crustáceos necesitan, en comparación con vertebrados terrestres de interés ganadero, dietas de alto contenido proteico para obtener máximos valores de crecimiento. Las proteínas son el componente mayoritario y más caro de la fórmula dietaria, siendo, por tanto, el que más afecta al costo final de los piensos comerciales. En la actualidad, las investigaciones en este campo se centran, no sólo en la búsqueda de fuentes proteicas alternativas más baratas, sino también en la reducción de la presencia de las proteínas en la dieta, siendo sustituidas por grasas o hidratos de carbono que podrían ser utilizados como fuente energética (protein sparing effect) (Sargent y col., 1989, 2002). Estudios sobre necesidades energéticas de peces carnívoros indican que éstos tienen limitada capacidad para utilizar carbohidratos de elevado peso molecular (Young y col., 2006; Moreira y col., 2008), por lo que la incorporación de lípidos en dietas comerciales adquiere un papel preponderante. Así, para el salmón, la presencia de proteína bruta en los piensos de engorde ha ido disminuyendo progresivamente, pasando de representar un 45% en los años 80, a un 42% en los 90 y un 36% en la última década, mientras que la grasa bruta ha llevado la progresión inversa, representando un 18, 32 y 38% respectivamente (información obtenida de SEA, "Sustainable and Economic Feeds", Skretting).

La composición en ácidos grasos de la dieta influye de manera evidente en la composición corporal de los peces (Rodríguez y col., 1998a; Ibeas y col., 1997; Navarro y col., 1997; Kennedy y col., 2007; Oku y col., 2009). En la búsqueda de nuevas materias primas para la elaboración de dietas para peces de crianza, se debe garantizar el valor nutritivo del pescado a comercializar, a través del mantenimiento en el músculo de los ejemplares de niveles adecuados de ácidos grasos altamente insaturados de cadena larga (HUFA). Los alimentos de origen marino son la fuente más importante de ácido eicosapentanoico (20:5(n-3), EPA) y docosahexanoico (22:6(n-3), DHA) en la dieta humana (Sargent y col., 1997; Givens y Gibbs, 2006; Fountoulaki y col., 2009; Turchini y col., 2009), y las bondades que para la salud tiene su consumo habitual, están sobradamente demostradas. Así por ejemplo, se sabe

que reducen la incidencia de algunos tipos de cáncer (Tapiero y col., 2002; Berquin y col., 2008; Bougnoux y col., 2010), previenen el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Din y col., 2004; He, 2009; Dawczynski y col., 2010) y neurodegenerativas (Hashimoto y col., 2002; Young y Conquer, 2005; Mazza y col., 2006; Martín y col., 2010) y tienen efectos beneficiosos sobre enfermedades crónicas con un componente de autoinmunidad y/o carácter inflamatorio, tales como la esclerosis múltiple, lupus eritematoso, artritis reumatoide, psoriasis, e, incluso, ciertos tipos de diabetes (Hunter y Roberts, 2000; Tapiero y col., 2002; Rizza y col., 2009; Tai y Ding, 2010). La Sociedad Internacional para el Estudio de Ácidos Grasos y Lípidos (ISSFAL), sugiere una ingesta diaria de 500 mg de EPA+DHA en adultos y un mínimo de 200 mg de DHA en mujeres embarazadas y en lactantes. Además, en caso de padecer enfermedades coronarias, la Sociedad Americana del Corazón (AHA), recomienda 1 g diario de EPA+DHA y de 2 a 4 g diarios en pacientes con hipertrigliceridemia.

Finalmente, hay que tener en cuenta la capacidad metabólica de las diferentes especies, ya que los cambios en la composición de la dieta del pez, pueden afectar a su salud y bienestar. Los peces marinos, poseen una capacidad muy limitada para producir HUFA, como el DHA, el EPA y el ácido araquidónico (20:4(n-6), ARA), a partir de sus precursores de 18 átomos de carbono como el ácido linolénico (18:3(n-3), LNA) y el ácido linoleico (18:2(n-6), LA) (Ghioni y col., 1999; Almáida-Pagán y col., 2007; Zheng y col., 2009; Monroig y col., 2011). Por lo tanto, éstos HUFA, considerados ácidos grasos esenciales (AGE) para peces marinos, deben ser incluidos en la dieta en proporciones adecuadas para cubrir los requerimientos del animal y evitar la aparición de patologías diversas, e, incluso, mortalidades (Ibeas y col., 1994; Rodríguez, 1994; Bell y col., 1995a; Montero, 1996; Ghioni y col., 1997; McKenzie y col., 1998; Lall y Tibbetts, 2009). Por el contrario, las especies de peces no estrictamente marinas, como ciertos salmónidos, y las dulceacuícolas, poseen activa la maquinaria enzimática necesaria para convertir ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de 18 átomos de carbono, en C₂₀ y C₂₂ HUFA (Sargent y col., 2002; Tocher y col., 2002, 2004, 2006), por lo que la presencia de los HUFA en el alimento no es un factor tan limitante para su correcto desarrollo.

En definitiva, actualmente la industria de la alimentación para acuicultura busca con urgencia encontrar e implementar alternativas sostenibles al aceite de pescado. El desafío para la producción piscícola es mantener, si no mejorar, los reconocidos beneficios del consumo de pescado para la salud humana, buscando maximizar la sostenibilidad, la salud del pez y la rentabilidad de la actividad.

1.2. Los lípidos en la nutrición de peces

El papel de los lípidos, y en particular de los PUFA, en la nutrición y otras funciones fisiológicas de vertebrados, incluyendo humanos, sigue siendo objeto de intensa investigación (Lauridsen y col., 2007; Calder, 2008; Parra y col. 2008; Holub, 2009; Ramel y col., 2010)

A partir de la década de los 70, los estudios sobre nutrición lipídica en peces se centraron en establecer los requerimientos cualitativos y cuantitativos de AGE, observándose que las necesidades variaban no sólo entre especies, sino entre las distintas fases de desarrollo de una misma especie. A lo largo de estos años, se han establecido los requerimientos de AGE de multitud de peces de interés comercial (revisado en Rodríguez y col., 2009; Turchini y col., 2009). En cuanto a la dorada europea, *S. aurata*, sus necesidades en AGE han sido determinadas, tanto para la fase larvaria (Koven y col., 1989, 1990, 1992; Mourente y Tocher, 1993; Mourente y col., 1993; Rodríguez, 1994; Rodríguez y col., 1998b), como para la etapa de juvenil y adulto (Kalogeropoulos y col., 1992; Ibeas y col., 1994, 1996).

Los lípidos cumplen una destacada función como reserva *energética*, concretamente en forma de triglicéridos (TG), o en la producción de energía metabólica obtenida por la β -oxidación de los ácidos grasos que los componen, destinada al crecimiento, reproducción y natación de los peces (Sargent y col. 2002; Tocher, 2003).

Determinadas clases lipídicas, como los fosfolípidos y el colesterol, conjuntamente con las proteínas, desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la integridad *estructural* y funcional de las membranas celulares. La disposición y naturaleza de estos compuestos hacen posible que las membranas mantengan

diferentes concentraciones de electrolitos y sustratos a su través, generando un microambiente que va a determinar las propiedades termodinámicas de proteínas de membrana como receptores, canales, transportadores o ATPasas (Díaz, 2010), condición indispensable para que tenga lugar el correcto funcionamiento celular.

Ciertos PUFA de 20 átomos de carbono, especialmente el ARA, actúan como *precursores de eicosanoides*, moléculas biológicamente activas que manifiestan su acción a muy bajas concentraciones. Según la enzima involucrada en su síntesis, pueden ser cíclicos y se denominan prostanooides, entre los que se incluyen prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos, o lineales, como los hidroxieicosatrienos, de donde derivan los leucotrienos y las lipoxinas. Una tercera vía en la producción de eicosanoides da lugar a las hepoxinas, ácidos grasos hidroxilados y otros derivados (Jump, 2002; Tocher, 2003). Estos compuestos regulan numerosos procesos fisiológicos tanto en mamíferos como en peces, tales como coagulación sanguínea, respuesta inmune e inflamatoria, osmorregulación, tono cardiovascular, control neuronal y renal, así como funciones reproductoras (Mustafa y Srivastava, 1989; Lands, 1993; Asturiano y col., 2000, 2001; Ghioni y col., 2002; Tapiero y col., 2002; Montero y col., 2003; Tocher, 2003; Bell y col., 2006)

Los lípidos dietarios afectan profundamente a la *expresión génica*, dando lugar a cambios en el metabolismo, crecimiento y diferenciación celular. Teniendo en cuenta la implicación de la grasa de la dieta en la iniciación o en la progresión de enfermedades crónicas, el conocimiento de las bases moleculares de su acción sobre el genoma es crítico para poder conocer su papel en la salud animal (Rodríguez y col., 2009). Ciertos receptores nucleares son regulados por ácidos grasos (Gottlicher y col., 1992; Jump y Clarke, 1999). Éstos receptores, son activadores de la proliferación de peroxisomas (PPARs) y son miembros de una familia de factores de transcripción de receptores hormonales nucleares, tales como hormonas esteroideas o retinoides (Issemann y Green, 1990; Tocher, 2003). Consecuentemente, algunos ácidos grasos o los eicosanoides derivados de ellos, actúan como hormonas para controlar la actividad de estos factores específicos de transcripción, los cuales son reguladores críticos de la homeostasis lipídica en vertebrados. A su vez, los PPARs regulan la expresión de genes, que están involucrados en el metabolismo lipídico,

incluyendo el transporte, la biosíntesis, la deposición y almacenaje, así como la oxidación y metabolismo de los ácidos grasos (Smith, 2002).

Los lípidos, a través de sus derivados, pueden actuar modulando diversos procesos fisiológicos a través de *mediadores intracelulares* tales como el adenosín monofosfato cíclico (AMPc), guanosín monofosfato cíclico (GMPc), calcio, inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). Otros mediadores lipídicos de reciente descubrimiento, y aún poco investigados, son las resolvinas y las protectinas. Las resolvinas, que derivan de los ácidos grasos (n-3) HUFA, inhiben la migración de las células inflamatorias a las zonas de la inflamación, e inducen la desactivación de otras células similares. Las protectinas, proceden del DHA, y poseen propiedades antiinflamatorias, inmunoregulatoras y neuroprotectoras (Hong y col., 2005; Serhan y col., 2006).

Sustitución del aceite de pescado en la nutrición de peces

La creciente necesidad de buscar fuentes lipídicas alternativas al aceite de pescado (AP) en la elaboración de piensos para acuicultura de salmónidos y peces marinos, ha sido centro de atención de las investigaciones sobre nutrición de peces en los últimos años. Si el perfil de ácidos grasos de la fuente lipídica sustitutoria, es sustancialmente diferente al de origen marino, su inclusión en la dieta puede afectar negativamente al valor nutritivo del pescado, o al estado de salud y bienestar que deben tener los peces mientras son cultivados. La mayoría de los aceites ensayados hasta la fecha, presentan niveles significativamente más altos de ácido oleico (18:1(n-9), OA) y de (n-6) PUFA total, especialmente el 18:2(n-6), y más bajos de ARA y de (n-3) HUFA como EPA y DHA, y consecuentemente, una menor relación (n-3)/(n-6).

Los aceites vegetales (AVs) son considerados una fuente lipídica alternativa al AP por ser fácilmente metabolizados por los peces, que los utilizan como fuente energética (Bell y col., 2001; Regost y col., 2003b; Stubhaug y col., 2007), por su sostenibilidad y por mantener un precio habitualmente más bajo que el de los AP. Estos factores han dado lugar a que su producción se haya incrementado considerablemente en las últimas tres décadas mientras que las de origen marino han experimentado cierto retroceso (**Tabla 1.1**).

Tabla 1.1. Producción mundial de aceite de pescado, aceites vegetales y grasas animales entre 1980 y 2006 (miles de Tm) y precios medios* del aceite de pescado, de los principales aceites vegetales y del sebo, en el mercado noroccidental europeo en la última década (US\$/Tm)[§]

Fuente lipídica	1980	1985	1990	1995	2000	2005	2006
Aceite de pescado	1.217	1.481	1.412	1.379	1.307 (262)	1.054 (719)	988 (812)
Aceites vegetales							
Aceite de palma	4.543	6.832	11.020	20.322	25.594 (310)	33.733 (422)	36.733 (478)
Aceite de soja	13.382	13.974	16.097	15.119	21.743 (338)	33.575 (545)	35.187 (599)
Aceite de canola/colza	3.478	6.066	8.160	10.936	14.496 (347)	16.205 (669)	18.340 (794)
Aceite de girasol	5.024	6.564	7.869	7.003	9.808 (392)	9.661 (677)	11.094 (658)
Aceite de semilla de algodón	2.922	3.942	3.782	3.312	3.815	4.989	4.917
Resto ¹	7.852	8.866	10.589	14.463	16.038	18.200	18.550
Grasas animales							
Sebo ² /grasa	6.283	6.518	6.813	7.013	8.071 (290)	8.211 (449)	8.446 (451)
Manteca de cerdo	4.691	4.989	5.509	5.141	6.580	7.568	7.877
Grasa de mantequilla	5.746	6.315	6.500	4.834	5.829	6.665	6.790

* Valores entre paréntesis. [§] Datos modificados de Turchini y col. (2009). ¹ Incluye aceite de maní, de almendra de palma, de coco, de oliva, de maíz, de sésamo y de linaza. ² De vaca y oveja.

En los últimos años, se han testado múltiples AVs como potenciales sustitutos del AP, bien individualmente (Caballero y col., 2003; Regost y col., 2003a,b; Izquierdo y col., 2005; Ruyter y col., 2006), bien como mezcla de varios de ellos, intentando conseguir un perfil de ácidos grasos más próximo al de origen marino (Dosanjh y col., 1998; Oxley y col., 2005; Torstensen y col., 2005, 2008; Francis y col., 2007; Montero y col., 2008). La mayoría de estas experiencias se han centrado en determinar los efectos de diferentes niveles de sustitución, utilizando aceites de procedencia diversa como colza (Tocher y col., 2000; Bell y col., 2001; Geurden y col., 2009), linaza (Caballero y col., 2003; Richard y col., 2006b; Montero y col., 2008), soja (Montero y col., 2003; Izquierdo y col., 2005; Martínez-Llorens y col., 2007), palma (Bell y col., 2002; Tocher y col., 2004; Fountoulaki y col., 2009), oliva (Torstensen y col., 2004a;

Stubhaug y col., 2005a; Dópido, 2006), coco (McKenzie, 2001), girasol (Brandsen y col., 2003; Jutfelt y col., 2007; Zakeri y col., 2011), maíz (Fauconneau y col., 1997; Lane y col., 2006), canola (Dosanjh y col., 1998; Huang y col., 2007; Wilson y col., 2007), borraja (Bell y col., 1995a; Tocher y col., 1997) y *Echium* (Bell y col., 2006; Torstensen y col., 2008; Díaz-López y col., 2009, 2010).

En general, los resultados de éste tipo de investigaciones muestran que sustituciones de hasta el 100% en salmónidos (Torstensen y col. 2004b; Fonseca-Madrugal y col., 2006; Jutfelt y col., 2007; Miller y col., 2007; Nanton y col., 2007), y de entre un 50 y un 75% en especies marinas (Izquierdo y col., 2003, 2005; Montero y col., 2005; Mourente y col., 2005b; Benedito-Palos y col., 2007, 2008, 2009; Fountoulaki y col., 2009), pueden llevarse a cabo sin afectar significativamente al crecimiento del pez, ni a la eficiencia del alimento.

Aunque sustituciones elevadas de AP por AVs parecen tener un impacto reducido sobre el rendimiento de los ejemplares, sí modifican la composición de ácidos grasos de diferentes órganos y tejidos. La menor presencia de los (n-3) HUFA, EPA y DHA, así como de ARA, en el músculo de peces, compromete seriamente el valor nutricional del filete para consumo humano, además de poder afectar varias de sus características organolépticas (Serot y col., 2001; Bell y col., 2002; Regost y col., 2003a,b; Torstensen y col., 2004b; Izquierdo y col., 2005; Martínez-Llorens y col., 2007; Nanton y col., 2007). Estas variaciones en el perfil de ácidos grasos, también pueden alterar el estado de bienestar y salud de los peces, al incidir sobre diversos procesos fisiológicos como metabolismo y respuesta inmune. Los mecanismos por los que éstas afecciones pueden tener lugar son diversos. En primer lugar, modificando las propiedades físicas de las membranas celulares, lo que varía la respuesta inmune y la actividad de enzimas asociadas con membranas y receptores (Di Constanzo y col., 1983; Cahu y col., 2000). Segundo, desbalanceando los patrones de producción de eicosanoides derivados de los ácidos grasos de 20 átomos de carbono, ARA y EPA (Bell y col., 1992, 1993; Tocher, 2003; Tocher y col., 2008), que afectan a múltiples procesos del metabolismo celular. Finalmente, actuando sobre las señales de transducción celulares (Sheldon y Blazer, 1991; Montero y col., 2003), que regulan la homeostasis lipídica y el estado de inmunocompetencia del pez.

Así, aunque hay resultados contradictorios, se han descrito daños patológicos estructurales y funcionales en el epitelio intestinal de peces (Olsen y col., 1999, 2003), lesiones cardíacas (Bell y col., 1991b, 1993), variaciones en la dinámica respiratoria (McKenzie, 2001), deterioro funcional en el hígado o aparición de una alta deposición de vesículas lipídicas en hepatocitos (Bell y col., 2001; Stubhaug y col., 2005a; Fountoulaki y col., 2009). Estas afecciones pueden llevar a la aparición de cataratas, deformidades óseas, descamaciones en la piel (Lall y Tibbetts, 2009), aumentar la susceptibilidad frente a diferentes patógenos oportunistas (Hosfeld y col., 2009; Kuntu y col., 2009), pudiendo, en último extremo ocasionar la muerte.

La tendencia al alza de los precios de los principales AVs en los últimos años (**Tabla 1.1**), ha incrementado el interés de la industria acuícola por el uso de aceites de origen animal (AOA) como mantecas de cerdo, sebo de vacuno o grasa de aves de corral o cordero. Como se refleja en la **Tabla 1.1**, los AOA son la fuente lipídica más barata disponible actualmente para la industria acuícola, y por tanto, su utilización en detrimento del AP, daría lugar a una reducción sustancial de los costes del alimento. Además, su amplia disponibilidad en los mercados internacionales y su fácil utilización como fuente energética por los peces, favorecen su inclusión en la formulación dietaria.

Las características químicas de las grasas animales pueden variar ampliamente dependiendo de la historia nutricional del individuo, de la especie y de la edad. En general, contienen altos niveles de ácidos grasos saturados (entre un 28 y un 48%), alrededor de un 40 % de monoinsaturados, y bajas proporciones de PUFA (alrededor del 4% en el sebo de vaca y ligeramente superior al 20% en la grasa de aves de corral). Aunque ciertas investigaciones han desvelado la presencia de pequeñas cantidades de EPA y DHA en grasas de origen animal (Moretti y Corino, 2008), en general, han sido citados a niveles traza y por tanto, deben ser considerados carentes de (n-3) HUFA, al igual que los AVs. Los AOA poseen menores proporciones de 18:2(n-6) que la mayoría de los aceites extraídos de plantas, y por eso, su relación (n-3)/(n-6) es más alta que la de aceites vegetales frecuentemente utilizados en acuicultura como palma, soja o girasol. Turchini y col. (2009) indican que el contenido de 18:2(n-6) en la fuente lipídica, debe ser considerado como uno de los parámetros más desfavorables en la valoración de una fuente lipídica como ingrediente de dietas

para acuicultura, ya que es el principal responsable de las negativas modificaciones de la composición en ácidos grasos de los filetes de peces de cultivo. Por lo tanto, la inclusión de los AOA como alternativa a sustituir parcialmente al AP en la formulación de piensos para acuicultura, parece viable desde el punto de vista de su perfil de ácidos grasos, pobre en 18:2(n-6) y rico en saturados y monoeno (Turchini y col., 2009), ácidos grasos muy abundantes y fisiológicamente importantes en el medio marino (Sargent y col., 2002; Tocher, 2003).

Los escasos resultados disponibles hasta la fecha, indican que la incorporación de diferentes AOA en la dieta para peces dulceacuícolas y salmónidos en porcentajes próximos al 50% del lípido total, no afectan negativamente al crecimiento ni a la eficiencia del alimento (Rosenlund y col., 2001; Caballero y col., 2002; Turchini y col., 2003; Bureau y Gibson, 2004; Liu y col., 2004, Higgs y col., 2006; Babalola y col., 2009), a pesar de que la digestibilidad del AOA parece ser más baja que la de la mayoría de los AVs, probablemente debido al elevado porcentaje de saturados de su composición (Caballero y col., 2002; Martins y col., 2009). La mayoría de estas investigaciones no detectan efectos negativos por la inclusión de AOA en la dieta en la calidad del filete.

Por último, destacar que uno de los perjuicios que lleva aparejado el consumo de pescado es el nivel de contaminantes químicos, tanto orgánicos como inorgánicos, que pueden incorporar las distintas especies comerciales (Hites y col., 2004; Corsolini y col., 2005; Dórea, 2008). En las dietas comerciales de uso en acuicultura, el aceite de pescado es la fuente más importante de contaminantes orgánicos persistentes (policlorobifenilos, dioxinas, pesticidas organoclorados e hidrocarburos policíclicos aromáticos). La sustitución del AP en los piensos para acuicultura, por ingredientes de origen vegetal o animal terrestre, reduce la presencia de éstos compuestos orgánicos en el pescado (Bell y col., 2005; Berntssen y col., 2005; Saera-Vila y col., 2009; Náchter-Mestre y col., 2009, 2010), con el consiguiente beneficio para la salud alimentaria.

1.3. El transporte intestinal en peces

Características del transporte intestinal

El intestino es un complejo órgano multifuncional. A lo largo del tracto gastrointestinal de vertebrados se desarrolla la digestión del alimento ingerido y la absorción de nutrientes, presentando además, un papel fundamental en la inmunidad de los individuos, al actuar como barrera contra la entrada de patógenos invasores hacia el torrente circulatorio. En teleósteos marinos, el epitelio intestinal interviene, conjuntamente con el epitelio branquial, en los procesos de osmorregulación e ionorregulación, manteniendo el equilibrio hidrosalino y contribuyendo, por tanto, a mantener la homeostasis del animal.

Aunque muchos de los procesos fisiológicos que intervienen en la digestión y absorción de nutrientes son similares en peces al resto de vertebrados (Tocher y col., 2008), el ambiente marino en el que habitan, conlleva inevitables diferencias. El fluido corporal de la mayoría de los teleósteos marinos (~300-330 mosmol/l) es hipoosmótico con relación al agua de mar (~1000 mosmol/l) (Grosell y Taylor, 2007; Kurita y col., 2008), y, por tanto, tiene tendencia a perder agua y ganar sales. Para evitar la deshidratación, los peces marinos beben agua salada continuamente, agua que desalinizan antes de ser absorbida, eliminando finalmente la sal a través de diversos procesos (Marshall y Grosell, 2005). El agua marina ingerida se desala parcialmente en el esófago como consecuencia de la elevada absorción de NaCl en este epitelio, altamente impermeable al agua, antes de entrar en el estómago. El fluido intestinal continúa desalándose a lo largo del intestino gracias al transporte activo de iones monovalentes desde el lumen hacia la sangre. Los iones monovalentes absorbidos, principalmente Na^+ y Cl^- , son excretados posteriormente a través de las branquias. Los procesos de desalinización reducen la osmolaridad del agua de mar ingerida y permite su absorción pasiva a través del epitelio intestinal. Cationes divalentes como Mg^{2+} y Ca^{2+} , también presentes en el agua de mar, se van concentrando hasta niveles muy altos, a medida que se va produciendo la absorción de agua en el intestino. Estos cationes divalentes, se absorben por transporte activo y son eliminados por el riñón, aunque en parte pueden precipitar como depósitos carbonatados insolubles en agua, y ser eliminados a través de los fluidos rectales

(Kurita y col., 2008). La absorción de electrolitos y agua a través del epitelio intestinal, juega un papel destacado en la recuperación o reabsorción de aquellos productos secretados al tubo digestivo desde el estómago, páncreas, vesícula biliar e intestino delgado, para contribuir a los procesos digestivos (Karasov y Hume, 1997).

La absorción de agua, juega un papel crucial en los procesos de osmorregulación en teleósteos marinos, y está ligada fuertemente al transporte activo de NaCl, que depende de la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ de la membrana basolateral del enterocito. Esta ATPasa, muestra una elevada expresión y una alta actividad en el intestino de peces aclimatados a agua de mar (Fuentes y col., 1997; Jensen y col., 1998; Cutler y col., 2000; Seidelin y col., 2000), creando un gradiente electroquímico para el Na^+ , que permite la entrada de Na^+ , Cl^- y K^+ , a través de la membrana apical, *vía* dos sistemas de cotransporte que actúan paralelamente, $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ y $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ (Frizzell y col., 1979; Musch y col., 1982; Halm y col., 1985; Trischitta y col., 1992). Una vez en el interior celular, el Cl^- y el K^+ difunden a través de la membrana basolateral, mientras que el Na^+ es bombeado a los espacios intercelulares por la ATPasa Na^+/K^+ . Grosell (2006), analiza los resultados obtenidos en las tasas netas de absorción de Na^+ y Cl^- a través del epitelio intestinal de ocho especies de teleósteos marinos, concluyendo que en todas ellas, el transporte de cloruro excede al transporte de sodio. Aunque este exceso en la absorción neta de cloruro respecto al sodio, podría ser explicada por la estequiometría del sistema de transporte $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$, las bajas concentraciones de potasio en el agua de mar, parecen indicar que existe un segundo sistema de transporte involucrado en la absorción de cloruro. Las secreciones de HCO_3^- hacia la luz intestinal (Ando y Subramanyam, 1990; Grosell y col., 2001, 2009; Wilson y col., 2002; Whittamore, 2008), alcanzando concentraciones hasta 50 veces superiores a las del medio marino, sugieren que además de los 2 cotransportadores que modulan en la entrada de Cl^- al interior celular, existe un intercambiador aniónico $\text{Cl}^-/\text{CO}_3\text{H}^-$ en la membrana apical del enterocito, que contribuye significativamente a la absorción intestinal de cloruro, a la vez que secreta CO_3H^- hacia la luz intestinal (Grosell, 2006; Grosell y Taylor, 2007). El CO_3H^- celular procede de la reacción del CO_2 metabólico con el agua ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CO}_3\text{H}_2 \rightleftharpoons \text{CO}_3\text{H}^- + \text{H}^+$) en una reacción catalizada por la enzima anhidrasa carbónica. Los H^+ producidos en la hidratación de las moléculas de CO_2 , son intercambiados por Na^+

mediante un sistema antiporte (Na^+/H^+) localizado en la membrana basolateral. Esta extrusión de H^+ , es crítica para el intercambio aniónico apical y para generar la fuerza osmótica conductora que dirige la absorción celular de agua. Según esta hipótesis, el modelo propuesto para la absorción de electrolitos y agua a través del intestino de teleósteos marinos queda reflejado en la **Figura 1.2**.

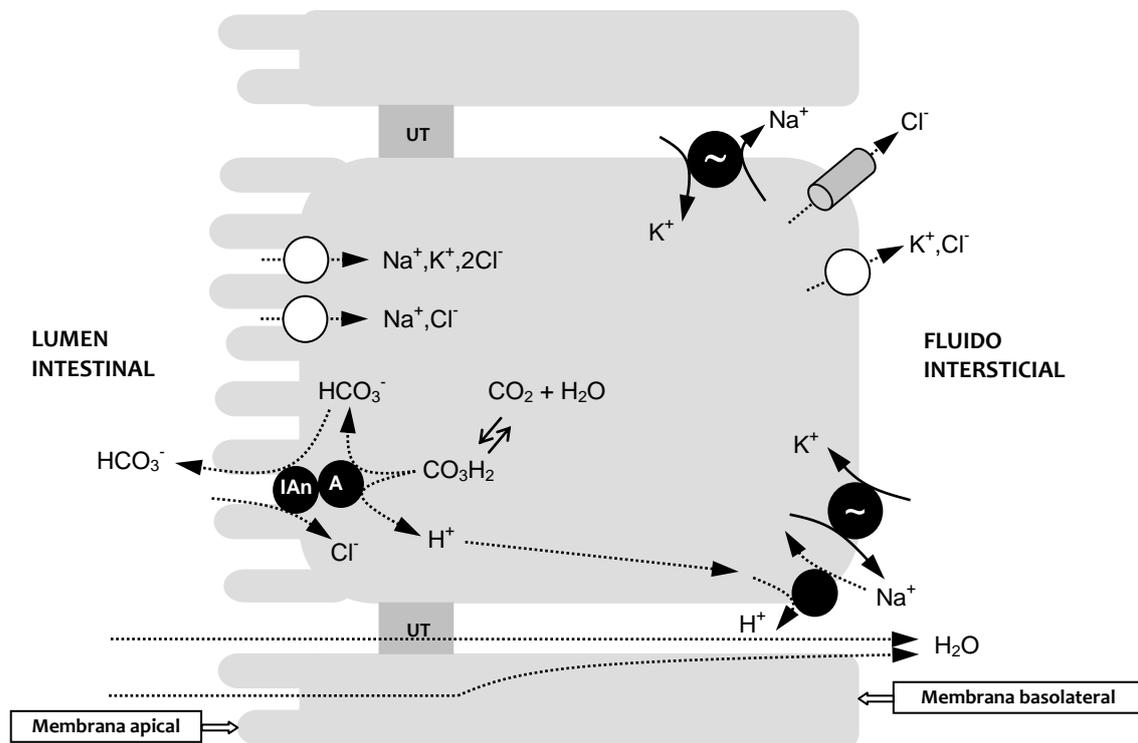


Figura 1.2. Modelo simplificado de los procesos de transporte de electrolitos y agua en células del epitelio intestinal de teleósteos marinos (modificado de Grossell (2011)). UT, uniones tipo "tight"; (-), ATPasa Na^+/K^+ ; IAn, intercambiador aniónico; AC, anhidrasa carbónica.

El movimiento de electrolitos a través del epitelio intestinal genera, entre el lado serosal y el mucosal, una intensidad de corriente que da lugar a una diferencia de potencial (DP), tanto a través de la membrana apical y basolateral del enterocito, como a nivel transepitelial. La evaluación de las propiedades eléctricas del epitelio intestinal es una práctica habitual en los estudios *in vitro* sobre flujos transepiteliales de electrolitos y nutrientes, contribuyendo enormemente a la interpretación de los resultados de transporte obtenidos (Kimmich y col., 1977; Field y col., 1978; Smith,

1983; Hatch y Freel, 1988; Lorenzo y col., 1989; Trischitta y col., 1996, 2007; Lionetto y col., 1998; Geurden y col., 2009; Grosell y col., 2009). Así por ejemplo, se ha observado que la DP en diversas especies de peces eurihalinos se aproxima a cero, pudiendo ser ligeramente positiva o negativa. Cuando los ejemplares son adaptados a agua salada, la DP incrementa su negatividad o se invierte de serosa positiva a serosa negativa (Ando, 1975; Ando y col., 1975; Collie, 1985). Estas diferencias han sido atribuidas al notable incremento de la absorción intestinal del ión cloruro, comparado con los valores obtenidos en un medio más diluido. Durante este proceso, las propiedades de permeabilidad de la membrana basolateral y de borde en cepillo se ajustan separadamente (Lahlou, 1983; Grosell y col., 2009).

El epitelio intestinal actúa como una barrera formada por enterocitos unidos por su zona apical mediante uniones tipo “tight”, que regulan la difusión pasiva de iones y moléculas entre el lumen y el medio interno en función de su permeabilidad. En general, el mecanismo de absorción intestinal de nutrientes en peces es similar al descrito en mamíferos. Así por ejemplo, la entrada de D-glucosa en las células epiteliales intestinales tiene lugar mediante un proceso de *simporte* Na^+ -dependiente, es decir, una molécula de glucosa y un ion de sodio son cotransportados simultáneamente a través del mismo transportador, situado en la membrana del borde en cepillo del enterocito, mientras que su salida de la célula a través de la membrana basolateral hacia la sangre, se produce por difusión facilitada independiente de Na^+ (Eveloff y col., 1980; Ferraris y Ahearn, 1984; Storelli y col., 1986; Draï y col., 1990; Ahearn y col., 1992; Nordrum y col., 2000). El paso de ambas moléculas al interior celular tiene lugar aprovechando el gradiente electroquímico favorable para el sodio, establecido a través de la membrana luminal por la actividad continua de la ATPasa Na^+/K^+ , localizada en la membrana basolateral del enterocito. Éste cotransportador Na^+ -glucosa es pues, el responsable de la absorción de la D-glucosa en contra de un gradiente de concentración considerable y, por lo tanto, de la conservación de un nutriente esencial, principal fuente energética para el funcionamiento celular.

Diversos autores han postulado la existencia de diferencias en los procesos absorptivos a lo largo del eje longitudinal del tracto intestinal, tanto en mamíferos (Karasov y Hume, 1997; Breves y col., 2007), como en peces (Aoki y col., 2003; Grosell y Taylor, 2007). Nuestro grupo de investigación registró variaciones

significativas en las tasas de transporte transepitelial de glucosa y galactosa entre el segmento anterior y posterior de juveniles de dorada (Lorenzo y col., 1987b). Asimismo, se ha puesto de manifiesto una heterogeneidad morfológica y funcional en sentido antero-posterior del intestino de esta especie, evidenciando diferencias en la actividad de enzimas digestivas y de diversas ATPasas de membrana, incluyendo la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (Almansa y col., 2001b; Dópido y col., 2004; Dópido, 2006).

Influencia de los lípidos en el transporte intestinal

Como se ha mencionado anteriormente, en las membranas de las células epiteliales que cubren el lumen intestinal, está presente una amplia variedad de sistemas de transporte especializados, que permiten la absorción selectiva de nutrientes y electrolitos, y su subsecuente transferencia a los espacios intersticiales.

La actividad fisiológica de las membranas celulares depende de sus propiedades físico-químicas, que están fuertemente influenciadas por su composición lipídica. Una de estas propiedades es el grado de libertad de las moléculas para moverse a través de ellas, o fluidez de membrana, que está a su vez relacionada con el empaquetamiento de los lípidos en la bicapa. Entre los factores que afectan a este empaquetamiento figuran, la abundancia de colesterol en la membrana, las interacciones polares y no polares entre lípidos y proteínas, la naturaleza del grupo polar de los fosfolípidos de membrana, y, en particular, las características químicas de las cadenas de ácidos grasos que los componen y que regularán la relación insaturados/saturados y el grado de insaturación o la relación (n-3)/(n-6) (Di Constanzo y col., 1983; Brasitus y col., 1985; Spector y Yorek, 1985; Calder y col., 1994; Barriviera y Hasson-Voloch, 1996; El Babili y col., 1996; Simopoulos, 1999; Tabas, 2002; Kline, 2008; Deng y col., 2009; Yang y col., 2011).

La capacidad del intestino de especies eurihalinas y euritermas como la dorada, para aclimatarse a cambios ambientales, manteniendo la integridad de las membranas celulares, ha hecho que haya sido tomado como modelo para responder cuestiones concretas sobre regulación osmótica no sólo de peces, sino también de mamíferos. Estas adaptaciones llevan asociadas alteraciones en su composición lipídica, aceptándose que, en general, altas temperaturas, altas salinidades y bajos

niveles de oxígeno inhiben mecanismos de desaturación, dando lugar a membranas más rígidas y menos permeables (Detorrengo y Brenner, 1976; Leray y col., 1984; Thomas y col., 1998; Tocher y col., 2004). Así por ejemplo, los peces pueden adaptarse a temperaturas frías aumentando la presencia de HUFA, especialmente DHA, en los fosfolípidos de membrana, como un mecanismo para regular la funcionalidad de las mismas (Miller y col., 1976; Thompson y col., 1977; Ingemansson y col., 1993; Sargent y col., 1995). Por otro lado, como consecuencia de las adaptaciones fisiológicas al agua salada, también se producen complejas modificaciones funcionales y de composición lipídica, en la membrana de los órganos osmorreguladores de peces migratorios y eurihalinos (Leray y Florentz, 1983; Veillette y col., 1993). Leray y col. (1984) observaron que la concentración de DHA se incrementaba notablemente en los fosfolípidos de la mucosa intestinal de trucha (*Salmo gairdnerii*), cuando era transferida de agua dulce a salada. Esta adaptación se produce en respuesta a las necesidades osmoreguladoras del pez, al comenzar a beber continuamente tras su introducción en un medio hiperosmótico con respecto al plasma.

El incremento en la fluidez de las membranas ha sido correlacionado positivamente también con la reducción de la entrada Na^+ -dependiente de hexosas al interior de células epiteliales de diferentes órganos (Friedlander y col., 1988; Friedlander y Amiel, 1989). Así por ejemplo, tomas moderadas de EPA dieron lugar a una reducción en la capacidad de transportar glucosa y colesterol *in vitro* por parte del yeyuno aislado de rata (Thomson y col., 1989). Leray y Florentz (1983), y Di Constanzo y col. (1983), trabajando con trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), demostraron que los AGE jugaban un papel importante en el mantenimiento de la flexibilidad de la estructura de las membranas, y, por lo tanto, en el mantenimiento de un correcto transporte iónico y de solutos.

En resumen, la dependencia que de las proteínas de membrana tienen los sistemas de transporte localizados en las membranas celulares, lleva a pensar que cualquier modificación del entorno lipídico de estas proteínas, podría afectar tanto a la actividad enzimática de las mismas como a los transportadores, y por tanto, al paso de electrolitos y nutrientes de un compartimento a otro, alterando la

absorción/secreción neta de los mismos y, concomitantemente, la composición del medio interno.

Regulación de los procesos de transporte

Todos los procesos celulares de transporte a través de las membranas epiteliales deben ser regulados en función de las alteraciones que sufra el medio interno (concentración de nutrientes, electrolitos y agua, pH, etc.) y el medio externo (disponibilidad de los nutrientes, cambios de salinidad y temperatura, etc.). En la membrana plasmática existen proteínas receptoras que captan y transducen señales del medio (externo e interno), en otras señales intracelulares que son transportadas por segundos mensajeros entre los que se encuentra el AMPc.

El AMPc es sintetizado a partir del adenosín trifosfato (ATP), mediante la acción de la enzima adenilatociclasa localizada en la membrana celular. La producción de AMPc intracelular en el intestino es estimulada directamente por las prostaglandinas (eicosanoides derivados principalmente de los ácidos grasos 20:5(n-3) y 20:4(n-6)), la toxina colérica, el péptido intestinal vasoactivo ("vasoactive intestinal peptide", VIP) y la forskolina, mediante la activación de la adenilatociclasa. Por otro lado, la eliminación celular del AMPc es catalizada por la fosfodiesterasa, cuya acción es inhibida por la teofilina. Por tanto, sustancias que estimulan la adenilatociclasa o inhiben la fosfodiesterasa conducen a la acumulación intracelular de AMPc. En general, tanto el AMPc, como los agentes que elevan su concentración intracelular, inducen alteraciones en el transporte de cloruro en el intestino de vertebrados, estimulando su secreción e invirtiendo su absorción neta (Binder, 1981; Field, 1981; Bridges y Rummel, 1986; Hatch y Freel, 1988; Forte y col., 1992; Charney y col., 1999; Marshall, 2003; Carlson y col., 2004). Frizzell y col. (1979) pusieron de manifiesto que en el intestino del pez limón (*Pseudopleuronectes americanus*), el incremento en los niveles intracelulares de AMPc reduce la absorción de Cl⁻ mediante la inhibición del cotransporte Na/Cl en dirección serosa. En la revisión de Smith (1983), el autor hace referencia a que el AMPc afecta al transporte de Cl⁻ a través del intestino de peces, causando un incremento general en la conductancia pasiva del Cl⁻. Más recientemente, Trischitta y col. (1996), mostraron que el AMPc regulaba el transporte transepitelial en el intestino de la anguila europea (*Anguilla anguilla*),

actuando sobre los mecanismos de transporte transcelular. Concretamente, los autores sugieren que esta regulación se lleva a cabo activando la secreción de Cl^- mediante la apertura de los canales apicales de Cl^- .

El transporte de D-glucosa dependiente del sodio, es inhibido competitivamente por la floricina, a nivel del cotransportador que se encuentra en la membrana celular apical. La validez de la utilización de esta sustancia de origen vegetal, en las investigaciones sobre el transporte intestinal de D-glucosa, tanto en teleósteos carnívoros como herbívoros, impidiendo el paso del azúcar al interior celular y, por lo tanto, evitando su concentración intracelular, ha sido demostrada por diversos autores (Storelli y col., 1986; Reshkin y Ahearn, 1987; Ahearn y col., 1992).

Si bien existen diversos estudios que relacionan los ácidos grasos dietarios con la composición lipídica de distintos tejidos y su influencia en la regulación de diversos procesos fisiológicos, no existe información, hasta el momento, donde se relacione la influencia de los ácidos grasos de la dieta con los mecanismos implicados en el transporte de electrolitos y nutrientes a través del epitelio intestinal de peces y su posible efecto sobre la composición del medio interno. El propósito del presente estudio es ofrecer una visión integradora de la influencia de los ácidos grasos dietarios de origen marino o terrestre, animal o vegetal, sobre el desarrollo, estado de salud, composición lipídica corporal y transporte de electrolitos y nutrientes a través del epitelio intestinal de juveniles de dorada *Sparus aurata*.

2. OBJETIVOS

La investigación desarrollada en la presente Tesis Doctoral pretende evaluar los efectos que la sustitución parcial o total del aceite de pescado por mezclas de aceites de origen terrestre animal y/o vegetal, en la dieta de juveniles de dorada (*Sparus aurata*), tiene sobre el desarrollo, estado de salud de los ejemplares, composición lipídica corporal e integridad funcional del tracto intestinal.

Para la consecución de este objetivo se establecieron dos grupos experimentales, un grupo control alimentado con un nivel dietario adecuado de (n-3) y (n-6) HUFA (DC), y un segundo grupo alimentado con una dieta deficiente en estos ácidos grasos esenciales (DD), llevándose a cabo un estudio comparado de los siguientes aspectos:

- i. Parámetros biométricos.
- ii. Composición lipídica del músculo.
- iii. Composición lipídica del hígado, hematocrito, cerebro y tracto intestinal.
- iv. Transporte intestinal de cloruro, sodio y glucosa.
- v. Análisis bioquímico del medio interno. Parámetros plasmáticos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

El desarrollo experimental de la presente memoria se llevó a cabo, fundamentalmente, en las instalaciones de tres centros de investigación:

i) Planta de Cultivos Marinos del Centro Costero de Canarias, del Instituto Español de Oceanografía, donde tuvieron lugar todas las tareas relacionadas con el cultivo de peces como la elaboración de las dietas experimentales, alimentación de los juveniles y realización de muestreos biométricos.

ii) Laboratorio de Fisiología del Departamento de Biología Animal, de la Universidad de La Laguna, donde se desarrolló la recogida y almacenamiento de muestras, la extracción lipídica y los estudios *in vitro* de electrofisiología y de cuantificación de sistemas de absorción de electrolitos y nutrientes a través del intestino.

iii) Laboratorio de Bioquímica Acuática de la Universidad de Stirling (Escocia), donde se llevó a cabo la separación y aislamiento de clases lipídicas de los lípidos totales, así como el análisis de la composición en ácidos grasos de los extractos lipídicos obtenidos.

3.1. Condiciones experimentales

Se distribuyeron aleatoriamente 150 juveniles de dorada europea de 135 g de peso medio, en 6 tanques troncocónicos de fibra de vidrio de 1000 l de capacidad, asignando tres tanques para cada dieta experimental. El cultivo se mantuvo con renovación continua de agua de mar filtrada y aireación suave, para asegurar la limpieza del medio y mantener el nivel de oxígeno en valores próximos a saturación. Durante el periodo de engorde (febrero a junio), el fotoperiodo fue natural y la temperatura del agua osciló entre 18,0 y 21,9 °C.

3.2. Alimentación

Se fabricaron dos piensos experimentales con el mismo aporte total de proteína, lípido y carbohidrato. En una de las dietas, el aporte lipídico, consistió en una mezcla de aceite de pescado (35 g/kg dieta) y grasa de origen animal (60 g/kg dieta), que

complementó el 8,5% de lípido presente en la harina de pescado utilizada en su fabricación. Este pienso fue formulado para satisfacer las necesidades de (n-3) HUFA de los juveniles de dorada (Ibeas y col., 1994), y se utilizó como dieta de referencia o dieta control (DC). En la segunda dieta, deficiente en HUFA (DD), se eliminó totalmente el aceite de pescado (incluyendo el 8,5% de la harina de pescado), siendo sustituido por una mezcla de aceites vegetales (linolénico y maíz, 10:70) (**Tabla 3.1**).

Los peces fueron alimentados hasta saciedad aparente 2 veces al día, una por la mañana (09:00 h) y otra por la tarde (15:00 h), anotándose diariamente la cantidad de alimento ingerido en cada tanque. Durante el mes previo al comienzo de la experiencia de engorde, considerado de aclimatación a las nuevas condiciones de cultivo y a las características de textura, sabor y aroma del nuevo alimento, todos los ejemplares recibieron la dieta deficiente en ácidos grasos esenciales. Tras este periodo inicial, y durante los siguientes 120 días, se alimentaron los peces de tres tanques con la DC, mientras que a los tres grupos restantes se les siguió suministrando la DD.

Elaboración de las dietas

Se empleó un equipo de mezcladora-picadora-peletizadora que permitía obtener gránulos de características similares a las de los piensos comerciales (**Figura 3.1**). En primer lugar, se mezclaban los ingredientes secos empezando por los de menor cantidad (exceptuando el cloruro de colina), a continuación se añadía la mezcla de aceite con la vitamina E y, por último, una cantidad de agua, donde se había disuelto el cloruro de colina, para conseguir la peletización de la mezcla. El diámetro del pienso fue de 3 mm. Una vez obtenido, fue secado a 35 °C durante 10 h y embolsado en cantidad suficiente para cubrir la alimentación semanal de cada grupo experimental. El alimento que iba a ser utilizado en la semana en curso era mantenido en un lugar fresco y oscuro, mientras que el resto se conservó a -20 °C hasta el momento de su utilización. Se recogieron muestras de los dos piensos experimentales para su posterior análisis bioquímico. Los ingredientes empleados en la formulación de ambas dietas y su composición proximal, así como su composición en clases lipídicas y en ácidos grasos, aparecen reflejados en la **Tabla 3.1**, **Tabla 3.2** y **Tabla 3.3**, respectivamente.

El proceso de elaboración fue idéntico para las dos dietas, exceptuando que en la preparación de la DD, la harina de pescado fue desengrasada previamente, con el fin de eliminar totalmente su contenido en HUFA. Para desengrasar la harina de pescado, se introducía en un mezclador con 3 litros de cloroformo por kilogramo de harina, removiendo continuamente durante 30 minutos aproximadamente. Seguidamente, se filtraba la mezcla a través de un sistema compuesto por un embudo Büchner-matriz Kitasato al que se aplicaba vacío, separando la harina de pescado del cloroformo, que arrastraba los lípidos de la misma, repitiendo esta operación en 3 ocasiones. Para eliminar los restos de solvente, la harina, prácticamente libre de lípido, era esparcida en bandejas y secada en estufa a 35 °C durante unas 3 horas, removiéndola periódicamente.



Figura 3.1. Aspecto de las dietas experimentales.

Tabla 3.1. Ingredientes y composición proximal de las dietas experimentales

Ingredientes (g/kg)	DC	DD
Harina de pescado	530	485*
Caseína	150	150
Almidón de maíz	110	110
α -celulosa	50	50
Cloruro de colina	9	9
Carboximetilcelulosa	5	5
Vitamina E	1	1
Mezcla de vitaminas y minerales ¹	50	50
Grasa de vaca	60	60
Aceite de pescado ²	35	---
Ácido linolénico	---	10
Aceite de maíz	---	70
Composición proximal (%)³		
Humedad	10,4 \pm 1,9	12,2 \pm 1,4
Proteína cruda (% peso seco)	50,3 \pm 1,0	51,0 \pm 0,9
Lípido (% peso seco)	14,9 \pm 1,4	15,3 \pm 0,7
Cenizas (% peso seco)	9,3 \pm 0,3	9,9 \pm 0,6

DC, dieta control; DD, dieta deficiente en HUFA; *harina de pescado desengrasada. ¹Contiene (por kg de dieta): Acetato de retinol (vit A), 20000 UI; Colecalciferol (vit D3), 6000 UI; α -tocoferol (vit E), 240 mg; menadiona (vit K3), 20 mg; tiamina (vit B1), 50 mg; riboflavina (vit B2), 50 mg; piridoxina (vit B6), 33 mg; cianocobalamina (vit B12), 0,06 mg; ácido pantoténico, 160 mg; ácido nicotínico, 300 mg; ácido ascórbico (vit C), 600 mg; ácido fólico, 15 mg; biotina (vit H), 1,5 mg; inositol, 1500 mg; MgO, 460 mg; MnO, 120 mg; ZnO, 400 mg; FeCO₃, 16 mg; (CuSO₄) · 5H₂O, 12 mg; (CoSO₄) · 7H₂O, 1,6 mg; Na₂SeO₃, 1,6 mg; KI, 40 mg. ²Mezcla de triglicéridos con un 40% de (n-3) HUFA (Nippai Chemical Food Ltd., Kyoto, Japón). ³Valores expresados como media \pm DE (n=3).

Tabla 3.2. Composición en **clases lipídicas** de las dietas experimentales

	DC	DD	P
Lisofosfatidilcolina	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,2	N.S.
Esfingomiolina	1,1 ± 0,3	0,8 ± 0,2	N.S.
Fosfatidilcolina	8,5 ± 3,1	4,8 ± 0,9	N.S.
Fosfatidilserina	0,4 ± 0,2	0,1 ± 0,1	N.S.
Fosfatidilinositol	1,1 ± 0,2	0,6 ± 0,3	N.S.
Fosfatidiletanolamina	2,5 ± 1,1	0,8 ± 0,4	N.S.
Total lípidos polares	14,4 ± 4,9	8,2 ± 1,8	N.S.
Acilgliceroles parciales	1,2 ± 0,4	1,3 ± 0,3	N.S.
Colesterol	5,6 ± 1,2	3,4 ± 1,1	N.S.
Ácidos grasos libres	8,0 ± 3,1	3,6 ± 0,9	N.S.
Triacilgliceroles	63,2 ± 3,8	70,3 ± 2,9	N.S.
Ésteres de esteroles	7,4 ± 1,6	12,8 ± 1,3	<0,01
No identificados	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,2	N.S.
Total lípidos neutros	85,6 ± 4,9	91,8 ± 1,8	N.S.

Valores expresados como media ± DE (n=3). N.S., no significativamente diferentes.

Tabla 3.3. Composición en ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) del **lípidio total** de las dos dietas experimentales

	DC	DD	P
14:0	5,4 ± 0,2	1,6 ± 0,4	<0,001
14:1	nd	0,1 ± 0,1	N.S.
15:0	0,5 ± 0,0	0,2 ± 0,1	<0,001
15:1	tr	0,2 ± 0,1	<0,05
16:0	24,0 ± 0,8	18,9 ± 3,0	<0,01
16:1(n-9)	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,0	N.S.
16:1(n-7)	5,6 ± 0,2	1,4 ± 0,5	<0,001
16:1(n-5)	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,1	N.S.
16:2	0,6 ± 0,0	nd	<0,001
17:0	0,9 ± 0,0	0,7 ± 0,2	<0,05
16:3	0,4 ± 0,0	0,2 ± 0,2	N.S.
16:4	1,2 ± 0,1	nd	<0,001
18:0	11,6 ± 0,3	11,1 ± 3,7	N.S.
18:1(n-9)	22,1 ± 0,7	27,5 ± 2,4	<0,001
18:1(n-7)	3,3 ± 0,2	1,3 ± 0,3	<0,001
18:1(n-5)	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	N.S.
18:2(n-6)	1,4 ± 0,0	27,2 ± 1,2	<0,001
18:3(n-6)	0,2 ± 0,2	nd	N.S.
19:0	nd	0,1 ± 0,1	N.S.
18:3(n-3)	0,5 ± 0,0	6,9 ± 0,4	<0,001
18:4(n-3)	1,4 ± 0,1	nd	<0,001
20:0	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,0	<0,01
20:1(n-11)	0,4 ± 0,0	0,1 ± 0,1	<0,001
20:1(n-9)	0,7 ± 0,1	0,2 ± 0,0	<0,001
20:4(n-6)	0,8 ± 0,1	nd	<0,001
20:4(n-3)	0,4 ± 0,0	nd	<0,001
20:5(n-3)	8,9 ± 1,1	0,2 ± 0,1	<0,001
22:1(n-11)	0,5 ± 0,1	nd	<0,01
21:5(n-3)	0,3 ± 0,0	nd	<0,01
22:5(n-3)	1,0 ± 0,1	nd	<0,01
24:0	nd	0,1 ± 0,0	N.S.
22:6(n-3)	5,5 ± 0,8	0,4 ± 0,2	<0,001
No identificados	1,7 ± 0,3	1,1 ± 0,3	
Total saturados	42,5 ± 1,2	33,0 ± 6,5	<0,05
Total MUFA	33,1 ± 1,2	31,1 ± 3,4	N.S.
Total PUFA	22,7 ± 2,4	34,8 ± 3,1	<0,001
Total (n-6)	2,4 ± 0,2	27,2 ± 1,2	<0,001
Total (n-3)	18,1 ± 2,3	7,5 ± 0,4	<0,001
(n-3)/(n-6)	7,5 ± 1,1	0,3 ± 0,1	<0,001
Total (n-3) HUFA	16,2 ± 2,2	0,6 ± 0,2	<0,001

Valores expresados como media ± DE (n=5). N.S., no significativamente diferentes; nd, no detectado; tr, valor <0,05%; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados ($\geq C_{20} \geq 3$ dobles enlaces).

3.3. Parámetros biométricos

Mensualmente, se extraían los ejemplares de cada tanque de cultivo y se depositaban en recipientes plásticos con 1ml/l de anestésico (300 g clorobutanol/l etanol 96%) para ser muestreados. Se tomaba la longitud total de cada pez, desde la boca hasta la furca o punto medio de la aleta caudal, con la ayuda de un ictiómetro, y se pesaba con una balanza de una décima de gramo de precisión. Se comprobaba asimismo el estado sanitario general de los individuos observando el aspecto de las branquias, piel y mucus, antes de ser devueltos a los tanques experimentales para continuar con el desarrollo experimental.

3.4. Recogida de muestras

Al final del periodo de experimentación, los peces fueron trasladados en grupos de 3-4 ejemplares, desde su lugar de cultivo hasta el laboratorio del Departamento de Biología Animal de la Universidad de La Laguna, en un recipiente de unos 50 l de capacidad con aireación continua. Una vez en el laboratorio, eran introducidos en peceras de 60 l con circuito cerrado de agua, mantenido con un sistema de filtrado (Aquaviva 500, Sicce, Pádova, Italia) que permitía la recirculación del agua a una tasa de 5 l/min y con un motor difusor de aire (Ciroco D-2, Ocoric, Barcelona) que producía aireación a una tasa constante.

Los peces eran mantenidos en inanición en estas condiciones durante 36-48 h antes de ser sacrificados, con el objeto de eliminar restos de comida del tracto digestivo.

3.4.1. Extracción de sangre

Se pinchaba el pez en la vena caudal, justo por detrás de la aleta anal, con una jeringa en la que se había introducido previamente un pequeño volumen de heparina que actuaba como anticoagulante, y se extraían entre 2 y 3 ml de sangre (**Figura 3.2**). Este volumen de sangre era inmediatamente introducido en un tubo de vidrio y centrifugado a 0 °C a 5000 x g durante 5 min, para conseguir la separación del hematocrito y plasma sanguíneo. El volumen superior, donde se hallaba el plasma

sanguíneo, se introducía en un Eppendorf, mientras que el inferior, correspondiente al hematocrito, se pasaba a un vial de plástico. Ambos recipientes se etiquetaban convenientemente y se congelaban a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis.



Figura 3.2. Extracción de sangre.

3.4.2. Extracción de órganos

Inmediatamente después de tomar la muestra de sangre, se sacrificaba al animal mediante una sección rápida en la espina dorsal, siguiendo los métodos de sacrificio aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de La Laguna, según el Real Decreto 223/1988 (B.O.E. de 18 de marzo), sobre protección de animales de experimentación. Esta normativa está de acuerdo con la Directiva Europea 89/609/CE relativa a la aproximación a las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros, referente a la experimentación animal. Seguidamente, se abría el ejemplar lateralmente por la región abdominal y se le extraía diferentes órganos. El intestino, que tras eliminarle el mesenterio y tejido adiposo, era

inmediatamente sumergido en solución Ringer a 0 °C, oxigenada, a pH 7,3, para proceder al lavado y vaciado de contenido. La composición de la solución Ringer utilizada a lo largo de la presente memoria fue:

Solución Ringer	
NaCl	220 mM
NaHCO₃	30 mM
KCl	4,5 mM
CaCl₂	2 mM
MgSO₄	1 mM
NaH₂PO₄	0,6 mM
Na₂HPO₄	1,4 mM
Glucosa	1 mM

El tracto intestinal se dividía a lo largo de su eje longitudinal en dos secciones: segmento anterior, desde detrás de los ciegos intestinales hasta justo antes de la zona donde la mucosa se hace más delgada, y segmento posterior, desde aproximadamente 1 cm por detrás de ese punto, hasta antes de la cloaca (**Figura 3.3**). La porción más distal de cada segmento de intestino era conservada para su posterior análisis bioquímico, mientras que la parte proximal, se empleaba para la medición inmediata de parámetros bioeléctricos y flujos unidireccionales, o para la determinación del contenido de adenosín 3', 5' monofosfato cíclico (AMPc) intracelular.

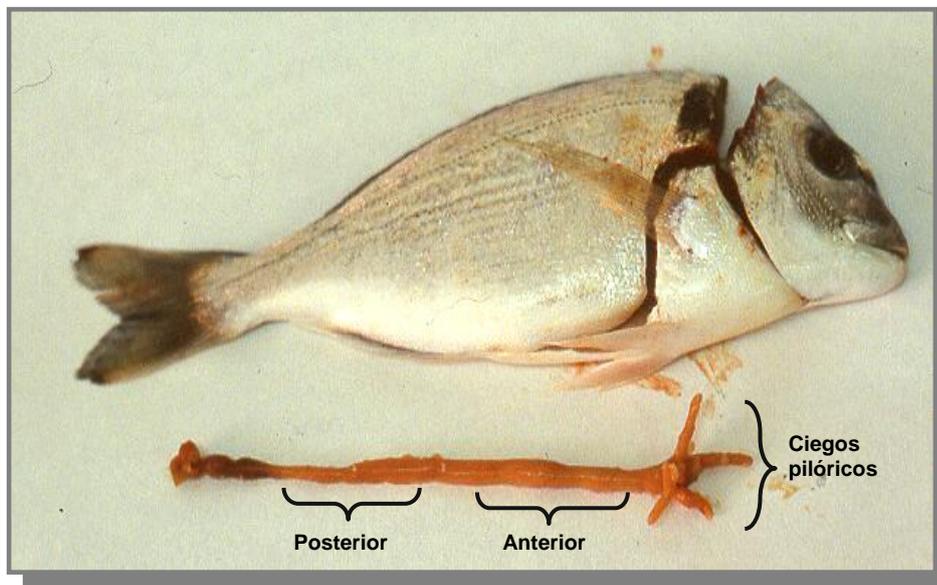


Figura 3.3. División en segmentos del tracto intestinal de la dorada.

Paralelamente a este proceso se extraía, para su análisis bioquímico, el hígado, que era pesado y perfundido con la solución Ringer de trabajo a través de la vena hepática o cualquier otro canal que nos permitiera eliminar restos de sangre (**Figura 3.4**), una sección de músculo, libre de piel y de grasa subcutánea, que se obtenía de la parte dorsal anterior del individuo, justo por encima de la línea lateral, y finalmente, el cerebro.



Figura 3.4. Perfusión del hígado.

Todas las muestras recogidas para los estudios de composición bioquímica, eran almacenadas en viales de plástico convenientemente etiquetados y congeladas a -80 °C hasta el momento de su análisis.

3.5. Incubación del tracto intestinal

Para la realización de los experimentos de medición de parámetros eléctricos y flujos unidireccionales en el intestino de dorada, se montaron los tejidos en una cámara de Ussing modificada (Ilundain y Naftalin, 1982). Las cámaras de Ussing, o modificaciones de las mismas, proporcionan un sistema fisiológico ideal para efectuar mediciones *in vitro*, a través de tejidos intactos o de monocapas celulares de tejidos, tanto del transporte de iones, nutrientes, agua u otras sustancias químicas de interés farmacológico, como de los parámetros electrofisiológicos generados por los movimientos electrogénicos transepiteliales. Entre los epitelios estudiados con este sistema se encuentran la vesícula biliar, vejiga urinaria, piel, tráquea, estómago e intestino. Las investigaciones centradas en el epitelio gastrointestinal se han desarrollado en todos los grupos de vertebrados; peces (Lorenzo y col., 1987b; Trischitta y col., 1996, 2007; Jutfelt y col., 2007; Whittamore, 2008; Grosell y col., 2009), mamíferos (Clarke, 2009; Kongsuphol y col., 2009; Herrmann y col., 2010; Wilkens y col., 2011), aves (García-Amado y col., 2005; Rehman y col., 2006; Awad y col., 2009), reptiles (Lorenzo y col., 1987a; Díaz y Lorenzo, 1992; Díaz y col., 1994) y anfibios (Machen y McLennan, 1980; McGreevy y col., 1986; Gerbino y col., 2010). Las cámaras de Ussing están fabricadas con metacrilato de metilo lo que le confiere alta transparencia, gran resistencia a los impactos y dureza. El sistema empleado en la presente investigación consta de dos semicámaras con cuatro pocillos, cada pocillo presenta dos orificios, uno en la parte superior y otro en el lateral, de tal forma que al unir las dos semicámaras, los pocillos quedan conectados dos a dos lateralmente. Los epitelios son estructuras polares que poseen un lado apical o mucosal, y un lado basolateral o serosal, la utilización de cámaras de este tipo, permite estudiar diferentes tejidos epiteliales de tal manera que, cada lado del tejido queda aislado y en contacto con una semicámara independiente (**Figura 3.5**).



Figura 3.5. Izda. Visión general de sistema empleado en la determinación de parámetros bioeléctricos y flujos unidireccionales y netos a través del epitelio intestinal. **Dcha.** Montaje de tejidos en cámara de Ussing.

Después de ser limpiado con la solución Ringer de trabajo, el intestino era abierto longitudinalmente en segmentos de 15-20 mm aproximadamente y fijado intacto entre las dos semicámaras, sujeto en una serie de agujas metálicas dispuestas alrededor del orificio lateral de comunicación. Se hacía descansar el segmento sobre anillos de neopreno que poseían los orificios laterales, con el objetivo de reducir el daño sobre el tejido al cerrar la cámara y permitir, al mismo tiempo, el sellado hermético de la misma. La superficie de exposición del tejido fue de $0,21 \text{ cm}^2$. Una vez cerrada la cámara, se llenaban los pocillos con 4 ml de la solución de trabajo, de tal manera que ambos lados del tejido quedaban sometidos a la misma presión osmótica e hidrostática. Las soluciones eran gasificadas y agitadas continuamente con una mezcla de O_2/CO_2 (95%/5%), y mantenidas a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, similar temperatura a la de cultivo del pez, mediante la circulación permanente de agua termostatada por un sistema de conductos que atraviesan interiormente la cámara.

En cada ensayo se trabajó con dos segmentos de intestino anterior y dos segmentos de intestino posterior de un mismo pez, necesitándose menos de 10 min para montar todos los tejidos en la cámara tras la muerte del animal.

3.5.1. Determinación de parámetros eléctricos

Las medidas de la diferencia de potencial eléctrica (DP), intensidad de corriente de cortocircuito (I_{cc}) y conductancia tisular (Gt), a través de los segmentos intestinales, fueron determinados por medio de una pinza de voltaje automática AC-Microclamp (AC-Copy, D5100 versión 82.2, Aachen, Alemania). Este sistema era controlado por un microprocesador AIM 65 a través de un total de 4 interfases conectadas a dos parejas de electrodos por cámara. Para proceder a estas mediciones eléctricas, se instalaron los tejidos en la cámara de Ussing en presencia de la solución Ringer de trabajo, y se conectaron los pocillos a cada lado del tejido a través de dos pares de puentes salinos de agar al 4% (p/v) y KCl 3 M, colocados cerca de la superficie del tejido. Los puentes eran conectados a dos parejas de electrodos, una de ellas de calomelano para medir la diferencia de potencial transmural, y la otra de Ag/AgCl en KCl, para medir la intensidad de corriente de cortocircuito (**Figura 3.6**). El electrodo de referencia fue siempre conectado al lado mucosal, registrándose la DP transmural en el lado serosal.

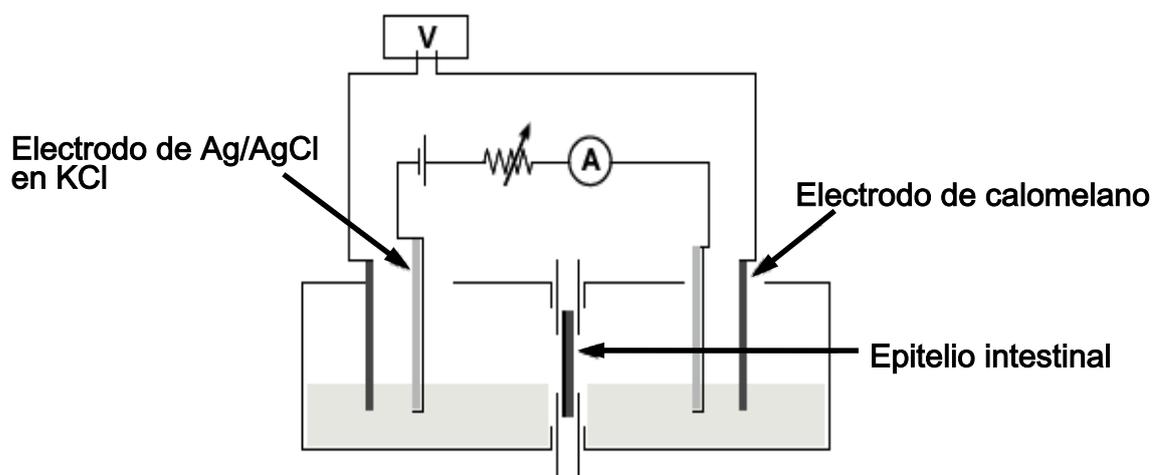


Figura 3.6. Disposición de las parejas de electrodos para medidas de parámetros eléctricos en la cámara de Ussing.

Antes de colocar los segmentos de intestino en la cámara, se rellenaban los pocillos con 4 ml de solución idéntica a la que se iba a utilizar en el experimento, con el objetivo de medir la diferencia de potencial entre los electrodos y la resistencia de la solución de incubación al paso de la corriente. Estos valores fueron corregidos de los resultados obtenidos una vez montados los tejidos. Los segmentos de epitelio intestinal fueron incubados inicialmente en condiciones de circuito abierto. Una vez estabilizada la DP, aproximadamente 20 min después de que el tejido fuera montado en la cámara, se cortocircuitaba el sistema mediante la introducción de corriente, para determinar los valores de la corriente de cortocircuito. Momentáneamente y a intervalos regulares, se interrumpía la corriente y se medía la DP transmural. Adicionalmente, se añadía cada 5 s, un pulso de corriente de 8 μA de amplitud y 1 s de duración. Tras un retraso de 0,5 s, se medía el desplazamiento generado por este pulso desde el cero de la DP, calculándose a partir de éstos datos la Gt en mS/cm^2 .

3.5.2. Medición de flujos unidireccionales

La determinación de los flujos unidireccionales de cloruro, sodio y glucosa fueron realizadas en condiciones de cortocircuito. Tras el periodo de 20 min necesario para que se estabilizara el tejido, se añadió Na^{22} , Cl^{36} o 3-O-[^{14}C] metil D-glucosa (Amersham Ibérica S.A., Madrid) a la solución Ringer en un sólo lado de cada segmento de intestino, para dar una concentración en el pocillo de incubación de 1 mmol/l en el caso de los electrolitos y de 20 $\mu\text{mol}/\text{l}$ para la glucosa. Cuando se quería determinar el flujo existente en dirección mucosa-serosa (J_m -s), se añadía la sustancia marcada radiactivamente a la solución que bañaba el lado mucosal del tejido, mientras que cuando se quería conocer el flujo de serosa a mucosa (J_s -m), se adicionaba el isótopo radiactivo en el lado serosal. Transcurridos 30 min de incubación en presencia del radiactivo, se estabilizaban los flujos del isótopo (T_0), y se recogían muestras de 200 μl de los reservorios marcados, que se tomaban como patrones, y de los reservorios no marcados, extrayéndose de éstos últimos, otras tres muestras adicionales cada 10 min. Cuando se quería observar el efecto de sustancias como teofilina, forskolina o floricina (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid) sobre los flujos unidireccionales, una vez tomadas las muestras en condiciones control según el protocolo descrito anteriormente, se añadía 50 μl de una solución concentrada

conteniendo la sustancia a la solución Ringer de incubación, de manera que se obtuviera la concentración deseada en el pocillo (3 mM, 10^{-5} M y 1 mM, respectivamente). Tras un periodo de estabilización de 20 min, se repetía el proceso de toma de muestras a intervalos de 10 min.

Las alícuotas eran introducidas en viales de polietileno de 6 ml (EG&G Instruments, Madrid) donde eran pesadas, este peso era tomado como factor de corrección de la radiactividad de cada una. Finalmente, se llenaba cada vial con 4 ml de líquido de centelleo biodegradable para muestras líquidas (Scintron, BDH Chemical Ltd., Poole, Inglaterra) y se procedía a su conteo en un contador de emisiones β (LKB-1209, Rackbeta, Rockville, MD, EEUU). Todas las muestras fueron recogidas por duplicado para promediar los valores obtenidos, reemplazando inmediatamente los volúmenes extraídos por idéntica cantidad de solución de trabajo, con el objetivo de mantener constante el volumen en el pocillo.

En cada experimento, se tomó dos alícuotas de la solución de incubación no marcada radiactivamente, los valores obtenidos de su conteo fueron tomados como factor de corrección y sustraídos de la radiactividad contenida en las muestras problema.

Los flujos unidireccionales fueron calculados a partir de las ecuaciones estándar de Schultz y Zalusky (1964a):

$$J_{m-s} \text{ (eq/cm}^2 \cdot \text{h)} = V_t \cdot [(cpm_2/V_{m_2}) - (cpm_1/V_{m_1}) \cdot F_c] / (A_e \cdot \Delta t \cdot S)$$

donde V_t , es el volumen total del compartimento; cpm, el número de cuentas por minuto (muestras 1 y 2); V_m , el volumen de las muestras (1 y 2); F_c , el factor de corrección para la solución de trabajo; A_e , la actividad específica del isótopo; Δt , el intervalo de tiempo entre muestras y, S , la superficie de transporte.

El flujo neto (J_{net}) fue calculado como la diferencia de los flujos unidireccionales:

$$J_{net} = J_{m-s} - J_{s-m}$$

El cálculo de los flujos unidireccionales y netos fue automatizado, utilizando un programa escrito en GW-BASIC (Díaz y Cozzi, 1991).

3.6. Análisis bioquímicos

En este apartado, se describe la metodología empleada en el análisis de la composición bioquímica de las dietas experimentales, órganos del pez y hematocrito, en las cuantificaciones de los niveles de AMPc intracelular en los dos segmentos de intestino, así como en la determinación de la composición del plasma sanguíneo.

3.6.1. Humedad

Los niveles de humedad fueron calculados a partir de muestras de entre 0,5 y 1,5 g de peso inicial (P_i), que eran desecadas en estufa a 110 °C, inicialmente durante 14 h, y posteriormente a intervalos de 2 h, hasta que dos pesadas consecutivas fueran constantes (P_f) (A.O.A.C., 1990). Previamente a ser pesadas, las muestras eran atemperadas en un desecador al vacío con silicagel durante media hora. El contenido de humedad (% H) de la muestra se determinó mediante la ecuación:

$$\% H = [(P_i - P_f) / P_i] \cdot 100$$

3.6.2. Cenizas

Este análisis se aplicó exclusivamente a las dietas experimentales. Para ello, se incineraba la muestra mediante su introducción en un horno mufla a 600 °C, hasta que alcanzara un peso constante entre dos pesadas consecutivas (A.O.A.C., 1990). De igual manera que para la determinación de humedad, las muestras eran llevadas a temperatura ambiente antes de ser pesadas.

3.6.3. Proteína total

La determinación del contenido de proteínas de las dietas experimentales se llevó

a cabo por el método Kjeldahl (A.O.A.C., 1990), utilizando una unidad destiladora (Kjeltec System 1003, Tecator, Höganäs, Suecia). Una vez homogeneizada la muestra, era digerida mediante calentamiento a 400 °C con 5 ml de ácido sulfúrico concentrado en presencia de un catalizador de mercurio. Tras un periodo de enfriamiento, se le añadió 20 ml de agua desionizada y 5 ml de Na₂SO₃, y se procedió a su destilación con NaOH al 40%, actuando el ácido bórico como sustancia receptora. Finalmente, se valoró la muestra con HCl 0,2 N. El proceso fue repetido sin muestra para obtener la valoración del patrón.

El contenido proteico en la muestra se determinó mediante la ecuación:

$$\% \text{ Proteína} = [(V_m - V_b) / P] \cdot 0,2 \cdot 14,007 \cdot 6,25 \cdot 100$$

donde V_m, es la valoración de la muestra (ml); V_b, es la valoración media del blanco (ml) y P, es el peso de la muestra (mg).

3.6.4. Lípido total

La extracción del lípido de las muestras se realizó según una modificación del método de Folch y col. (1957) descrita por Christie en 1982. Aproximadamente 1 g de muestra en peso fresco era homogeneizada en 10 ml de una mezcla de cloroformo:metanol (2:1, v/v), añadiéndose una vez extraído el lípido, 2,5 ml de dicloruro magnésico (0,88% p/v) para aumentar la polaridad de la fase acuosa. La mezcla se agitaba vigorosamente, seguidamente se centrifugaba a 2000 rpm durante 2 min y se recuperaba la fase orgánica, evaporándose el solvente bajo atmósfera de nitrógeno. El extracto lipídico era cuantificado gravimétricamente, redissuelto en cloroformo:metanol (2:1) a una concentración de 10 mg lípido/ml solvente y guardado en atmósfera de nitrógeno a -20 °C hasta el momento de continuar con su análisis. Si el extracto lipídico iba a ser posteriormente transmetilado para obtener su composición en ácidos grasos, se añadía al solvente 0,05% de hidroxitolueno butilado (BHT, "butylated hydroxy toluene"), mientras que si iba a ser utilizado para la determinación de su composición en clases lipídicas por densitometría, se

almacenaba sin el antioxidante.

A lo largo de esta memoria, la cantidad de lípido total presente en una muestra se expresa en porcentaje de su peso seco. El valor del porcentaje de lípido en peso seco (% Lps) se calculó a partir de los datos de lípido en peso fresco (% Lpf) y del peso seco de la muestra (100 - % H).

$$\% \text{ Lpf} = (\text{PI} / \text{P}) \cdot 100$$

donde PI, es el peso del lípido de la muestra (mg) y P, es el peso de la muestra (mg).

$$\% \text{ Lps} = (\% \text{ Lpf} \cdot 100) / (100 - \% \text{ H})$$

3.6.5. Clases lipídicas

Separación y cuantificación

Las clases lipídicas de los lípidos totales fueron separadas por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC, “high performance thin layer chromatography”) unidireccional, empleando placas de vidrio de 10 x 10 cm recubiertas de silicagel (0,2 mm de grosor) y sin indicador de fluorescencia (Merck, Darmstadt, Alemania). Las placas, previamente desarrolladas con 15 ml de éter dietílico para eliminar impurezas, y activadas a 110 °C durante 30 min, eran cargadas con 5 alícuotas de lípido de 25 µg, una de las cuales era un estándar de composición conocida que serviría de referencia.

Una vez depositadas las muestras en la placa, se introducía en una cubeta donde se les aplicaba un doble desarrollo (Olsen y Henderson, 1989). Primeramente, se separaban los lípidos polares mediante una mezcla de acetato de metilo:isopropanol:cloroformo:metanol:0,25% (p/v) KCl (25:25:25:10:9, en volumen).

Una vez el solvente había alcanzado la mitad de la altura de la placa, se sacaba ésta de la cubeta y se dejaba secar en presencia de silicagel durante 30 min en un desecador al que se hacía vacío. En segundo lugar, se desarrollaban los lípidos neutros con una mezcla de hexano:éter dietílico:ácido acético glacial (80:20:2, en volumen) dejando que el solvente llegara hasta aproximadamente 0,5 cm del borde superior de la placa, secando a continuación la placa de la misma forma citada anteriormente. Para la detección de las clases lipídicas separadas, se teñía la placa pulverizándola ligeramente con una solución de acetato cúprico al 3% y ácido ortofosfórico al 8% y se introducía inmediatamente en una estufa a 160 °C durante unos 15 min hasta obtener claramente oscurecidas las diferentes bandas correspondientes a las clases lipídicas de la muestra (**Figura 3.7**). La cuantificación de las clases lipídicas se determinaba midiendo la absorbancia de las bandas a una longitud de onda de 370 nm mediante la introducción de la placa en un densitómetro (Shimadzu CS-9000, Kyoto, Japón).

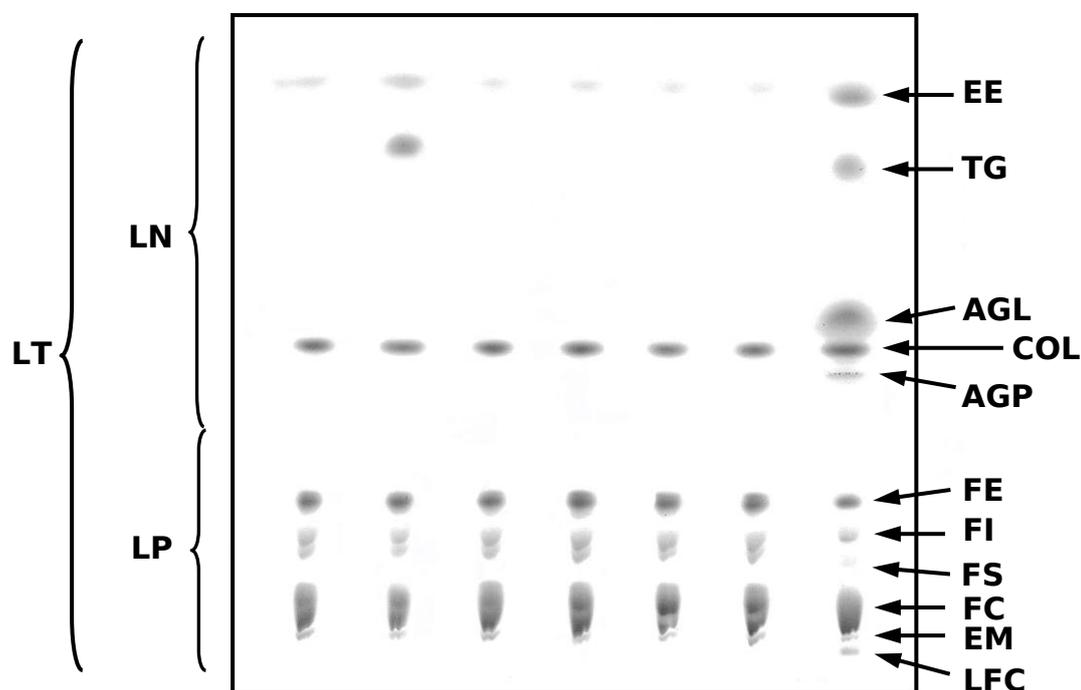


Figura 3.7. Desarrollo de clases lipídicas en la placa de HPTLC. LT, lípido total; LN, lípidos neutros; LP, lípidos polares; EE, ésteres de esteroles; TG, triglicéridos; AGL, ácidos grasos libres; COL, colesterol; AGP, acilglicérolos parciales; FE, fosfatidiletanolamina; FI, fosfatidilinositol; FS, fosfatidilserina; FC, fosfatidilcolina; EM, esfingomielinina; LFC, lisofosfatidilcolina.

Extracción

Para determinar la composición en ácidos grasos de las diferentes clases lipídicas, se procedía a su aislamiento y recogida por cromatografía en capa fina (TLC, "thin layer chromatography"), empleando placas de vidrio de 20 x 20 cm recubiertas de silicagel (0,25 mm de grosor) sin indicador de fluorescencia (Merck, Darmstadt, Alemania). Se cargaba la placa con 2 muestras de lípido de 5 mg, mas un estándar de huevas de bacalao de composición conocida (250 µg), y se le aplicaba un doble desarrollo, excepto para el hígado, en que se utilizó un único desarrollo para separar lípidos neutros, utilizando los mismos disolventes citados en el apartado anterior. Una vez separadas las clases lipídicas, se procedía a la tinción sutil de la placa con 2'-7' diclorofluorisceína (1 g/l en metanol 98% v/v) conteniendo 0,05% (p/v)

de BHT como antioxidante, y a su visualización en una cámara con luz UV. Una vez identificadas las bandas, se rascaban separadamente de la placa con un bisturí de punta recta y se introducían en tubos de ensayo esmerilados, para proceder posteriormente a su transformación en ésteres metílicos de ácidos grasos.

Entre los fosfolípidos, las clases lipídicas recogidas fueron, fosfatidilcolina (FC), fosfatidilserina (FS), fosfatidilinositol (FI) y fosfatidiletanolamina (FE), mientras que entre los lípidos neutros se recuperaron exclusivamente los triglicéridos (TG). En el hígado sólo se recogieron el total de lípidos polares (TLP) y los TG.

3.6.6. Ésteres metílicos de ácidos grasos

Para analizar la composición en ácidos grasos de los extractos lipídicos por cromatografía de gases, se prepararon previamente los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES, "fatty acid methyl esters") que los componían, mediante transesterificación por catálisis ácida de 1-2 mg de lípido total, usando como catalizador ácido sulfúrico al 1% (v/v) en metanol. Para favorecer la disolución de los lípidos neutros, se añadía tolueno al extracto previamente a la adición de la solución de sulfúrico en metanol. La reacción se llevó a cabo a 50 °C durante 16 horas y en atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación de los mismos. Los ésteres metílicos de ácidos grasos obtenidos fueron purificados mediante desarrollo simple por TLC con una mezcla de hexano/ éter dietílico/ ácido acético glacial (85:15:1, en volumen) y visualizados bajo luz ultravioleta (365 nm) tras realizar una tinción con 2', 7', -diclorofluoresceína al 0,1% en metanol del 97% (p/v), conteniendo 0,01% de BHT (Christie, 1982). Previamente a la transesterificación, se añadió a las muestras un 5% del ácido graso eicosanoico (21:0) como estándar interno.

Los FAMES ya purificados y raspados de la placa, fueron extraídos de la sílice con una mezcla de hexano/ éter dietílico (1:1), evaporando posteriormente el solvente y redisolviéndolos en hexano a una concentración de 1 mg/ml. Los FAMES así obtenidos fueron separados y cuantificados mediante inyección "en columna" en un cromatógrafo de gases provisto de detector de ionización de llama, según las siguientes condiciones operativas:

- √ Cromatógrafo: Packard 436 (Chrompak Uk Ltd., Londres, Inglaterra)
- √ Columna: capilar de sílice fundida Supelcowax™ 10 (25 m x 0,32 mm I.D.) (Supelco Inc., Bellefonte, EEUU) con fase estacionaria polar de ácidos grasos libres
- √ Gas portador: Helio
- √ Presión de los gases: Helio, 1 kg/cm²; hidrógeno, 0,55 kg/cm²; aire, 0,55 kg/cm²
- √ Temperatura: Inyector 50 °C; Detector 250 °C; Columna, según rampa con las siguientes características: temperatura inicial 50 °C, tasa de incremento de temperatura de 39 °C/min hasta alcanzar 150 °C, seguida de tasa de incremento de 3 °C/min hasta alcanzar una temperatura final de 230 °C que era mantenida durante 10 minutos.

La identificación de cada ácido graso se llevó a cabo mediante la utilización, como patrón, de un aceite de pescado bien caracterizado. Una vez identificados, se expresó su cuantificación en porcentaje del total de ácidos grasos según se obtenía del cromatograma. Complementariamente, se cuantificó en valor absoluto el total de los ácidos grasos del LT de los distintos órganos y hematocrito, expresándolo en µg de ácido graso por mg de muestra en peso seco, utilizando para ello el estándar interno añadido a la muestra antes de la transmetilación:

$$\text{AG } (\mu\text{g ácido graso/mg muestra en peso seco}) = (\text{aAG} \cdot \text{Lps} \cdot \text{St}_i) / (\text{aSt}_i \cdot 100)$$

donde aAG, es el área absoluta de cada ácido graso; Lps, representa el porcentaje de lípido en peso seco; St_i, son los µg de estándar interno por mg de lípido añadidos a la muestra y aSt_i, es el área absoluta del estándar interno.

Calidad nutricional del pescado

El valor nutricional del filete de los peces cultivados desde el punto de vista de la salud humana, se evaluó utilizando una serie de índices que determinan la calidad del lípido presente en el músculo, a través del análisis de su perfil de ácidos grasos

(Valfré y col., 2003; Senso y col., 2007). Así, el índice de calidad de los lípidos del filete del pescado (ICP), refleja la relación porcentual entre la suma de los dos principales (n-3) HUFA (EPA y DHA), con respecto al total de los lípidos presentes en el músculo. El Índice de Aterogenicidad (IA_t), que indica el potencial de obstrucción de las arterias, y el de Trombogenicidad (IT), que muestra la tendencia a la aparición de trombos en los vasos sanguíneos, también fueron tenidos en cuenta y se calcularon a partir de la relación entre los principales ácidos grasos saturados y los monoinsaturados y poliinsaturados, según las siguientes expresiones:

$$IA_t = \frac{[12:0 + (4 \cdot 14:0) + 16:0]}{\sum MUFA + \sum(n-6) PUFA + \sum(n-3) PUFA}$$

$$IT = \frac{(14:0 + 16:0 + 18:0)}{(0,5 \cdot \sum MUFA) + (0,5 \cdot \sum(n-6) PUFA) + (3 \cdot \sum(n-3) PUFA) + (\sum(n-3) PUFA / \sum(n-6) PUFA)}$$

3.6.7. AMPc intracelular

Este estudio se llevó a cabo mediante un ensayo (TRK 432, Amersham Ibérica S.A., Madrid), basado en la competitividad que se establece entre el AMPc no marcado radiactivamente y una cantidad fija del compuesto tritiado por unirse a una proteína que tiene una alta especificidad y afinidad por el AMPc. La cantidad formada del compuesto proteína-³H(AMPc), es inversamente proporcional a la cantidad de AMPc no marcado, de tal forma que, midiendo la radiactividad ligada a la proteína, podemos determinar la cantidad de AMPc no marcado presente en la muestra estudiada.

Una vez extraídos y limpios los segmentos de intestino, se pesaban y se introducían en tubos de vidrio con 0,5 ml/100 mg tejido, de una solución Tris/HCl 50

mM conteniendo 4 mM de EDTA a pH 7,5, para ser homogeneizados hasta que el tejido quedara completamente disgregado. Tras esta primera fase, se trasvasaba el contenido a tubos de centrifuga, donde se desproteinizaba completamente el tejido manteniéndolo al baño María en aceite a 110 °C durante 3 min aproximadamente (hasta que la proteína apareciera coagulada). Seguidamente, se centrifugaban los tubos a 5000 x g durante 10 min y se tomaba 50 µl del sobrenadante que eran almacenados en Eppendorf a -80 °C, hasta el momento de ser añadidos a tubos de ensayo que contenían una cantidad conocida de AMPc marcado y proteína ligando. Se mezclaba el contenido y se mantenía entre 2 y 8 °C durante 2 h, periodo tras el cual, se añadía una cantidad de carbón absorbente al tubo de ensayo para que captase el AMPc tritiado no unido a la proteína ligando y se centrifugaba lentamente para sedimentar el carbón. Tras la centrifugación, dos alícuotas de 200 µl del sobrenadante eran transferidas a sendos viales plásticos, procediéndose a su contaje radiactivo de igual manera que en el apartado 3.5.2. La cantidad de AMPc (pmol) presente en las muestras problema se obtuvo mediante una curva de calibrado preparada a partir de estándares de concentraciones variables conocidas de AMPc no marcado.

Cuando se quería comprobar el efecto de sustancias como teofilina o forskolina sobre los niveles de AMPc intracelular, se incubaba el tejido durante 2 min con una solución 3 mM o 10^{-5} M de cada producto respectivamente, antes de ser homogeneizado, siguiendo el resto del proceso la misma pauta descrita anteriormente.

3.6.8. Determinaciones plasmáticas

Las muestras de plasma fueron analizadas bioquímicamente en la sección de bioquímica del laboratorio central del Hospital Universitario de Canarias (La Laguna), mediante un autoanalizador Hitachi 717 (Tokio, Japón) que permite determinar, utilizando una serie de kits comerciales (Boehringer Mannheim S.A., Mannheim, Alemania), su contenido de colesterol total, triglicéridos, proteínas totales, calcio, fósforo, sodio, potasio y cloruro.

3.7. Análisis estadístico

En la presente memoria, los datos son expresados como media de un número variable de muestras (n) con su desviación estándar (DE), excepto para los estudios de parámetros bioeléctricos y de flujos a través del tracto intestinal que son presentados como media acompañada de su respectivo error estándar de la media (EEM). El EEM de los flujos netos se obtuvo ponderando las cuasivarianzas muestrales de ambos flujos unidireccionales:

$$\text{EEM} = (\text{EEMm-s} + \text{EEMs-m}) / (n1 + n2)^{1/2}$$

Para determinar la bondad del ajuste de los datos numéricos a una distribución normal, se utilizó el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov para cada muestra. Como los valores expresados en porcentaje de área no se ajustan a una distribución normal, fueron transformados en el arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje dividido por cien, previamente a su análisis estadístico (Sokal y Rohlf, 1981).

Las comparaciones entre pares de valores se llevaron a cabo aplicando el test *t*-Student para muestras independientes, comprobando la homogeneidad de las varianzas (homocedasticidad) mediante el test de Levene (Zar, 1984). Para comparar una media poblacional con un valor cero, se aplicó el test *t*-Student para una sola muestra ($P < 0,05$). Las diferencias entre más de dos valores se estudiaron empleando un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples. En aquellos casos en los que las varianzas no eran homogéneas, se analizaron los datos mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Las diferencias entre medias fueron consideradas significativas a tres niveles diferentes $P < 0,05$, $P < 0,01$ y $P < 0,001$.

El análisis estadístico se desarrolló utilizando el paquete estadístico SPSS versión 12.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EEUU).

4. RESULTADOS

La exposición de los resultados de la presente memoria ha sido estructurada en cinco bloques principales, según lo establecido en el apartado de Objetivos (pág. 23).

Antes de analizar en profundidad los efectos registrados al final del periodo de alimentación en los juveniles de dorada a los que se había suministrado la dieta control (DC) o la dieta deficiente en HUFA (DD), se caracteriza el perfil lipídico de los piensos empleados en la experimentación, y de los juveniles antes del comienzo de la experiencia, considerada como muestra inicial.

Composición bioquímica de las dietas experimentales

Las dietas manufacturadas sin harina o aceite de pescado pueden resultar inicialmente menos aceptadas por los peces (Grisdale-Helland y col., 2002; Geurden y col., 2005, 2007), posiblemente debido a variaciones en su palatabilidad. Por ello, durante el mes previo al comienzo de la experiencia, todos los ejemplares fueron alimentados con la dieta experimental carente de aceite de pescado (DD), como periodo de adaptación a las nuevas características de textura, sabor y aroma del alimento. El cambio de la dieta comercial a la experimental produjo una disminución de la ingesta durante las 2 primeras semanas, pasándose de suministrar alrededor de un 60% del alimento preparado (2% de la biomasa de cada tanque/día) a aproximadamente la mitad. A partir de este momento, la cantidad de alimento ingerido retornó gradualmente a porcentajes similares al inicial.

Como se refleja en la **Tabla 3.1**, ambas dietas experimentales presentaron la misma composición proximal, la proteína mostró valores ligeramente superiores al 50%, el lípido se aproximó al 15%, la ceniza osciló entre un 9,3 y un 9,9% y la humedad entre un 10,4 y un 12,2%. En cuanto a la composición lipídica, el total de lípidos neutros superó en ambos piensos el 85%, siendo los TG, con más del 63%, la clase lipídica más representativa. Entre los lípidos polares, la FC fue la fracción principal, aunque no llegó al 9% del total lipídico en ninguno de los piensos experimentales. Únicamente el porcentaje de ésteres de esteroles (EE) varió significativamente entre tratamientos, acercándose al 13% en la dieta carente de aceite de pescado o dieta deficiente en HUFA (DD), frente a poco más del 7% de la dieta formulada con aceite de pescado, o dieta control (DC) (**Tabla 3.2**). Según lo

esperado, el perfil de ácidos grasos de ambos piensos experimentales difirió sustancialmente (**Tabla 3.3**). Los (n-3) HUFA representaron el 0,6% de los ácidos grasos de la DD, mientras que en los de la DC se elevó hasta el 16,2%, estando representados mayoritariamente por un 8,9% de ácido eicosapentanoico (20:5(n-3), EPA) y un 5,5% de ácido docosahexanoico (22:6(n-3), DHA). El resto de integrantes de los (n-3) HUFA, como el ácido docosapentanoico (22:5(n-3), DPA), el docosatetranoico (20:4(n-3)) o el 21:5(n-3), fueron detectados únicamente en la DC. En cuanto al ácido araquidónico (20:4(n-6), ARA), tampoco fue detectado en la dieta carente de AP, mostrando una proporción del 0,8% dentro de los ácidos grasos de la DC. Así, en la dieta que contenía la mezcla de aceite de origen animal y vegetal, los ácidos grasos esenciales (AGE) fueron sustituidos básicamente por los ácidos grasos oleico (18:1(n-9), OA), linoleico (18:2(n-6), LA) y linolénico (18:3(n-3), LNA), este último adicionado al pienso DD en forma pura en una proporción del 1%. A excepción de los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), todos los grupos de ácidos grasos variaron significativamente entre tratamientos. La DD presentó valores más bajos de saturados y (n-3) PUFA y más altos de (n-6) PUFA que la DC, y como consecuencia de ello, la relación (n-3)/(n-6) fue menor en la DD (0,3), que en la DC (7,5).

Comparación de los órganos al inicio del periodo experimental

Antes del comienzo de la alimentación con las dos dietas experimentales, y una vez todos los juveniles de dorada hubieron recibido exclusivamente la dieta deficiente en HUFA durante un mes, se sacrificaron 6 ejemplares (uno por tanque) y se recogieron muestras de músculo, hígado, cerebro e intestino anterior y posterior. Estas muestras, consideradas como muestra inicial, fueron analizadas bioquímicamente para determinar su composición lipídica.

La **Tabla 4.1** refleja el contenido lipídico y la composición en clases lipídicas de los órganos de la muestra inicial. El análisis comparado de estos datos indica que el músculo mostró la menor proporción de lípido total (LT) con un 14,31% de su peso seco, seguido del intestino posterior con el 21,66%, y de hígado, intestino anterior y cerebro donde representó entre el 32,21 y el 36,45%. Entre un 27 y un 36% de los lípidos fueron polares, salvo en el cerebro, donde su porcentaje fue notablemente más elevado, superando el 65%. El total de lípidos neutros (TLN) mostró, obviamente, la

tendencia contraria. La principal clase lipídica dentro de la fracción polar de músculo, hígado y ambos segmentos de intestino, fue, con diferencia, la FC, que supuso más de la mitad del TLP en todos ellos, mientras que los TG fueron los más abundantes en la fracción lipídica neutra, representando más del 85% del total en el músculo, y entre el 71 y el 75% en hígado y ambos segmentos intestinales. En el cerebro, también fue la FC la principal clase lipídica polar (37,8%), seguida por la FE (30,9%), mientras que cerca de la mitad de la fracción lipídica neutra fue colesterol, y casi un 30% TG.

Como era de esperar, las diferencias en la composición de ácidos grasos de los distintos órganos de la muestra inicial fueron evidentes (**Tabla 4.2**). Así por ejemplo, la presencia de MUFA en el músculo fue notoria, llegando hasta el 40,5% del total de los ácidos grasos, siendo su representante más destacado el 18:1(n-9), que aportó más de la mitad al total del grupo. Monoinsaturados de 16, 20 y 22C, alcanzaron las proporciones más altas de todos los órganos analizados. Asimismo, el músculo mostró el mayor porcentaje de LNA (1,0%), EPA (4,9%) y DPA (1,8%) y el segundo más alto, conjuntamente con el intestino posterior, de DHA (11,6%), y por tanto, una alta proporción de (n-3) HUFA y (n-3) total, sólo superadas en el cerebro. Por el contrario, presentó el segundo nivel más bajo de 18:2(n-6) y de (n-6) total (7,9%), lo que, unido a lo ocurrido con los (n-3), dio lugar a una relación (n-3)/(n-6) elevada, por debajo únicamente de la del cerebro.

El hígado se caracterizó por presentar elevados porcentajes de 18:1(n-9) y 18:2(n-6) (30,8 y 21,2% del total de ácidos grasos, respectivamente) y baja presencia de los dos (n-3) HUFA principales, 1,5% de 20:5(n-3) y 4,8% de 22:6(n-3). Este perfil individual dio lugar a que el hígado presentase el valor más alto de MUFA (41%) junto con el del músculo, y el segundo más alto de la serie (n-6) (22,7%). Por el contrario, tanto el total de ácidos grasos (n-3), como la relación (n-3)/(n-6) sólo superaron los valores registrados en el intestino anterior. Hay que destacar la aparición en el hígado de productos de elongación y/o desaturación del 18:1(n-9), como el 18:2(n-9), 20:2(n-9) y 20:3(n-9), o del 18:2(n-6) como el 20:2(n-6) y 20:3(n-6), así como de un 1,4% de 19:0, único órgano de los analizados donde se detectó este ácido graso por encima de valores traza (<0,05% en nuestro trabajo).

El cerebro presentó las proporciones más bajas de 18:1(n-9) (18,7%) y 18:2(n-6) (2,4%), y por ello, del total de monoinsaturados y de la serie (n-6), a pesar de tener el valor más alto de 20:4(n-6) de todos los órganos estudiados, con un 1,6%. Contrariamente, mostró la cantidad más importante de (n-3) HUFA, que constituyó el 31,2% del total de los ácidos grasos, con un contenido moderado del 3,8% de EPA frente al 26,0% de DHA, porcentaje éste último, más de dos veces superior al detectado en el músculo o en el intestino posterior. Estos valores del total de (n-3) y de (n-6), dieron lugar a que la proporción (n-3)/(n-6) fuera la más alta de todos los órganos analizados, llegando hasta 7,9. Cabe destacar la presencia en el cerebro de dimetilacetales (DMA) y de ácidos grasos de 24 átomos de C como el 24:0 y el 24:1, que no fueron detectados en el resto de muestras analizadas. También estuvieron presentes en el cerebro, productos derivados del OA, como el 18:2(n-9) o el 20:2(n-9), pero ninguno procedente del LA.

Por último, se registraron enormes diferencias en el perfil de ácidos grasos de ambos segmentos de intestino. Únicamente mostraron niveles similares entre sí respecto al total de MUFA (35,9 frente a 32,5% en intestino anterior y posterior, respectivamente), ya que, aunque el 18:1(n-9) fue más abundante en el intestino anterior (31,0% frente a 19,9%), el resto de monoinsaturados siguieron la tendencia opuesta. La proporción de 18:2(n-6) (35,6%) y, como consecuencia, de (n-6) total en el intestino anterior fue la mayor de todos los órganos analizados, unas 2,5 veces más alta que en el segmento posterior, que, por el contrario, exhibió el segundo porcentaje más alto de ARA (1,2%), mientras que el más bajo se obtuvo en el segmento anterior (0,3%). Otra diferencia relevante entre los dos segmentos intestinales, es la presencia en el tramo distal de pequeñas cantidades de productos derivados del 18:1(n-9), como el 18:2, 20:2 o 20:3, o del 18:2(n-6), como el 20:2 o 20:3, mientras que en el tramo proximal sólo estuvo presente el 20:3(n-9). En el segmento anterior del intestino se dieron los niveles más bajos de saturados y (n-3) totales. Individualmente, todos los ácidos grasos saturados y (n-3), fueron menos abundantes en el intestino anterior que en el posterior. Los tres (n-3) HUFA principales también mostraron proporciones más reducidas en el intestino anterior (0,8, 0,3 y 2,9%) que en el posterior (3,1, 1,5 y 11,4%) para 20:5(n-3), 22:5(n-3) y 22:6(n-3), respectivamente.

Tabla 4.1. Contenido lipídico y composición en clases lipídicas de órganos de la muestra inicial

	Músculo	Hígado	Cerebro	Intestino	
				anterior	posterior
Lípido total (% peso seco)	14,31	32,21	36,45	34,19	21,66
Clases lipídicas (% lípido total)					
Lisofosfatidilcolina	0,58	0,54	0,61	0,50	0,62
Esfingomielina	0,52	1,08	1,17	0,34	1,20
Fosfatidilcolina	15,68	19,41	24,69	17,93	17,49
Fosfatidilserina	2,21	2,36	7,32	4,36	5,56
Fosfatidilinositol	1,54	2,36	2,22	0,53	0,25
CL/FG	0,40	0,63	nd	nd	nd
Fosfatidiletanolamina	5,56	9,38	20,20	9,26	7,33
No identificados	0,78	0,51	0,00	1,27	1,97
Total lípidos polares	27,27	36,27	65,24	34,19	34,42
Acilgliceroles parciales	nd	1,63	nd	1,42	0,59
Colesterol	6,40	5,16	16,70	8,38	10,13
Ácidos grasos libres	1,71	3,81	1,75	3,43	2,67
Triglicéridos	63,21	45,29	10,19	49,22	48,60
Ésteres de esteroles	1,40	5,19	2,60	2,64	3,58
No identificados	0,00	2,65	0,00	0,72	0,00
Total lípidos neutros	72,73	63,73	34,76	65,81	65,58

Cada valor representa la mezcla de órganos de 6 peces. nd, no detectado; CL, cardiolipín; FG, fosfatidilglicerol.

Tabla 4.2. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) del **lípidio total** de los órganos de la muestra inicial

	Músculo	Hígado	Cerebro	Intestino	
				anterior	posterior
Total ácidos grasos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco)	118,4	274,4	276,1	278,5	169,4
14:0	4,2	2,5	0,8	1,4	3,4
16:0DMA	nd	nd	0,9	nd	nd
16:0	19,2	14,4	15,8	14,0	20,2
16:1(n-9+n-7)	6,6	4,8	4,1	2,0	4,8
17:0	tr	0,5	0,2	0,4	0,5
18:0DMA	nd	nd	5,0	nd	nd
18:1(n-9)DMA	nd	nd	0,9	nd	nd
18:1(n-7)DMA	nd	nd	0,6	nd	nd
18:0	4,1	6,0	9,9	6,3	8,0
18:1(n-9)	22,1	30,8	18,7	31,0	19,9
18:1(n-7)	2,8	2,4	1,6	1,5	2,4
18:2(n-9)	tr	0,8	0,3	nd	tr
18:2(n-6)	7,1	21,2	2,4	35,6	13,6
19:0	tr	1,4	nd	nd	nd
18:3(n-3)	1,0	0,7	0,2	0,6	0,8
18:4(n-3)	1,6	0,5	0,4	tr	0,9
20:1(n-11+n-9)	4,4	1,3	1,0	0,6	2,7
20:2(n-9)	tr	0,5	0,2	nd	tr
20:2(n-6)	nd	0,3	nd	nd	0,3
20:3(n-9)	tr	0,5	nd	0,3	0,5
20:3(n-6)	nd	0,4	nd	nd	tr
20:4(n-6)	0,6	0,4	1,6	0,3	1,2
20:4(n-3)	0,8	0,3	0,2	nd	0,5
20:5(n-3)	4,9	1,5	3,8	0,8	3,1
22:1(n-11+n-9)	4,5	1,0	0,8	0,3	2,7
22:5(n-3)	1,8	0,7	1,2	0,3	1,5
24:0	nd	nd	1,8	nd	nd
24:1	nd	nd	0,8	nd	nd
22:6(n-3)	11,6	4,8	26,0	2,9	11,4
No identificados	1,9	2,1	1,1	1,5	1,4
Total saturados*	28,5	25,6	29,2	22,8	32,8
Total MUFA	40,5	41,0	27,0	35,9	32,5
Total DMA	nd	nd	7,4	nd	nd
Total PUFA**	31,0	33,4	36,3	41,3	34,7
Total (n-6)	7,9	22,7	4,0	36,2	15,5
Total (n-3)	21,8	8,7	31,8	4,7	18,2
(n-3)/(n-6)	2,7	0,4	7,9	0,1	1,2
Total (n-3) HUFA	19,2	7,5	31,2	4,0	16,5

Cada valor representa la mezcla de órganos de 6 peces. nd, no detectado; tr, valor $<0,2\%$; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; DMA, dimetilacetal; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados ($\geq C_{20}$ y ≥ 3 dobles enlaces). * incluye 15:0, 20:0 y 22:0; ** incluye 16:2.

4.1. Parámetros biométricos

La **Tabla 4.1.1** muestra las características biométricas de los juveniles de dorada al inicio y final de la fase experimental, así como diferentes índices de rendimiento mostrados por los peces de ambos grupos.

Los peces aceptaron bien los piensos experimentales, no encontrándose diferencias significativas entre los niveles de ingesta de ambos grupos a lo largo de los 120 días de experimentación. La cantidad media de pienso en peso seco ingerido por cada pez a lo largo del periodo de engorde no varió entre tratamientos, siendo de 219,3 g/pez para los ejemplares que fueron alimentados con la dieta carente de aceite de pescado (DD), y de 227,5 g/pez, para los que ingirieron el pienso formulado con el aceite de origen marino (DC). Las tasas de eficiencia del alimento y de la proteína también se mantuvieron invariables entre los dos grupos experimentales.

El peso final de los ejemplares fue menor en aquellos que fueron alimentados durante las 17 semanas de engorde con la DD, aunque éstas diferencias no se manifestaron en talla. Otros parámetros indicativos del crecimiento, como la ganancia de peso (%) entre el final y el inicio de la fase experimental, o la tasa de crecimiento específico, también se vieron afectados por la composición en ácidos grasos de la dieta, siendo más bajos en los peces a los que se les suministró la DD (**Tabla 4.1.1**).

Los resultados de los parámetros somatométricos analizados no revelaron diferencias significativas entre tratamientos. Así, el índice hepatosomático (IHS) mostró valores de 0,92 y 0,93 para los peces que ingirieron la DD y DC, respectivamente, mientras que el factor de condición (K), que relaciona el volumen y peso de los ejemplares y es considerado un indicativo de bienestar corporal del animal o como un índice de engorde, se mantuvo prácticamente invariable a lo largo del experimento y entre tratamientos, siendo próximo a 2,20 al comienzo de la experiencia, y 2,13 (DD) y 2,17 (DC), al final de la misma.

Finalmente, ninguno de los dos grupos ensayados presentó mortalidades a lo largo del periodo de engorde, ni irregularidades en su aspecto externo como deformidades, erosiones de la piel o aletas, coloración o mucosidad anómalas.

Tabla 4.1.1. Resultados de crecimiento y utilización del alimento de juveniles de dorada alimentados durante 120 días con las dos dietas experimentales

	DC	DD	P
Peso inicial (g)	135,30 ± 1,04	135,27 ± 0,40	N.S.
Longitud total inicial (cm)	18,20 ± 0,00	18,30 ± 0,10	N.S.
Factor de condición ¹ inicial (K _i)	2,23 ± 0,06	2,20 ± 0,00	N.S.
Peso final (g)	271,43 ± 6,81	255,20 ± 5,12	<0,05
Longitud total final (cm)	23,20 ± 0,30	22,87 ± 0,12	N.S.
Factor de condición ¹ final (K _f)	2,17 ± 0,06	2,13 ± 0,06	N.S.
IHS ²	0,93 ± 0,11	0,92 ± 0,14	N.S.
Ganancia de peso (%)	100,60 ± 3,54	88,67 ± 3,46	<0,05
Tasa de crecimiento específico (%) ³	0,58 ± 0,01	0,53 ± 0,02	<0,05
Materia seca ingerida (g/pez)	227,47 ± 8,57	219,27 ± 5,75	N.S.
Eficiencia del alimento ⁴	0,60 ± 0,04	0,55 ± 0,01	N.S.
Eficiencia de la proteína ⁵	1,19 ± 0,08	1,07 ± 0,02	N.S.

Valores expresados como media ± DE (n=3, salvo para IHS, donde n=20). Cada réplica representa los resultados medios de cada tanque experimental. ¹ $K_{i,f} = 100 \cdot \text{Peso}_{i,f} \text{ (g)} / \text{Longitud}_{i,f}^3 \text{ (cm)}$. ² Índice hepatoesomático = $100 \cdot \text{peso del hígado} / \text{peso del pez}$. ³ Tasa de crecimiento específico = $100 \cdot [\ln \text{Peso}_{\text{final}} \text{ (g)} - \ln \text{Peso}_{\text{inicial}} \text{ (g)}] / \text{días}$. ⁴ Eficiencia del alimento = ganancia de peso fresco/ingesta de alimento en peso seco. ⁵ Eficiencia de la proteína = ganancia de peso fresco/ingesta de proteína.

4.2. Efecto de la composición lipídica de la dieta sobre la composición lipídica del músculo

4.2.1. Perfil lipídico del músculo en condiciones control

Según refleja la **Tabla 4.2.1**, el contenido lipídico del músculo de los peces a los que se suministró la dieta que contenía aceite de pescado, supuso el 6,4% de su peso seco. El 43,5% de los lípidos fueron polares y el 56,5% neutros. La FC y la FE constituyeron las clases lipídicas más importantes dentro de la fracción polar, al representar más del 50 y del 25% del total, respectivamente. En la fracción neutra, destacaron los TG, que constituyeron algo más de las tres cuartas partes de la misma.

En el LT de los peces que se alimentaron con la dieta control, los monoinsaturados representaron el 35,7% del total de ácidos grasos, 33,9% los PUFA y 29% los saturados. Más de las tres cuartas partes de los ácidos grasos que integraron los PUFA, pertenecían a los (n-3) HUFA, como por ejemplo, el 22:5 (2,1%), el 20:5 (7,1%) y el 22:6 (13,8%). Por lo que respecta a la serie (n-6), el 18:2 y el 20:4 fueron mayoritarios (4,9 y 1,1%, respectivamente). Dentro de los saturados, el 16:0 fue su representante más destacado con un 19,4%, y en los monoinsaturados, el 18:1(n-9), que se elevó hasta el 22,3% (**Tabla 4.2.2**).

En las **Tablas 4.2.3** y **4.2.4** se puede observar la composición en ácidos grasos de las principales clases lipídicas polares del músculo alimentados con la DC. En todas ellas, los PUFA y los saturados fueron, por ese orden, los grupos más abundantes, mientras que la proporción de MUFA se aproximó al 11% en la FE, FS y FI, y al 18% en la FC. Los PUFA constituyeron cerca de la mitad de los ácidos grasos, y los saturados, entre el 33 y el 40%, excepto en la FE, donde representaron el 58,7 y el 21,6%, respectivamente. La contribución de la serie (n-3) a los PUFA totales, fue sustancialmente más relevante que la de la serie (n-6), aportando un 76,6% en el FI, un 81,9% en la FC, un 84,1% en la FS y un 87,9% en la FE. La proporción más elevada de (n-3) HUFA, se manifestó en la FE (51,5%), las restantes clases lipídicas polares presentaron valores muy similares y cercanos al 40%. Sólo se detectaron

DMA en la FE, donde acontecieron por un 7,0% del total, principalmente 16:0DMA y 18:0DMA.

La contribución de los principales ácidos grasos saturados, el 16:0 y el 18:0, varió sustancialmente entre las cuatro fracciones lipídicas polares analizadas (**Tabla 4.2.3 y 4.2.4**). Así por ejemplo, el 16:0 alcanzó valores de 29,1% en la FC, mientras que en FI, FS y FE, fue ostensiblemente más bajo, entre el 5,6 y el 9,2%. Por el contrario, la proporción más reducida de 18:0 se encontró en la FC (3,3%), intermedia en la FE (11,8%) y las más altas, alrededor del 30%, en la FS y FI. Dentro de los monoinsaturados, su principal representante fue el 18:1(n-9), que se acumuló en un valor próximo al 13% en la FC, manteniéndose cercano al 7% en el resto. Productos derivados del OA, como el 18:2 y el 20:2, estuvieron presentes en las distintas clases lipídicas, excepto en el FI, donde no se detectó el producto de 18C. El 18:2(n-6) osciló entre un 2,9 y un 4,5% en todas las clases lipídicas polares, mientras que el 20:4(n-6) alcanzó su nivel más alto en el FI (8,2% del total de ácidos grasos), representando menos de un tercio del valor anterior en las tres restantes. Componentes de la serie (n-6) derivados del 18:2 de 18, 20 y 22C, estuvieron presentes en todas las clases lipídicas polares, excepto el 22:4(n-6) en el FI, y el 18:3 y 20:2 en la FS. El 18:3(n-3) participó de manera testimonial en los componentes polares del músculo, no superando el 0,2% en ninguno de ellos. Los dos (n-3) HUFA más importantes manifestaron alta variabilidad entre clases lipídicas, así por ejemplo, la FC presentó el valor más alto de 20:5(n-3) (14,2%), valor 1,5, 2 y 3,8 veces superior al obtenido en FI, FE y FS, respectivamente. En cuanto a la presencia de 22:6(n-3), siguió el orden: FE > FS > FI > FC, obteniéndose porcentajes de 40,5, 31,7, 26,5 y 22,5%, respectivamente. Otro (n-3) HUFA destacado fue el 22:5, que representó entre el 2,2 y el 3,5% del total de ácidos grasos en las distintas clases lipídicas.

Como cabía esperar, el perfil de ácidos grasos de los TG (**Tabla 4.2.4**) difirió notablemente del de las distintas clases lipídicas polares. Así por ejemplo, mostraron niveles de saturados más bajos que los de la FC, FS y FI, y más altos que los de la FE. El contenido total de MUFA fue alrededor de 4 veces mayor en la clase lipídica neutra que en la FE, FS y FI, y 2,5 veces superior al de la FC. Por el contrario, los PUFA supusieron, escasamente, la mitad del valor registrado en las clases lipídicas polares. Finalmente, el porcentaje de (n-6) total (6,8%) fue similar al de la FC, FE y

FS, y algo menos de la mitad del obtenido en el FI, mientras que el total de (n-3) (15,5%) fue unas 2,5 veces más bajo que en la FC, FS y FI, y 3,3 veces menor que en la FE.

Individualmente se debe destacar que la proporción de 14:0 en los TG se elevó hasta el 4,8%, mientras que en las fracciones polares no pasó del 0,4%, además, el contenido de 16:0 superó entre 2 y 3 veces al encontrado en la FE, FS y FI, pero fue algo más bajo que el de la FC. Sorprendentemente, el 18:0 sólo alcanzó un 4,4%, valor equiparable al encontrado en la FC, 2,7 veces menor que el de FE y alrededor de 7 veces por debajo del de FS y FI. Los TG del músculo presentaron valores superiores de todos los MUFA, incluyendo el 18:1(n-9), que representó más de una cuarta parte del total de ácidos grasos, llamando la atención el de 22C, que estuvo próximo al 3%, no habiendo sido detectado en los lípidos polares. Aunque el porcentaje de 18:2(n-6) superó entre 1,3 y 2 veces al de las distintas clases lipídicas polares, el de 20(4n-6) fue entre 2 y 3 veces más bajo que en la FC, FE y FS, y más de 10 veces menor que en el FI. Se detectaron derivados de 18 y 20C con dos insaturaciones, procedentes del 18:1(n-9) y del 18:2(n-6). Las proporciones de 18:3(n-3) y 18:4(n-3) en los TG, fueron muy superiores a las presentes en los fosfolípidos. El EPA mostró un nivel similar en los TG al observado en la FS, aunque entre 2 y 4 veces inferior al de FE, FI y FC, el DHA fue entre 3 y 6 veces menos abundante en la clase lipídica neutra (**Tabla 4.2.3 y 4.2.4**).

4.2.2. Efecto de la deficiencia dietaria de HUFA en el músculo

No se registraron variaciones significativas al final del periodo experimental, ni en el contenido lipídico del músculo, ni en la proporción total de lípidos polares o neutros. La única diferencia estadística encontrada en este órgano entre los peces de ambos tratamientos se detectó en el contenido de colesterol, que fue más bajo en los ejemplares que ingirieron la dieta deficiente en HUFA, donde representó el 5,9%, frente al 6,5% de los peces DC (**Tabla 4.2.1**).

A pesar de las diferencias en la composición lipídica de las dietas experimentales, el contenido total de saturados, MUFA, DMA y PUFA del LT del músculo se mantuvo invariable entre ambos grupos de peces (**Tabla 4.2.2**). Sin embargo, en los

ejemplares que recibieron la DD, el sumatorio de (n-6) fue más de dos veces superior al de los DC, mientras que el de (n-3) y la relación (n-3)/(n-6) fueron menores. Aunque la proporción de 18:1(n-9) no varió entre tratamientos, la concentración de 20:3(n-9) en los que ingirieron la dieta deficiente en HUFA fue significativamente mayor. Los ejemplares alimentados con esta dieta presentaron un 13,2% de 18:2(n-6) frente al 4,9% de los peces DC y mitad de ARA, sin embargo, ninguno de los compuestos derivados del LA reflejaron diferencias significativas entre tratamientos. El músculo de los individuos a los que se suministró la DD contenía 3,3 veces más LNA en el LT, que el de los ejemplares que recibieron la dieta con AP. Por el contrario, todos los (n-3) HUFA fueron significativamente más bajos en el grupo deficiente (20:4 y 21:5 para $P < 0,05$, 22:6 para $P < 0,01$ y 20:5 y 22:5 para $P < 0,001$).

La FC del músculo de los juveniles que se alimentaron con la DD, presentó menor proporción de saturados, (n-3), (n-3) HUFA totales, así como una relación (n-3)/(n-6) inferior, y porcentajes más altos de (n-6) y PUFA que los pertenecientes al grupo DC (**Tabla 4.2.3**). Ni la cantidad global de MUFA, ni la de sus componentes individuales variaron entre tratamientos, tampoco lo hicieron los productos de elongación y/o desaturación del 18:1(n-9). La disminución en el sumatorio de saturados es debida a la reducción de su principal componente, el 16:0. Tanto el 18:2(n-6) como sus derivados de 20C con 2 o 3 insaturaciones, fueron más abundantes en los individuos que ingirieron la dieta deficiente en AGE, mientras que la cantidad de ARA permaneció estable. A pesar de que la presencia de 18:3(n-3) fue más de 6 veces superior en los individuos DD, el porcentaje de sus productos derivados en los ejemplares de ambos tratamientos no resultó modificado. Por último, los principales (n-3) HUFA presentaron concentraciones menos elevadas en los peces a los que se suministró la dieta carente de AP, aunque a niveles de significación diferentes ($P < 0,01$ para el 22:5 y el 22:6, y $P < 0,001$ para el 20:5).

En la FE, los ácidos grasos saturados de 16 y 18 átomos de C, que representaron más del 96% del grupo, se mantuvieron constantes entre tratamientos (**Tabla 4.2.3**). Tampoco resultaron alterados por la composición dietaria, el total de MUFA, DMA o PUFA. Por el contrario, los juveniles que fueron alimentados con la dieta deficiente en HUFA mostraron proporciones inferiores de (n-3), (n-3) HUFA, así como de la relación (n-3)/(n-6) y más altas de la serie (n-6). A pesar de que el 18:1(n-9) fue más

abundante en los peces que recibieron la DD, ninguno de sus derivados presentó valores significativamente diferentes entre grupos. Entre los (n-6), el 18:2 fue más de 3 veces superior en los peces del grupo DD, el 20:2 cuatro veces, y el 20:3 doble, por el contrario, el nivel de 20:4 no evidenció diferencias significativas. El 18:3(n-3) representó el 1,0% del total de ácidos grasos del músculo en los juveniles que recibieron la DD, mientras que en aquellos que ingirieron la DC se detectó a nivel traza, también fue mayor en los primeros el nivel de 20:3(n-3). La presencia de los tres (n-3) HUFA más relevantes fue más baja en los peces alimentados con la DD, donde alcanzaron valores de 4,2% el EPA, 2,1% el DPA y 36,5% el DHA ($P < 0,001$, $P < 0,01$ y $P < 0,05$, respectivamente).

La composición lipídica de la dieta no afectó al total de saturados ni de PUFA presentes en la FS (**Tabla 4.2.4**). Sin embargo, el contenido de (n-3) HUFA, de (n-3), así como la relación (n-3)/(n-6) fueron más bajos en los peces DD, mientras que el total de MUFA y de la serie (n-6) experimentaron un significativo ascenso. Las variaciones encontradas en los monoinsaturados se debieron exclusivamente a los componentes de 16C. Ni el OA, ni ninguno de sus derivados, mostraron diferencias significativas entre ambos grupos de peces. Por lo que respecta a la serie (n-6), el porcentaje de 18:2 en los individuos del lote DD superó en 2,5 veces al del lote DC, el 20:3(n-6) fue doble en el primer grupo, y por contra, la concentración de 20:4 se redujo. Dentro de los (n-3), sólo el 18:3 alcanzó una proporción superior en los ejemplares que tomaron la dieta deficiente, mientras que (n-3) HUFA como el 20:5 y 22:5 fueron menos abundantes ($P < 0,05$ y $P < 0,01$, respectivamente), no registrándose diferencias significativas en la cantidad de 22:6 (27,2 y 31,7% en ejemplares DD y DC, respectivamente).

El FI presentó las mismas tendencias observadas en la FE, aunque menos acusadas (**Tabla 4.2.4**). Así por ejemplo, los juveniles que tomaron la dieta deficiente en AGE mostraron un nivel más reducido de (n-3) HUFA, de (n-3), así como de la proporción (n-3)/(n-6), y mayor de la serie (n-6), permaneciendo invariables los porcentajes individuales de todos los ácidos grasos saturados y monoinsaturados, sus totales, y el sumatorio de PUFA. El 18:2(n-6) triplicó su presencia en los individuos DD con respecto al valor obtenido en los DC, tanto el 20:2(n-6) como el 20:3(n-6) fueron también más abundantes en los primeros, en cambio, el 20:4(n-6) se mantuvo en

torno al 8% en ambos tratamientos. A pesar de que el porcentaje de 18:3(n-3) fue 6 veces más alto en los ejemplares que ingirieron la dieta sin AP, no se detectaron diferencias entre tratamientos en sus productos derivados. Los (n-3) HUFA, salvo el 20:3(n-3), presentaron niveles más bajos en los individuos deficientes en AGE, siendo estas diferencias más acusadas para el 20:5(n-3) y 22:5(n-3) ($P < 0,01$), que para el 20:4(n-3) y 22:6(n-3) ($P < 0,05$).

Con respecto a la composición en ácidos grasos de los lípidos neutros del músculo, los TG de los juveniles del tratamiento DD presentaron un porcentaje más bajo de saturados, MUFA y (n-3) HUFA totales, así como de la relación (n-3)/(n-6) (26,3%, 43,1%, 11,1% y 1,1, respectivamente) que el de los individuos DC (29,3%, 44,7%, 13,3% y 2,3, respectivamente). Por el contrario, la proporción total de PUFA y de (n-6) fue mayor en los primeros (30,0% vs. 24,5% y 13,6% vs. 6,8%, respectivamente). La variación encontrada en el total de MUFA es debida a los ácidos grasos de 16C, ya que el resto de componentes permaneció constante, mientras que en los saturados, los 14, 16 y 18C, son los responsables de las diferencias encontradas. Los productos derivados del 18:1(n-9) se mantuvieron sin variaciones en los ejemplares de ambos tratamientos. Dentro de la serie (n-6), el 18:2, 20:2 y 20:3 fueron significativamente más altos en los peces que ingirieron la dieta deficiente en AGE, mientras que el 20:4 siguió la tendencia opuesta. El contenido de 18:3(n-3) en los juveniles del grupo DD triplicó el del grupo DC, siendo también más alto en los primeros el 20:3(n-3). Tanto 20:5(n-3) como 22:5(n-3), fueron más escasos en los ejemplares a los que se suministró la DD, mientras que la concentración de 20:4(n-3) y 22:6(n-3) no varió entre tratamientos (**Tabla 4.2.4**).

Finalmente, en la **Tabla 4.2.2** aparecen reflejados los resultados obtenidos de la evaluación nutricional para consumo humano del filete de juveniles de dorada de ambos grupos experimentales. El índice que determina la calidad de la fuente lipídica (ICP) fue significativamente menor en el músculo de los peces que ingirieron la dieta que carecía de AP (DD), mientras que el índice de trombogenicidad (IT), fue más alto en ese grupo. No se detectaron diferencias estadísticas ($P = 0,061$) entre tratamientos para el valor del índice de aterogenicidad (IA_t).

Tabla 4.2.1. Contenido lipídico y composición en clases lipídicas del músculo de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)

	DC	DD	P
Lípido total (% peso seco)	6,4 ± 0,5	5,9 ± 0,6	N.S.
Clases lipídicas (% lípido total)			
Lisofosfatidilcolina	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1	N.S.
Esfingomielina	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	N.S.
Fosfatidilcolina	22,1 ± 1,6	19,3 ± 2,2	N.S.
Fosfatidilserina	2,6 ± 0,2	2,5 ± 0,1	N.S.
Fosfatidilinositol	4,8 ± 0,6	4,0 ± 0,4	N.S.
CL/FG	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,2	N.S.
Fosfatidiletanolamina	11,2 ± 0,8	10,3 ± 1,3	N.S.
No identificados	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	
Total lípidos polares	43,5 ± 3,2	38,9 ± 4,3	N.S.
Acilgliceroles parciales	1,0 ± 0,2	1,4 ± 0,1	N.S.
Colesterol	6,5 ± 0,1	5,9 ± 0,2	<0,01
Ácidos grasos libres	2,5 ± 0,3	3,0 ± 0,1	N.S.
Triglicéridos	42,9 ± 3,5	47,7 ± 4,0	N.S.
Ésteres de esteroles	3,6 ± 0,4	2,9 ± 0,2	N.S.
No identificados	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1	
Total lípidos neutros	56,5 ± 3,2	61,1 ± 4,3	N.S.

Valores expresados como media ± DE (n=8 para contenido lipídico y n=3 para composición en clases lipídicas). Cada réplica representa la mezcla de músculo de 6 peces. N.S., no significativamente diferentes; CL, cardiolipín; FG, fosfatidilglicerol.

Tabla 4.2.2. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) del **lípido total** del músculo de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)

	DC	DD	P
Total ácidos grasos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco tejido)	55,9 \pm 4,1	47,9 \pm 4,8	<0,05
14:0	3,2 \pm 0,1	3,2 \pm 0,3	N.S.
16:0	19,4 \pm 0,9	18,1 \pm 1,2	N.S.
16:1(n-9+n-7)	5,8 \pm 0,2	5,4 \pm 0,3	N.S.
18:0	5,6 \pm 0,5	4,7 \pm 0,4	<0,05
18:1(n-9)	22,3 \pm 1,0	23,4 \pm 1,1	N.S.
18:1(n-7)	2,7 \pm 0,1	2,5 \pm 0,2	N.S.
18:2(n-9)	0,3 \pm 0,0	0,3 \pm 0,1	N.S.
18:2(n-6)	4,9 \pm 0,8	13,2 \pm 0,7	<0,001
18:3(n-3)	0,7 \pm 0,0	2,3 \pm 0,3	<0,001
18:4(n-3)	1,2 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	N.S.
20:1(n-11+n-9)	2,5 \pm 0,2	3,0 \pm 0,2	<0,05
20:2(n-9)	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,0	N.S.
20:2(n-6)	nd	0,1 \pm 0,1	N.S.
20:3(n-9)	0,1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,0	<0,01
20:3(n-6)	0,1 \pm 0,1	0,2 \pm 0,0	N.S.
20:4(n-6)	1,1 \pm 0,1	0,6 \pm 0,0	<0,001
20:4(n-3)	0,7 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	<0,05
20:5(n-3)	7,1 \pm 0,3	3,6 \pm 0,1	<0,001
22:1(n-11+n-9)	2,3 \pm 0,2	2,9 \pm 0,1	<0,01
21:5(n-3)	0,3 \pm 0,0	0,2 \pm 0,1	<0,05
22:5(n-6)	0,3 \pm 0,0	0,2 \pm 0,1	N.S.
22:5(n-3)	2,1 \pm 0,1	1,4 \pm 0,0	<0,001
22:6(n-3)	13,8 \pm 1,3	10,0 \pm 0,8	<0,01
No identificados	1,1 \pm 0,2	1,0 \pm 0,3	
Total saturados*	29,0 \pm 1,2	27,1 \pm 1,5	N.S.
Total MUFA	35,7 \pm 1,5	37,2 \pm 2,0	N.S.
Total DMA**	0,3 \pm 0,2	0,1 \pm 0,1	N.S.
Total PUFA***	33,9 \pm 0,7	34,6 \pm 1,2	N.S.
Total (n-6)	6,4 \pm 0,8	14,4 \pm 0,5	<0,001
Total (n-3)	25,9 \pm 1,5	19,1 \pm 0,9	<0,001
(n-3)/(n-6)	4,1 \pm 0,8	1,3 \pm 0,1	<0,001
Total (n-3) HUFA	23,9 \pm 1,6	15,6 \pm 1,0	<0,001
ICP	20,84 \pm 1,54	13,51 \pm 0,92	<0,001
IAt	0,47 \pm 0,01	0,44 \pm 0,03	N.S.
IT	0,28 \pm 0,01	0,31 \pm 0,02	<0,05

Valores expresados como media \pm DE (n=4 para DC y n=5 para DD). Cada réplica representa la mezcla de músculo de 6 peces. N.S., no significativamente diferentes; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; DMA, dimetilacetal; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados ($\geq\text{C}_{20}$ y ≥ 3 dobles enlaces). * incluye 15:0, 17:0, 19:0 y 20:0; ** incluye 16:0DMA y 18:0DMA; *** incluye 16:2, 16:3 y 16:4. ICP, índice de calidad de los lípidos en el filete; IAt, índice de aterogenicidad; IT, índice de trombogenicidad.

Tabla 4.2.3. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de la fosfatidilcolina (FC) y fosfatidiletanolamina (FE) del músculo de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)

	FC		FE	
	DC	DD	DC	DD
14:0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1
16:0DMA	nd	nd	1,9 ± 0,4	1,9 ± 0,5
16:0	29,1 ± 0,8	26,3 ± 1,0 ¹	9,2 ± 0,4	9,2 ± 0,3
16:1(n-9+n-7)	1,8 ± 0,3	1,4 ± 0,3	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,2
18:0DMA	nd	nd	3,3 ± 0,7	3,3 ± 0,6
18:1(n-9+n-7)DMA	nd	nd	1,8 ± 0,4	1,8 ± 0,5
18:0	3,3 ± 0,0	3,6 ± 0,1 ²	11,8 ± 0,7	11,2 ± 0,4
18:1(n-9)	13,3 ± 0,4	14,6 ± 0,9	6,7 ± 0,2	7,9 ± 0,1 ³
18:1(n-7)	2,4 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,2 ± 0,1	1,8 ± 0,1 ²
18:2(n-9)	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
18:2(n-6)	4,5 ± 1,1	20,1 ± 2,8 ³	3,0 ± 0,6	10,3 ± 1,2 ³
18:3(n-6)	0,1 ± 0,1	nd	0,1 ± 0,1	nd
18:3(n-3)	0,2 ± 0,0	1,3 ± 0,2 ³	tr	1,0 ± 0,2 ²
18:4(n-3)	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	nd	nd
20:1(n-11+n-9)	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,2
20:2(n-9)	tr	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1
20:2(n-6)	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,0 ³	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,0 ²
20:3(n-6)	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,1 ²	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,1 ²
20:4(n-6)	2,4 ± 0,3	1,5 ± 0,4	2,4 ± 0,2	2,1 ± 0,3
20:3(n-3)	nd	nd	nd	0,3 ± 0,0 ²
20:4(n-3)	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0 ¹	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,1 ¹
20:5(n-3)	14,2 ± 0,9	6,3 ± 0,9 ³	7,0 ± 0,1	4,2 ± 0,5 ³
22:4(n-6)	0,2 ± 0,0	tr ¹	0,1 ± 0,1	nd
22:5(n-6)	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,0 ¹	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,1
22:5(n-3)	2,2 ± 0,1	1,4 ± 0,2 ²	3,0 ± 0,2	2,1 ± 0,2 ²
22:6(n-3)	22,5 ± 0,7	17,0 ± 1,8 ²	40,5 ± 0,6	36,5 ± 2,1 ¹
No identificados	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,9 ± 0,4	1,3 ± 0,3
Total saturados*	33,2 ± 0,7	31,1 ± 0,7 ¹	21,6 ± 1,1	21,2 ± 0,4
Total MUFA	17,9 ± 0,6	18,3 ± 1,0	10,8 ± 0,5	11,6 ± 0,2
Total DMA	nd	nd	7,0 ± 1,6	6,9 ± 1,5
Total PUFA**	48,6 ± 0,3	50,1 ± 0,3 ²	58,7 ± 0,5	59,0 ± 1,6
Total (n-6)	8,1 ± 0,8	23,0 ± 2,5 ³	6,6 ± 0,5	13,9 ± 0,9 ³
Total (n-3)	39,8 ± 1,0	26,4 ± 2,7 ²	51,6 ± 0,6	44,6 ± 2,6 ¹
(n-3)/(n-6)	4,9 ± 0,6	1,2 ± 0,2 ³	7,9 ± 0,6	3,2 ± 0,4 ³
Total (n-3) HUFA	39,5 ± 1,1	25,0 ± 2,9 ²	51,5 ± 0,7	43,6 ± 2,8 ²

Valores expresados como media ± DE (n=3). Cada réplica representa la mezcla de músculo de 6 peces. nd, no detectado; tr, valor <0,05%; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; DMA, dimetilacetil; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados (≥C₂₀ y ≥3 dobles enlaces). Dentro de una misma fila, diferencias significativas entre pares de datos son expresadas como: ¹ P<0,05, ² P<0,01, ³ P<0,001. * incluye 15:0, 17:0 y 19:0; ** incluye 16:2 y 16:3.

Tabla 4.2.4. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de la fosfatidilserina (FS), fosfatidilinositol (FI) y triglicéridos (TG) del músculo de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)

	FS		FI		TG	
	DC	DD	DC	DD	DC	DD
14:0	0,4 ± 0,0	0,8 ± 0,1 ²	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	4,8 ± 0,1	4,1 ± 0,2 ¹
15:0	0,4 ± 0,0	0,8 ± 0,2 ²	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0
16:0	7,7 ± 0,6	10,9 ± 2,9	5,6 ± 0,7	6,2 ± 0,6	18,9 ± 0,5	17,2 ± 0,4 ¹
16:1(n-9+n-7)	0,9 ± 0,2	2,6 ± 0,2 ³	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,1	7,9 ± 0,3	7,1 ± 0,2 ¹
16:3	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,5 ± 0,0 ³
18:0	30,3 ± 1,4	24,9 ± 4,2	29,8 ± 1,5	28,2 ± 0,2	4,4 ± 0,2	3,7 ± 0,0 ²
18:1(n-9)	7,4 ± 0,2	8,9 ± 1,6	7,3 ± 0,6	7,7 ± 0,2	26,1 ± 0,8	25,3 ± 1,0
18:1(n-7)	2,3 ± 0,3	2,1 ± 0,6	2,5 ± 0,5	2,4 ± 0,2	4,3 ± 0,6	3,6 ± 0,1
18:2(n-9)	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,2	nd	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,2
18:2(n-6)	4,0 ± 0,2	10,1 ± 1,4 ²	2,9 ± 0,9	9,2 ± 1,4 ²	5,7 ± 0,6	12,5 ± 1,4 ²
18:3(n-6)	nd	nd	0,1 ± 0,1	nd	0,1 ± 0,1	nd
19:0	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,1 ¹
18:3(n-3)	nd	0,6 ± 0,1 ¹	0,1 ± 0,1	0,6 ± 0,1 ²	0,8 ± 0,1	2,5 ± 0,4 ²
18:4(n-3)	0,2 ± 0,1	nd	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1
20:1(n-11+n-9)	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1	3,3 ± 0,3	3,6 ± 0,5
20:2(n-9)	0,1 ± 0,1	nd	tr	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,0
20:2(n-6)	nd	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,1 ²	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0 ²
20:3(n-6)	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,1 ¹	0,3 ± 0,0	0,6 ± 0,1 ¹	nd	0,1 ± 0,0 ²
20:4(n-6)	1,6 ± 0,2	1,0 ± 0,2 ¹	8,2 ± 0,4	7,6 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,0 ²
20:3(n-3)	nd	nd	nd	0,1 ± 0,0	nd	0,1 ± 0,0 ²
20:4(n-3)	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0 ¹	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,1
20:5(n-3)	3,7 ± 0,2	2,0 ± 0,6 ¹	9,4 ± 0,4	7,9 ± 0,3 ²	4,1 ± 0,3	2,5 ± 0,2 ²
22:1(n-11+n-9)	nd	nd	nd	nd	2,9 ± 0,3	3,3 ± 0,5
22:4(n-6)	0,4 ± 0,0	0,1 ± 0,2	nd	nd	nd	nd
22:5(n-6)	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	nd	nd
22:5(n-3)	3,5 ± 0,4	2,0 ± 0,3 ²	2,9 ± 0,1	2,1 ± 0,2 ²	1,7 ± 0,0	1,2 ± 0,2 ¹
22:6(n-3)	31,7 ± 1,7	27,2 ± 3,8	26,5 ± 2,0	22,9 ± 0,8 ¹	6,7 ± 0,5	6,4 ± 0,7
No identificados	1,0 ± 0,3	1,5 ± 0,3	1,2 ± 0,4	1,0 ± 0,0	1,5 ± 0,5	0,6 ± 0,1
Total saturados*	40,2 ± 2,0	38,8 ± 3,6	36,6 ± 1,0	35,6 ± 0,8	29,3 ± 0,8	26,3 ± 0,5 ²
Total MUFA**	11,4 ± 0,2	14,4 ± 1,4 ²	10,9 ± 0,9	11,1 ± 0,3	44,7 ± 0,5	43,1 ± 0,1 ²
Total PUFA***	47,3 ± 2,3	45,3 ± 5,2	51,3 ± 1,0	52,3 ± 1,0	24,5 ± 1,1	30,0 ± 0,5 ²
Total (n-6)	7,1 ± 0,4	12,6 ± 1,4 ²	11,8 ± 1,5	18,1 ± 1,7 ¹	6,8 ± 0,6	13,6 ± 1,3 ²
Total (n-3)	39,8 ± 1,8	32,2 ± 4,3 ¹	39,3 ± 2,1	34,0 ± 1,0 ¹	15,5 ± 0,4	14,8 ± 0,9
(n-3)/(n-6)	5,6 ± 0,2	2,6 ± 0,2 ³	3,4 ± 0,6	1,9 ± 0,2 ¹	2,3 ± 0,1	1,1 ± 0,2 ³
Total (n-3) HUFA	39,6 ± 1,8	31,6 ± 4,3 ¹	39,1 ± 2,2	33,2 ± 1,1 ¹	13,3 ± 0,3	11,1 ± 1,2 ¹

Valores expresados como media ± DE (n=3). Cada réplica representa la mezcla de músculo de 6 peces. nd, no detectado; tr, valor <0,05%; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados ($\geq C_{20}$ y ≥ 3 dobles enlaces). Dentro de una misma fila, diferencias significativas entre pares de datos son expresadas como: ¹ P<0,05, ² P<0,01, ³ P<0,001. * incluye 17:0 y 20:0; ** incluye 14:1 y 24:1; *** 16:2 y 16:4.

4.3. Efecto de la composición lipídica de la dieta sobre la composición lipídica del hígado, hematocrito, cerebro y tracto intestinal

4.3.1. Perfil lipídico del hígado en condiciones control

El hígado de los juveniles alimentados con la DC estuvo compuesto en un 22,2% de su peso seco por lípido, de los que un 40,1% fueron polares y un 59,9% neutros. La FC representó más de la mitad de la fracción lipídica polar, y la FE casi el 30%, entre los lípidos neutros, los TG fueron la clase lipídica más abundante, superando el 60% del total (**Tabla 4.3.1**).

Los MUFA constituyeron el grupo más abundante del LT del hígado de los peces DC (37,2%), siendo el 18:1(n-9) su componente más destacado. Se detectó la presencia en estos ejemplares de pequeñas cantidades de productos de elongación y/o desaturación del 18:1(n-9) como el 18:2 o el 20:2. El segundo grupo en importancia fue el de los saturados, donde el contenido de 16:0 se aproximó al 20%, y, finalmente, los PUFA, con un 29,0%. La contribución de la serie (n-3) al total de poliinsaturados quintuplicó a la de la serie (n-6), donde el LA y el ARA fueron mayoritarios (2,6 y 1,6%, respectivamente). Dentro de los (n-3), la concentración de 18:3 fue del 0,5%, mientras que los HUFA superaron el 21% del total de ácidos grasos, principalmente debido a las proporciones de EPA (6,5%), DPA (2,2%) y DHA (11,9%) (**Tabla 4.3.2**).

Al comparar la composición en ácidos grasos del TLP con la de los TG en juveniles alimentados con la DC (**Tabla 4.3.3**), destaca el menor porcentaje de monoinsaturados y las cerca de 4 veces más (n-3) HUFA total, presentes en el TLP. Como consecuencia de este bajo nivel de (n-3) HUFA, el total de (n-3), de PUFA, así como la relación (n-3)/(n-6), se vieron reducidos en los TG. Otra diferencia reseñable entre ambas fracciones lipídicas fue la presencia de ciertos DMA en el TLP, compuestos no detectados en los TG. Por lo que respecta a ácidos grasos individuales, destacar que, 14:0, todos los MUFA, 18:2(n-6), 18:3(n-3) y 18:4(n-3), presentaron contenidos superiores en la clase lipídica neutra. Asimismo, productos derivados del OA como el 18:2(n-9) o el 20:2(n-9), o del LA como el 18:3(n-6), fueron

también más abundantes en los TG. Por el contrario, fueron menos importantes en esta clase lipídica, el 20:5(n-3), 22:5(n-3), 22:5(n-6), y, sobre todo, 20:4(n-6) y 22:6(n-3), siendo éstos últimos entre 5 y 6 veces más escasos.

4.3.2. Efecto de la deficiencia dietaria de HUFA en el hígado

Las doradas alimentadas con la dieta deficiente en HUFA incrementaron sustancialmente el contenido de LT del hígado con respecto a las que recibieron la dieta control (35,5 vs. 22,2%) (**Tabla 4.3.1**). Esta diferencia no influyó en la proporción total de lípidos polares y neutros, que se mantuvo próxima al 40 y 60%, respectivamente, en los dos tratamientos ensayados. De entre las clases lipídicas, sólo variaron significativamente la FC y los acilglicerolés parciales, que mostraron porcentajes superiores en los individuos del grupo DD. El efecto de la deposición grasa en el hígado, generada por la deficiencia dietaria de HUFA, fue evidente a simple vista, dando lugar a órganos inflamados, de consistencia blanda y pálidos (**Figura 4.1**).

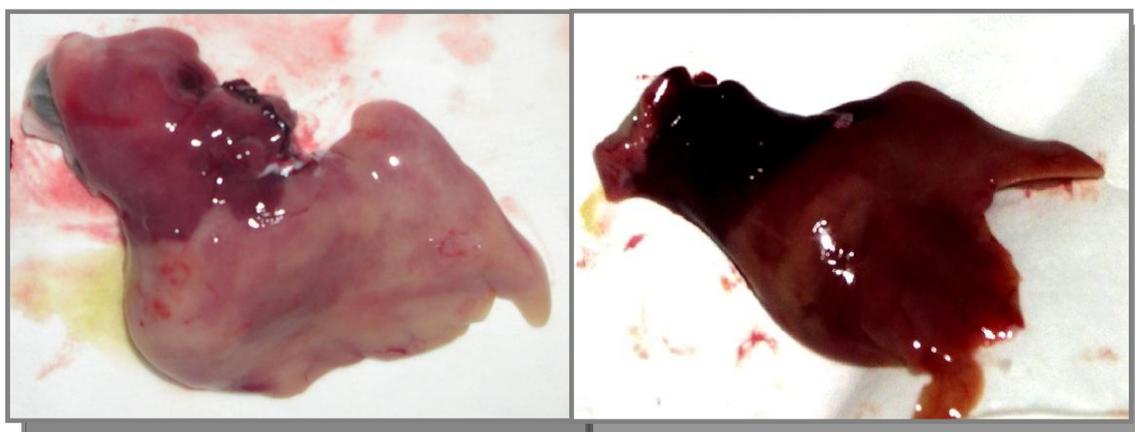


Figura 4.1. Aspecto externo del hígado de ejemplares experimentales. **Izda.** Peces alimentados con la DD. **Dcha.** Peces alimentados con la DC.

Según se refleja en la **Tabla 4.3.2**, el perfil de ácidos grasos del LT del hígado resultó afectado por la composición lipídica del alimento. Así por ejemplo, en los

peces del grupo DD, el total de ácidos grasos saturados, y los contenidos individuales de 14:0 y 16:0, se redujeron significativamente, mientras que el 19:0, que no estuvo presente en los individuos del tratamiento control, se incrementó hasta el 1,8%. Los (n-3) HUFA disminuyeron su porcentaje total hasta el 7,1%, debido a que sus ácidos grasos más representativos, EPA, DPA y DHA, fueron 5, 3,7 y 2,5 veces más bajos, respectivamente, que en los peces que recibieron la dieta control, estando ausente en el grupo DD, el 21:5(n-3). Esta importante reducción en los (n-3) HUFA, dio lugar a una disminución del contenido de (n-3) total y de la relación (n-3)/(n-6). Por el contrario, la serie (n-6) cuadruplicó su presencia en el grupo que no ingirió AGE, como consecuencia del fuerte incremento de 18:2(n-6) en estos ejemplares (18,0% frente a 2,6%), ya que el ARA sólo representó la tercera parte del contenido presente en el grupo control. Esta mayor aportación de la serie (n-6) al total de PUFA, compensó la reducción de los (n-3), de forma que el porcentaje total de poliinsaturados permaneció invariable entre tratamientos y próximo al 30%. Finalmente, el total de MUFA se mantuvo constante entre tratamientos, a pesar de que su componente más abundante, el 18:1, fuera significativamente mayor en el hígado de los peces alimentados con la dieta carente de AP (29,8% del total de ácidos grasos). En este grupo, las cantidades de derivados del OA, como el 18:2(n-9) y el 20:3(n-9), o del LA, como el 20:3(n-6) fueron más elevadas. Por el contrario, a pesar de que la proporción de 18:3(n-3) fue 6 veces superior, ninguno de sus productos derivados presentaron concentraciones estadísticamente mayores.

Al analizar la composición en ácidos grasos del TLP del hígado de los juveniles de dorada al final de la fase de alimentación (**Tabla 4.3.3**), se observa que la dieta no alteró el nivel total de saturados ni de sus principales componentes, el 16:0 y el 18:0 (alrededor del 20 y del 10%, respectivamente en ambos tratamientos), aunque sí propició la aparición del 19:0 en los animales que no recibieron AGE en el alimento. En éstos peces, fueron más bajos los porcentajes totales de DMA, PUFA, (n-3) HUFA y (n-3), así como la relación (n-3)/(n-6), mientras que el total de MUFA y de (n-6) fueron más altos. Tanto el 18:1(n-9) y sus productos de desaturación y/o elongación, como el 18:2(n-6) y su producto derivado 20:3(n-6), alcanzaron valores significativamente mayores en los peces del lote DD. El 18:3(n-3) y el 20:3(n-3) también fueron más abundantes en éstos ejemplares, mientras que los tres (n-3)

HUFA principales y el ARA, tuvieron un contenido menor, cuatro veces el EPA, cerca de la mitad el DPA y el DHA, y casi un tercio el ARA.

En cuanto a los TG, los peces que recibieron la dieta desbalanceada mostraron porcentajes más bajos de MUFA, (n-3) HUFA y (n-3), y mayores de la serie (n-6), lo que dio lugar a una menor relación (n-3)/(n-6) (**Tabla 4.3.3**). Dentro de los saturados, cuyo total permaneció invariable, destacar la reducción del 14C, y la presencia 9 veces más alta de 19:0 en los peces a los que se suministró la DD. Las cantidades de 18:1(n-9) y 18:2(n-9) también fueron superiores en el grupo DD, aunque, a diferencia de lo sucedido en el TLP, no se detectaron variaciones en el contenido de otros derivados del OA, como el 20:2(n-9). Los individuos que ingirieron la dieta deficiente en HUFA incrementaron 4,5 veces la cantidad de 18:2(n-6) y 18:3(n-3) presente en los TG del hígado con respecto a los del lote DC, también fueron significativamente más altos en los primeros, algunos de sus productos de elongación como el 20:2(n-6) o el 20:3(n-3). Por el contrario, tanto el ARA, como todos los (n-3) HUFA, salvo el mencionado 20:3(n-3), mostraron niveles entre dos y cuatro veces más bajos en TG hepáticos de los juveniles alimentados con la DD.

Tabla 4.3.1. Contenido lipídico y composición en clases lipídicas del hígado de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)

	DC	DD	P
Lípido total (% peso seco)	22,2 ± 2,4	35,5 ± 3,9	<0,001
Clases lipídicas (% lípido total)			
Lisofosfatidilcolina	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	N.S.
Esfingomielina	1,5 ± 0,3	1,3 ± 0,2	N.S.
Fosfatidilcolina	20,7 ± 1,7	24,7 ± 1,3	<0,05
Fosfatidilserina	1,9 ± 0,5	1,8 ± 0,4	N.S.
Fosfatidilinositol	2,3 ± 0,4	2,7 ± 0,4	N.S.
CL/FG	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	N.S.
Fosfatidiletanolamina	11,8 ± 1,8	12,2 ± 2,2	N.S.
No identificados	<u>1,1 ± 0,2</u>	<u>1,0 ± 0,0</u>	
Total lípidos polares	40,1 ± 2,2	44,4 ± 3,8	N.S.
Acilgliceroles parciales	0,9 ± 0,1	2,0 ± 0,2	<0,001
Colesterol	7,0 ± 1,1	5,9 ± 0,8	N.S.
Ácidos grasos libres	4,6 ± 0,2	5,4 ± 0,5	N.S.
Triglicéridos	37,0 ± 3,3	33,2 ± 5,1	N.S.
Ésteres de esteroles	<u>10,4 ± 0,7</u>	<u>9,1 ± 1,5</u>	N.S.
Total lípidos neutros	59,9 ± 2,2	55,6 ± 3,8	N.S.

Valores expresados como media ± DE (n=8 para contenido lipídico y n=3 para composición en clases lipídicas). Cada réplica representa la mezcla de hígado de 6 peces. N.S., no significativamente diferentes; CL, cardiolípin; FG, fosfatidilglicerol.

Tabla 4.3.2. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) del **lípidos total** del hígado de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)

	DC	DD	P
Total ácidos grasos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco órgano)	189,1 \pm 8,2	284,4 \pm 33,2	<0,01
14:0	3,7 \pm 0,2	2,6 \pm 0,2	<0,001
16:0	19,8 \pm 1,2	15,3 \pm 0,7	<0,001
16:1(n-9+n-7)	5,9 \pm 0,3	4,0 \pm 0,3	<0,001
17:0	0,6 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	N.S.
18:0	7,8 \pm 0,3	7,5 \pm 0,8	N.S.
18:1(n-9)	24,9 \pm 2,9	29,8 \pm 1,2	<0,05
18:1(n-7)	3,2 \pm 0,1	2,1 \pm 0,2	<0,001
18:2(n-9)	0,4 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1	<0,001
18:2(n-6)	2,6 \pm 0,2	18,0 \pm 1,3	<0,001
18:3(n-6)	0,1 \pm 0,1	nd	N.S.
19:0	nd	1,8 \pm 0,3	<0,01
18:3(n-3)	0,5 \pm 0,1	3,1 \pm 0,4	<0,001
18:4(n-3)	0,8 \pm 0,1	0,8 \pm 0,2	N.S.
20:1(n-11+n-9)	1,8 \pm 0,2	1,2 \pm 0,1	<0,01
20:2(n-9)	0,4 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1	N.S.
20:3(n-9)	nd	0,4 \pm 0,0	<0,01
20:3(n-6)	nd	0,5 \pm 0,1	<0,05
20:4(n-6)	1,6 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1	<0,001
20:3(n-3)	nd	0,1 \pm 0,1	N.S.
20:4(n-3)	0,6 \pm 0,0	0,3 \pm 0,0	<0,001
20:5(n-3)	6,5 \pm 0,3	1,3 \pm 0,2	<0,001
22:1(n-11+n-9)	1,5 \pm 0,2	1,1 \pm 0,2	N.S.
21:5(n-3)	0,2 \pm 0,0	nd	<0,05
22:5(n-6)	0,1 \pm 0,1	tr	N.S.
22:4(n-3)	0,1 \pm 0,1	nd	N.S.
22:5(n-3)	2,2 \pm 0,3	0,6 \pm 0,1	<0,001
22:6(n-3)	11,9 \pm 1,6	4,8 \pm 0,5	<0,001
No identificados	1,4 \pm 0,4	1,5 \pm 0,2	
Total saturados*	32,4 \pm 1,8	28,2 \pm 1,2	<0,01
Total MUFA	37,2 \pm 3,6	38,3 \pm 1,7	N.S.
Total PUFA**	29,0 \pm 2,4	32,0 \pm 1,6	N.S.
Total (n-6)	4,5 \pm 0,4	19,0 \pm 1,3	<0,001
Total (n-3)	22,9 \pm 2,3	11,0 \pm 0,7	<0,001
(n-3)/(n-6)	5,0 \pm 0,1	0,6 \pm 0,0	<0,001
Total (n-3) HUFA	21,6 \pm 2,1	7,1 \pm 0,7	<0,001

Valores expresados como media \pm DE (n=3 para DC y n=4 para DD). Cada réplica representa la mezcla de hígado de 6 peces. N.S., no significativamente diferentes; nd, no detectado; tr, valor < 0,05%; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados ($\geq C_{20}$ y ≥ 3 dobles enlaces). * incluye 15:0, 20:0 y 22:0; ** incluye 16:2, 16:3 y 16:4.

Tabla 4.3.3. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) del **total de lípidos polares (TLP)** y **triglicéridos (TG)** del hígado de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)

	TLP		TG	
	DC	DD	DC	DD
14:0	1,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1 ¹	4,8 ± 0,1	3,1 ± 0,3 ²
16:0DMA	0,6 ± 0,0	0,3 ± 0,0 ³	nd	nd
16:0	20,8 ± 0,6	20,1 ± 1,6	21,5 ± 0,7	18,3 ± 1,9
16:1(n-9+n-7)	2,1 ± 0,1	1,6 ± 0,1 ²	6,8 ± 0,3	4,1 ± 0,2 ³
17:0	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0 ¹
16:3	nd	nd	0,8 ± 0,0	0,5 ± 0,0 ²
18:0	9,6 ± 0,5	10,1 ± 0,5	7,0 ± 0,1	7,3 ± 1,1
18:1(n-9)	7,8 ± 0,5	15,3 ± 0,9 ³	26,9 ± 1,2	30,0 ± 0,6 ¹
18:1(n-7)	1,7 ± 0,1	1,6 ± 0,1	3,1 ± 0,0	2,0 ± 0,0 ³
18:2(n-9)	nd	0,6 ± 0,0 ²	0,3 ± 0,0	0,7 ± 0,0 ²
18:2(n-6)	1,2 ± 0,1	17,7 ± 0,4 ³	3,6 ± 0,5	16,4 ± 2,7 ²
18:3(n-6)	nd	nd	0,2 ± 0,0	nd ²
19:0	nd	0,5 ± 0,1 ¹	0,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1 ²
18:3(n-3)	0,1 ± 0,1	1,5 ± 0,1 ²	0,7 ± 0,1	3,1 ± 0,7 ²
18:4(n-3)	0,1 ± 0,1	nd	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,0 ¹
20:1(n-11+n-9)	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,2	2,8 ± 0,5	2,1 ± 0,1
20:2(n-9)	nd	0,4 ± 0,1 ¹	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1
20:2(n-6)	0,1 ± 0,1	nd	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,0 ¹
20:3(n-9)	0,1 ± 0,1	0,8 ± 0,0 ²	nd	nd
20:3(n-6)	0,2 ± 0,0	1,2 ± 0,1 ³	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0
20:4(n-6)	2,5 ± 0,1	0,9 ± 0,1 ³	0,4 ± 0,0	0,2 ± 0,0 ³
20:3(n-3)	nd	0,3 ± 0,0 ²	nd	0,2 ± 0,0 ²
20:4(n-3)	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,3 ± 0,0 ²
20:5(n-3)	8,6 ± 0,1	2,2 ± 0,4 ³	3,9 ± 0,2	1,0 ± 0,0 ³
22:1(n-11+n-9)	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,2	2,5 ± 0,6	1,8 ± 0,1
22:4(n-6)	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,1
22:5(n-6)	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0 ²	0,1 ± 0,1	nd
22:5(n-3)	3,4 ± 0,1	1,5 ± 0,2 ³	1,7 ± 0,1	0,6 ± 0,0 ³
22:6(n-3)	33,8 ± 1,8	17,3 ± 1,9 ³	6,3 ± 0,5	3,1 ± 0,0 ³
No identificados	1,7 ± 0,3	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,4
Total saturados*	33,2 ± 1,1	32,9 ± 2,2	34,6 ± 0,6	30,8 ± 3,3
Total MUFA**	12,3 ± 0,5	19,6 ± 1,5 ²	42,5 ± 0,4	40,0 ± 0,6 ¹
Total DMA***	1,5 ± 0,0	0,8 ± 0,1 ³	nd	nd
Total PUFA****	51,2 ± 1,8	45,3 ± 2,6 ¹	21,5 ± 1,2	27,8 ± 3,5
Total (n-6)	4,9 ± 0,1	20,4 ± 0,3 ³	4,7 ± 0,7	17,3 ± 2,8 ²
Total (n-3)	46,3 ± 1,9	23,1 ± 2,4 ³	14,5 ± 0,5	8,9 ± 0,7 ²
(n-3)/(n-6)	9,5 ± 0,6	1,1 ± 0,1 ³	3,1 ± 0,4	0,5 ± 0,0 ²
Total (n-3) HUFA	46,2 ± 1,7	21,6 ± 2,4 ³	12,8 ± 0,4	5,2 ± 0,0 ³

Valores expresados como media ± DE (n=3, excepto para TG DD donde n=2). Cada réplica representa la mezcla de hígado de 6 peces. nd, no detectado; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; DMA, dimetilacetil; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados ($\geq C_{20}$ y ≥ 3 dobles enlaces). Dentro de una misma fila, diferencias significativas entre pares de datos son expresadas como: ¹ P<0,05, ² P<0,01, ³ P<0,001. * incluye 15:0, 20:0 y 22:0; ** incluye 14:1, 15:1 y 24:1; *** incluye 18:0DMA y 18:1(n-9)DMA; **** incluye 16:2 y 16:4.

4.3.3. Perfil lipídico del hematocrito en condiciones control

Durante las dos últimas semanas de alimentación, se tomaron muestras de sangre de peces de ambos grupos experimentales inmediatamente antes de ser sacrificados, separándose las muestras recogidas en hematocrito y plasma sanguíneo, según se ha descrito en el apartado de Material y métodos de la presente memoria.

Los juveniles que fueron alimentados con la DC mostraron un contenido lipídico total en el hematocrito del 4,0% en peso seco. La fracción polar representó un 40,5% del LT y la neutra un 59,5%. Mientras que el 64% del TLP lo constituyó la FC, las proporciones más importantes de los lípidos neutros estuvieron representadas por TG, colesterol y EE con un 42,0, 32,3 y 21,3%, del total, respectivamente (**Tabla 4.3.4**).

Como se refleja en la **Tabla 4.3.5**, los grupos de ácidos grasos más abundantes en el LT del hematocrito de las doradas del grupo control fueron saturados > monoinsaturados > PUFA >> DMA. El 16:0, con un 26,1%, fue el ácido graso mayoritario en las doradas alimentadas con la DC, aunque el 18:0 estuvo también ampliamente representado (10,9%). Los monoinsaturados tuvieron en el 18:1(n-9) a su máximo exponente (21,0%), del que derivaron pequeñas cantidades de 18:2 y 20:2. La aportación de los (n-3) al total de PUFA fue 4,5 veces mayor que la de los (n-6), siendo los más destacados dentro de los primeros, el 22:6(n-3) con un 10,7%, seguido del 20:5(n-3) (6,4%) y del 22:5(n-3) (1,4%), reseñar que el 18:3(n-3) contribuyó mínimamente con un 0,3%. El LA y el ARA fueron los únicos componentes de la serie (n-6) detectados en el LT del hematocrito de los peces DC.

Las **Tablas 4.3.6** y **4.3.7** muestran la composición en ácidos grasos de las diferentes clases lipídicas polares del hematocrito. En la FC, FS y FI, los grupos más importantes fueron saturados, que oscilaron entre el 44,8 y el 48,4%, seguidos de PUFA (del 29,5 al 37,0%) y de MUFA (entre el 11,5 y el 21,9%). Sin embargo, en la FE, los poliinsaturados tuvieron una contribución mayor que los saturados, siendo, además, la única fracción lipídica de las analizadas en la que se detectaron dimetilacetales (3,2%). Dentro de los fosfolípidos, el porcentaje más bajo del total de

(n-6) se obtuvo en la FC y la FS (3,8 y 4,4%, respectivamente), en la FE se elevó hasta el 7,6% y en el FI hasta el 15,2%. El total de (n-3) siguió la pauta marcada por los (n-3) HUFA, que manifestaron su mayor proporción en la FE (37,3%), seguida de la FC (26,9%), la FS (24,0%) y el FI (21,3%). El patrón de distribución de los (n-3) y (n-6) PUFA dio lugar a que se localizara la relación (n-3)/(n-6) más alta en la FC, seguida de la de FS, FE, y finalmente, la de FI.

A pesar de que en todas las clases lipídicas polares estudiadas, los ácidos grasos de 16 y 18 C fueron los más abundantes dentro de los saturados, la proporción entre ambos varió notablemente entre clases lipídicas (**Tabla 4.3.6 y 4.3.7**). Así por ejemplo, sólo en la FC el porcentaje de 16:0 fue mayor que el de 18:0 (33,6% frente a 8,8%). En la FE, FS y FI, el 16:0 representó el 10,2, 14,7 y 6,9% del total de ácidos grasos, mientras que el 18:0 tuvo una presencia más destacada, llegando hasta 17,6, 29,4 y 38,4%, respectivamente. El OA fue el máximo exponente de los MUFA, especialmente en la FC donde superó el 17%, mientras que en las restantes clases lipídicas polares se mantuvo entre el 7,1 y el 9,1%. Sólo en la FC de los peces control, se detectó la presencia de 18:2(n-9) procedente del OA, mientras que otro de sus derivados, el 20:2(n-9), estuvo presente en todos los fosfolípidos menos en el FI. Las diferencias registradas entre clases lipídicas en la serie (n-6) se debieron mayormente al patrón de abundancia del ARA, ya que el LA se mantuvo en todas ellas entre el 1,6 y el 2,6%. Así, los niveles más bajos de ARA se registraron en la FC y la FS (en torno al 1,4%), este valor se incrementó en la FE hasta el 4,5% y en el FI hasta el 13,1%. El 18:3(n-6) y el 20:3(n-6), procedentes del LA, estuvieron presentes en la FC y en el FI, de igual manera que otros (n-6) de 22C fueron detectados en todas las clases lipídicas polares estudiadas, a excepción del 22:5 en el FI. La contribución del 18:3 al total de la serie (n-3) no superó el 0,5% en ninguna de las clases lipídicas polares. Las diferencias de concentración de los tres principales (n-3) HUFA fueron notorias, así por ejemplo, el EPA se ajustó al patrón de relevancia FI (16,0%) > FE (11,7%) > FC (9,8%) > FS (3,0%), mientras que el DPA y DHA siguieron este otro, FE (3,0; 22,0%) > FS (2,2; 18,2%) > FC (1,4; 15,3%) > FI (0,8; 4,1%).

Los TG del hematocrito de los peces alimentados con la DC mostraron un perfil de ácidos grasos totalmente diferente al de las clases lipídicas polares (**Tabla 4.3.7**). El porcentaje total de MUFA se aproximó al 50%, valor entre 2,2 y 4,2 veces más

elevado que en cualquiera de los fosfolípidos, el siguiente grupo en importancia fue el de los saturados (37,4%), sólo mayor que en la FE y, por último, el de los PUFA (12%), entre 2,5 y 3,8 veces más bajo que en las fracciones polares. Individualmente, el componente más importante de los saturados en los TG fue el 16:0, con el 23,4% del total de ácidos grasos, valor sólo superado por el obtenido en la FC, mientras que el 18:0 mostró el nivel más bajo de todas las clases lipídicas analizadas (7,4%). Dentro de los saturados, el 4,9% de 14:0 en los TG fue de 4 a 8 veces más elevado que en el resto de clases lipídicas del hematocrito. Todos los MUFA fueron más abundantes en los TG, destacando el 30,6% de 18:1(n-9) y el 7,5% de 16:1, también el 20:1 y el 22:1 estuvieron representados de manera importante (3,1 y 2,8%, respectivamente). El 18:2(n-6) alcanzó el porcentaje más alto de todas las clases lipídicas (3,4%), mientras que la cantidad de ARA fue testimonial (0,3%). También se detectaron en los TG, productos derivados del OA, como el 18:2(n-9) y 20:2(n-9), o del LA como el 18:3 y 20:2. Tanto el contenido total de (n-3) HUFA (5,4%), como el de sus componentes principales, mostraron el nivel más bajo en la clase lipídica neutra. Así, el DHA representó un 2,5%, el EPA un 1,8% y el DPA un 0,8%, valores que para el DHA y el EPA llegan a ser hasta cerca de 10 veces más bajos que los encontrados en FE y FI, respectivamente.

4.3.4. Efecto de la deficiencia dietaria de HUFA en el hematocrito

La composición lipídica dietaria no afectó al contenido de LT del hematocrito, que se mantuvo en un 4% en peso seco, ni a la proporción total de lípidos polares y neutros. La distribución de clases lipídicas individuales apenas resultó modificada por la fórmula dietaria, ya que sólo se detectaron diferencias significativas entre tratamientos en el porcentaje de FI (3,0 y 3,6% del LT, en individuos alimentados con la dieta sin o con AP, respectivamente) y de EE, que también fueron más bajos en los ejemplares DD (**Tabla 4.3.4**).

La **Tabla 4.3.5** muestra que el total de saturados, MUFA y DMA presentes en el LT del hematocrito no se vio afectado por el perfil de ácidos grasos del alimento. Sin embargo, el total de PUFA creció significativamente hasta el 30,1% en los individuos que ingirieron la dieta deficiente en HUFA. Este incremento fue debido a que los (n-6) cuadruplicaron su presencia en estos peces, mientras que los (n-3) experimentaron

una reducción del 42%. Estas variaciones debidas a la dieta, afectaron, lógicamente, a la relación (n-3)/(n-6), que se redujo hasta 0,6 desde el valor de 4,5 obtenido en los juveniles del grupo control. El total de saturados se mantuvo invariable entre tratamientos, a pesar de que los $\leq C17$ fueron más bajos en los ejemplares que recibieron la dieta deficiente. Mientras que el 18:1(n-9) incrementó su porcentaje en los ejemplares del grupo DD, el 18:1(n-7) y los 16:1 lo disminuyeron. La proporción de 18:2(n-6) se vió incrementada más de 6 veces, mientras que la de 20:4(n-6), se redujo a la mitad. Todos los compuestos resultantes de la elongación y/o desaturación de 18:1(n-9) y 18:2(n-6) alcanzaron porcentajes mayores en las doradas que recibieron el pienso sin AP. Nuevamente, a pesar de que el 18:3(n-3) mostró un valor 6 veces mayor en este grupo, las concentraciones de sus productos derivados no resultaron modificadas. El total de (n-3) HUFA fue un 50% más bajo en el LT del hematocrito de los peces DD, de igual manera que también fueron menores los porcentajes individuales de sus tres componentes principales, aunque a niveles de significación diferentes ($P < 0,01$ para el DHA y $P < 0,001$ para EPA y DPA).

La FC del hematocrito de los individuos del grupo DD (**Tabla 4.3.6**), presentó un porcentaje menor de saturados, (n-3) HUFA y (n-3), y superior de (n-6) que la de los pertenecientes al grupo DC y, como consecuencia, la relación (n-3)/(n-6), fue unas 14 veces más baja en los primeros (0,5 vs. 7,1). El resto de las familias de ácidos grasos permanecieron invariables. De manera individualizada, en los ejemplares que ingirieron la DD, se detectaron cantidades de 18:1(n-9) superiores a las del grupo DC. También el 18:2(n-6) y compuestos derivados como el 20:2(n-6) y 20:3(n-6) fueron estadísticamente más altos en los peces a los que se suministró la dieta sin AP, mientras que el ARA mostró un valor 5 veces más pequeño. A pesar de que el 18:3(n-3) fue 14 veces más abundante en este lote experimental, no se detectó cantidad alguna de sus productos de elongación y/o desaturación. Los principales (n-3) HUFA presentaron concentraciones más reducidas en el lote DD, siendo menor el nivel de significación para el DHA (7,8 vs. 15,3%, $P < 0,05$), que para el EPA (1,7 vs. 9,8%, $P < 0,001$) y el DPA (0,7 vs. 1,4%, $P < 0,001$).

Las tendencias encontradas en la FE fueron las mismas que en la FC, aunque las diferencias entre los distintos grupos de ácidos grasos fueron menos acusadas (**Tabla 4.3.6**). Se registraron diferencias significativas en el total de (n-6) (18,6 frente a 7,6%),

total de (n-3) (29,6 frente a 37,7%), en la proporción (n-3)/(n-6) (1,6 y 5,0) y en el total de (n-3) HUFA (28,5 y 37,3%), correspondiéndose las parejas de datos reseñadas con los tratamientos deficiente en HUFA y control, respectivamente. Los ácidos grasos 18:1(n-9) y 20:2(n-9) fueron más abundantes en los peces que recibieron la DD. También resultó más alta en estos peces, la proporción de 18:2(n-6) y sus derivados 20C de 2 y 3 insaturaciones, mientras que el 20:4(n-6) representó menos de la mitad que en los peces que recibieron la DC. Tanto el 18:3(n-3) como el 20:3(n-3) fueron significativamente mayores en la FE del hematocrito de las doradas alimentadas con la DD. De los (n-3) HUFA más importantes, el contenido de DHA se mantuvo invariable entre tratamientos, mientras que el 22:5(n-3) y el EPA disminuyeron en el lote DD (2,1% frente a 3,0% y 5,6% frente a 11,7%, respectivamente).

El total de ácidos grasos de la serie (n-6) en la FS del hematocrito de los individuos a los que se suministró la DD, fue doble que en aquellos que recibieron la DC (8,7 y 4,4%, respectivamente), mientras que la relación (n-3)/(n-6) se redujo a la mitad, al no sufrir modificaciones el total de (n-3) HUFA, ni, en consecuencia, el de (n-3). A pesar de que la proporción de 18:1(n-9), el más abundante de los MUFA en esta clase lipídica, no varió entre tratamientos, la cantidad detectada de 20:2(n-9) fue superior en el lote con escaso aporte dietario de AGE. Las diferencias observadas en la serie (n-6) fueron debidas al incremento experimentado por el 18:2(n-6) y algunos de sus productos derivados, como el 20:2, el 20:3, e incluso el 22:4 en los peces DD, ya que el 20:4(n-6) se redujo a la mitad. Dentro de los (n-3), el 18:3 y el 20:3 fueron más abundantes en los individuos pertenecientes al lote deficiente en HUFA, el 20:5 la mitad, y los C22 no mostraron diferencias significativas entre los dos grupos experimentales (**Tabla 4.3.7**).

En el FI se repitieron, en general, las variaciones observadas en la FS (**Tabla 4.3.7**). Las únicas diferencias entre tratamientos fueron registradas en el total de (n-6), que representó el 18,4% de los ácidos grasos en los individuos del grupo DD, y el 15,2% en los pertenecientes al grupo DC, y en la proporción (n-3)/(n-6) que fue de 1,1 y 1,4, respectivamente. Tanto el LA como sus derivados 20C de 2 y 3 insaturaciones fueron más abundantes en el conjunto de células sanguíneas de los peces a los que se suministró la DD, mientras que, a diferencia de lo sucedido en el resto de clases

lipídicas, el 20:4(n-6) se mantuvo constante entre tratamientos. A pesar de que el 18:1(n-9) y el 18:3(n-3) no modificaron su proporción en los lotes experimentales, productos derivados de los mismos, tales como 20:2(n-9) y 20:3(n-3), presentaron porcentajes más altos en los juveniles que habían sido alimentados con el pienso deficiente en AGE. Ni EPA ni DHA variaron sus concentraciones entre lotes experimentales, sólo detectándose diferencias significativas dentro de los (n-3) HUFA, en la presencia de 22:5, que fue menor en los individuos que ingirieron la DD.

El perfil de ácidos grasos de los TG del hematocrito resultó más afectado por los cambios en la composición lipídica del alimento que las clases lipídicas polares (**Tabla 4.3.7**). Así, los individuos del grupo DD presentaron un contenido más reducido de saturados (31,2%), menor proporción (n-3)/(n-6) (0,5) y un nivel más alto del total de PUFA (22,0%) y de (n-6) (13,9%) que los pertenecientes al grupo DC (37,4%, 1,6, 12,0% y 4,0%, respectivamente). A pesar de que el 16:1 disminuyó un 14,5% en los ejemplares DD, el total de MUFA no varió entre tratamientos, ya que el 18:1(n-9), componente mayoritario en los TG, se mantuvo en porcentajes ligeramente superiores al 30% en ambos lotes de peces. Todos los saturados $\leq 17C$ mostraron un porcentaje más bajo en los juveniles DD. En los TG del hematocrito de estos peces, el 18:2(n-6) y el 20:2(n-6) fueron más altos, mientras que, por el contrario, la presencia de 20:4(n-6) fue menor. A pesar de que el 18:3(n-3) se acumuló por encima de 4 veces en los juveniles del lote DD, ninguno de sus derivados presentó diferencias significativas con respecto al control. Los (n-3) HUFA, que mantuvieron constante su proporción total, mostraron variaciones estadísticas en varios de sus componentes, como 20:5(n-3) y 22:5(n-3), que fueron la mitad de abundantes en los peces a los que se suministró la dieta sin AP, mientras que 20:4(n-3) y 22:6(n-3) permanecieron estables.

Tabla 4.3.4. Contenido lipídico y composición en clases lipídicas del hematocrito de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)

	DC	DD	P
Lípido total (% peso seco)	4,0 ± 0,8	4,0 ± 0,7	N.S.
Clases lipídicas (% lípido total)			
Lisofosfatidilcolina	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	N.S.
Esfingomielina	2,9 ± 0,4	2,0 ± 0,6	N.S.
Fosfatidilcolina	25,9 ± 1,7	27,6 ± 1,6	N.S.
Fosfatidilserina	2,6 ± 0,4	2,9 ± 0,6	N.S.
Fosfatidilinositol	3,6 ± 0,2	3,0 ± 0,2	<0,05
CL/FG	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,2	N.S.
Fosfatidiletanolamina	4,4 ± 0,6	4,6 ± 0,6	N.S.
No identificados	<u>0,2 ± 0,1</u>	<u>0,4 ± 0,2</u>	
Total lípidos polares	40,5 ± 2,2	41,6 ± 1,4	N.S.
Acilgliceroles parciales	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,0	N.S.
Colesterol	19,2 ± 3,2	20,0 ± 2,0	N.S.
Ácidos grasos libres	1,7 ± 0,2	2,0 ± 0,2	N.S.
Triglicéridos	25,0 ± 6,4	27,4 ± 2,2	N.S.
Ésteres de esteroles	<u>12,7 ± 1,9</u>	<u>8,1 ± 1,1</u>	<0,05
Total lípidos neutros	59,5 ± 2,2	58,4 ± 1,4	N.S.

Valores expresados como media ± DE (n=4 para contenido lipídico y n=3 para composición en clases lipídicas). Cada réplica representa la mezcla de hematocrito de 10 peces. N.S., no significativamente diferentes; CL, cardiolipín; FG, fosfatidilglicerol.

Tabla 4.3.5. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) del **lípidos total** del hematocrito de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)

	DC	DD	P
Total ácidos grasos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco células)	30,6 \pm 5,2	28,6 \pm 5,4	N.S.
14:0	2,9 \pm 0,6	2,1 \pm 0,2	<0,05
15:0	0,4 \pm 0,0	0,3 \pm 0,1	<0,05
16:0	26,1 \pm 1,8	21,7 \pm 1,5	<0,05
16:1(n-9+n-7+n-5)	4,8 \pm 0,8	3,5 \pm 0,4	<0,05
17:0	0,7 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0	<0,001
18:0	10,9 \pm 1,8	10,6 \pm 1,3	N.S.
18:1(n-9)	21,0 \pm 0,9	23,5 \pm 0,5	<0,01
18:1(n-7)	2,8 \pm 0,2	2,0 \pm 0,1	<0,001
18:2(n-9)	0,2 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0	<0,001
18:2(n-6)	2,7 \pm 0,5	16,7 \pm 1,1	<0,001
18:3(n-3)	0,3 \pm 0,1	1,8 \pm 0,3	<0,001
18:4(n-3)	0,5 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	N.S.
20:1(n-11+n-9)	1,9 \pm 0,4	1,8 \pm 0,2	N.S.
20:2(n-9)	0,2 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	<0,05
20:3(n-9)	nd	0,4 \pm 0,0	<0,01
20:3(n-6)	nd	0,4 \pm 0,1	<0,05
20:4(n-6)	1,5 \pm 0,2	0,7 \pm 0,1	<0,001
20:3(n-3)	nd	0,1 \pm 0,1	N.S.
20:4(n-3)	0,3 \pm 0,0	0,2 \pm 0,1	N.S.
20:5(n-3)	6,4 \pm 0,4	1,8 \pm 0,4	<0,001
22:1(n-11+n-9)	1,7 \pm 0,4	1,7 \pm 0,2	N.S.
22:5(n-3)	1,4 \pm 0,1	0,6 \pm 0,2	<0,001
22:6(n-3)	10,7 \pm 0,4	6,4 \pm 1,6	<0,01
No identificados	1,5 \pm 0,1	1,3 \pm 0,3	
Total saturados*	41,3 \pm 3,0	35,9 \pm 2,8	N.S.
Total MUFA	32,1 \pm 2,9	32,6 \pm 1,2	N.S.
Total DMA**	0,4 \pm 0,3	0,1 \pm 0,1	N.S.
Total PUFA***	24,7 \pm 0,7	30,1 \pm 3,4	<0,05
Total (n-6)	4,3 \pm 0,3	17,7 \pm 1,2	<0,001
Total (n-3)	19,5 \pm 0,6	11,3 \pm 2,5	<0,01
(n-3)/(n-6)	4,5 \pm 0,4	0,6 \pm 0,1	<0,001
Total (n-3) HUFA	18,7 \pm 0,7	9,2 \pm 2,1	<0,001

Valores expresados como media \pm DE (n=3 para DC y n=4 para DD). Cada réplica representa la mezcla de hematocrito de 10 peces. N.S., no significativamente diferentes; nd, no detectado; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; DMA, dimetilacetil; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados ($\geq C_{20}$ y ≥ 3 dobles enlaces). * incluye 19:0 y 20:0; ** incluye 16:0DMA, 18:0DMA y 18:1DMA; *** incluye 16:2, 16:3 y 16:4.

Tabla 4.3.6. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de la fosfatidilcolina (FC) y fosfatidiletanolamina (FE) del hematocrito de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)

	FC		FE	
	DC	DD	DC	DD
14:0	1,2 ± 0,1	0,7 ± 0,0 ³	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,2
16:0DMA	nd	nd	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,1
16:0	33,6 ± 0,5	26,5 ± 1,4 ²	10,2 ± 1,0	8,4 ± 1,6
16:1(n-9+n-7)	2,1 ± 0,2	1,3 ± 0,1 ³	1,6 ± 0,3	0,9 ± 0,2 ²
17:0	0,7 ± 0,0	0,5 ± 0,0 ³	0,7 ± 0,0	0,5 ± 0,0 ²
18:0DMA	nd	nd	1,3 ± 0,3	1,2 ± 0,3
18:1(n-9+n-7)DMA	nd	nd	1,0 ± 0,3	0,8 ± 0,2
18:0	8,8 ± 0,6	10,2 ± 1,0	17,6 ± 1,3	17,2 ± 1,8
18:1(n-9)	17,1 ± 1,5	20,0 ± 0,2 ¹	8,4 ± 0,5	11,2 ± 1,1 ¹
18:1(n-7)	1,8 ± 0,2	0,9 ± 0,2 ²	2,6 ± 0,0	2,5 ± 0,2
18:2(n-9)	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	nd	0,2 ± 0,1
18:2(n-6)	1,6 ± 0,4	22,0 ± 1,0 ³	2,6 ± 0,3	14,4 ± 0,9 ³
18:3(n-6)	0,1 ± 0,0	nd	nd	nd
18:3(n-3)	0,1 ± 0,1	1,4 ± 0,2 ³	0,2 ± 0,2	1,1 ± 0,2 ²
18:4(n-3)	nd	nd	0,2 ± 0,2	nd
20:1(n-11+n-9)	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,3
20:2(n-9)	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,0 ¹
20:2(n-6)	nd	0,4 ± 0,0 ¹	nd	0,7 ± 0,1 ²
20:3(n-6)	0,2 ± 0,0	0,6 ± 0,1 ³	nd	0,7 ± 0,1 ¹
20:4(n-6)	1,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1 ³	4,5 ± 0,2	2,1 ± 0,2 ²
20:3(n-3)	nd	nd	nd	0,7 ± 0,0 ²
20:4(n-3)	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,1
20:5(n-3)	9,8 ± 1,2	1,7 ± 0,4 ³	11,7 ± 0,7	5,6 ± 0,8 ³
22:1(n-11+n-9)	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,3
22:4(n-6)	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,0
22:5(n-6)	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0
22:5(n-3)	1,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1 ³	3,0 ± 0,1	2,1 ± 0,3 ²
22:6(n-3)	15,3 ± 2,4	7,8 ± 1,6 ¹	22,0 ± 1,2	19,5 ± 2,0
No identificados	1,7 ± 0,4	2,1 ± 0,6	5,0 ± 1,3	2,6 ± 0,8
Total saturados*	44,8 ± 1,1	38,9 ± 2,2 ¹	30,6 ± 1,1	27,9 ± 3,5
Total MUFA**	21,9 ± 1,8	23,0 ± 0,7	15,3 ± 0,9	17,7 ± 2,1
Total DMA	nd	nd	3,2 ± 0,8	2,6 ± 0,7
Total PUFA***	31,6 ± 3,4	36,0 ± 3,1	45,9 ± 2,3	49,2 ± 4,0
Total (n-6)	3,8 ± 0,2	23,4 ± 1,1 ³	7,6 ± 0,2	18,6 ± 1,1 ³
Total (n-3)	27,0 ± 3,7	11,9 ± 2,4 ²	37,7 ± 2,2	29,6 ± 3,0 ¹
(n-3)/(n-6)	7,1 ± 1,3	0,5 ± 0,1 ³	5,0 ± 0,2	1,6 ± 0,1 ³
Total (n-3) HUFA	26,9 ± 3,6	10,5 ± 2,3 ²	37,3 ± 1,8	28,5 ± 3,1 ¹

Valores expresados como media ± DE (n=3). Cada réplica representa la mezcla de hematocrito de 10 peces. nd, no detectado; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; DMA, dimetilacetil; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados ($\geq C_{20}$ y ≥ 3 dobles enlaces). Dentro de una misma fila, diferencias significativas entre pares de datos son expresadas como: ¹ P<0,05, ² P<0,01, ³ P<0,001. * incluye 15:0, 19:0 y 20:0; ** incluye 15:1 y 24:1; *** incluye 16:2 y 16:3.

Tabla 4.3.7. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de la fosfatidilserina (FS), fosfatidilinositol (FI) y triglicéridos (TG) del hematocrito de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)

	FS		FI		TG	
	DC	DD	DC	DD	DC	DD
14:0	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	4,9 ± 0,3	3,7 ± 0,4 ¹
15:0	1,0 ± 0,3	0,8 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,0 ¹
16:0	14,7 ± 1,0	10,9 ± 2,7	6,9 ± 0,6	5,7 ± 1,2	23,4 ± 1,5	20,0 ± 1,1 ¹
16:1(n-9+n-7)	1,6 ± 0,3	1,1 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,3	7,5 ± 0,4	5,7 ± 0,6 ²
17:0	1,0 ± 0,0	0,7 ± 0,1 ¹	0,8 ± 0,0	0,6 ± 0,0 ³	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,0 ²
16:3	0,2 ± 0,2	nd	0,1 ± 0,1	tr	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,0 ¹
18:0	29,4 ± 0,8	30,3 ± 1,4	38,4 ± 1,5	38,0 ± 0,2	7,4 ± 1,3	5,8 ± 0,5
18:1(n-9)	9,1 ± 1,1	9,9 ± 1,9	7,1 ± 0,4	8,7 ± 1,0	30,6 ± 2,8	30,8 ± 0,7
18:1(n-7)	2,5 ± 0,2	1,7 ± 0,2 ²	1,8 ± 0,1	1,3 ± 0,1 ²	3,7 ± 0,4	2,5 ± 0,2 ²
18:2(n-9)	nd	nd	nd	nd	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1
18:2(n-6)	2,3 ± 0,2	5,9 ± 0,6 ³	1,7 ± 0,1	5,2 ± 0,6 ³	3,4 ± 0,5	13,2 ± 1,4 ³
18:3(n-6)	nd	nd	0,1 ± 0,1	nd	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0
18:3(n-3)	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1 ¹	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,2	2,3 ± 0,4 ²
18:4(n-3)	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1
20:0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
20:1(n-11+n-9)	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,2	3,1 ± 0,6	3,0 ± 0,4
20:2(n-9)	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,0 ¹	nd	0,2 ± 0,0 ²	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,1
20:2(n-6)	nd	0,5 ± 0,0 ²	nd	0,2 ± 0,0 ¹	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,0 ¹
20:3(n-6)	nd	0,4 ± 0,1	tr	1,1 ± 0,2 ³	nd	0,1 ± 0,1
20:4(n-6)	1,3 ± 0,3	0,7 ± 0,2 ¹	13,1 ± 0,5	11,9 ± 0,9	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0 ¹
20:3(n-3)	nd	0,4 ± 0,1 ¹	nd	0,1 ± 0,0 ²	nd	nd
20:4(n-3)	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
20:5(n-3)	3,0 ± 0,4	1,5 ± 0,4 ¹	16,0 ± 0,9	15,1 ± 2,5	1,8 ± 0,4	0,9 ± 0,2 ¹
22:1(n-11+n-9)	2,1 ± 0,2	2,0 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,2	2,8 ± 0,6	3,0 ± 0,4
22:4(n-6)	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,1 ¹	0,2 ± 0,1	nd	nd	nd
22:5(n-6)	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,2	nd	nd	nd	nd
22:5(n-3)	2,2 ± 0,5	1,6 ± 0,4	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1 ¹	0,8 ± 0,1	0,4 ± 0,1 ¹
22:6(n-3)	18,2 ± 2,7	20,4 ± 4,7	4,1 ± 0,6	3,2 ± 0,4	2,5 ± 0,7	2,2 ± 0,5
No identificados	4,9 ± 0,3	4,4 ± 1,0	3,8 ± 0,8	3,0 ± 0,4	2,3 ± 0,6	1,3 ± 0,3
Total saturados*	48,4 ± 2,1	44,8 ± 4,7	47,7 ± 1,8	46,0 ± 1,4	37,4 ± 2,6	31,2 ± 1,6 ¹
Total MUFA**	17,2 ± 1,6	16,6 ± 2,7	11,5 ± 1,1	12,7 ± 1,9	48,3 ± 2,4	45,5 ± 1,5
Total PUFA***	29,5 ± 3,8	34,3 ± 6,1	37,0 ± 1,9	38,4 ± 3,5	12,0 ± 2,0	22,0 ± 2,9 ²
Total (n-6)	4,4 ± 0,2	8,7 ± 0,5 ³	15,2 ± 0,3	18,4 ± 1,0 ²	4,0 ± 0,5	13,9 ± 1,5 ³
Total (n-3)	24,8 ± 3,8	25,3 ± 5,7	21,7 ± 1,6	19,8 ± 2,8	6,3 ± 1,7	6,6 ± 1,5
(n-3)/(n-6)	5,6 ± 0,7	2,9 ± 0,8 ¹	1,4 ± 0,1	1,1 ± 0,1 ¹	1,6 ± 0,6	0,5 ± 0,1 ²
Total (n-3) HUFA	24,0 ± 3,5	24,3 ± 5,9	21,3 ± 1,4	19,1 ± 3,0	5,4 ± 1,5	3,8 ± 1,1

Valores expresados como media ± DE (n=3). Cada réplica representa la mezcla de hematocrito de 10 peces. nd, no detectado; tr, valor <0,05%; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados (≥C₂₀ y ≥3 dobles enlaces). Dentro de una misma fila, diferencias significativas entre pares de datos son expresadas como: ¹ P<0,05, ² P<0,01, ³ P<0,001. * incluye 19:0; ** incluye 14:1, 15:1 y 24:1; *** incluye 16:2 y 16:4.

4.3.5. Perfil lipídico del cerebro en condiciones control

El 42,4% del peso seco del cerebro de los peces a los que se suministró la dieta que contenía AP fueron lípidos, de los que el 58,7% fueron polares y el 41,3% neutros. La FE y la FC, que se desarrolló conjuntamente con la esfingomielina en la placa de HPTLC, fueron las principales representantes de los LP, mientras que los TG y el colesterol aglutinaron el 50 y el 40% de la fracción lipídica neutra, respectivamente (**Tabla 4.3.8**).

El LT del cerebro de los peces que recibieron la DC mostró niveles próximos al 30% de saturados, MUFA y PUFA. El resto de ácidos grasos fueron DMA (7,0%), destacando en este grupo los de 18C. El porcentaje de 16:0 y 18:0 fue similar (15,3 y 11,3%, respectivamente), siendo también destacable la presencia de un 0,7% de 22:0 y, sobre todo, de un 3,3% de 24:0. Los MUFA de 16 y 18C fueron los más abundantes del grupo al representar el 4,5 y el 22,8%, respectivamente. Cerca del 90% de los PUFA pertenecían a la familia (n-3), siendo sus componentes más relevantes el 22:5 (1,1%), el 20:5 (3,7%) y el 22:6 (19,5%), mientras que el 18:3 contribuyó únicamente con un 0,1%. Por lo que respecta a los (n-6), LA y ARA, con un 1,8 y un 1,5%, respectivamente, aglutinaron la totalidad de la serie (**Tabla 4.3.9**).

Las diferencias en el perfil de ácidos grasos de los distintos fosfolípidos del cerebro fueron evidentes (**Tablas 4.3.10 y 4.3.11**). La FC estuvo constituida en orden decreciente por saturados, MUFA y PUFA, en la FE, fueron los PUFA los más abundantes, seguidos de MUFA, saturados y DMA en proporciones muy similares, mientras que en la FS y el FI, los PUFA, representaron cerca de la mitad de los ácidos grasos, y a continuación saturados y monoinsaturados. Hay que resaltar la presencia de un 19% de DMA en la FE de los ejemplares control, no siendo detectados en ninguna otra de las clases lipídicas polares. El porcentaje total de (n-6) no llegó al 3% en la FC, FE y FS, mientras que en el FI superó ligeramente el 14%. Finalmente, el contenido más elevado de (n-3) HUFA total, y por tanto, de (n-3) total, se manifestó en la FS (43,7%), seguido de la FE y FI (33,5%), y, por último, de la FC (21,2%).

La proporción entre los dos ácidos grasos saturados más abundantes en todas las clases lipídicas polares del cerebro de las doradas que fueron alimentadas con la

DC, el 16:0 y el 18:0, varió ampliamente entre ellas. Así por ejemplo, en la FC, el contenido de 16:0 fue 3,7 veces mayor que el de 18:0, en la FE y el FI, el 18:0 prácticamente dobló al 16:0 y en la FS fue 10 veces superior. También destaca dentro de los saturados, la considerable proporción de compuestos de 22 y 24 átomos de carbono presente en la FC (0,7 y 3,5%, respectivamente). En cuanto a los MUFA, la FC acumuló las cantidades más relevantes de 18:1(n-9) (23,9%), valor 1,3 veces superior al de la FE, doble del de FS y 2,8 veces el de FI. El 22:1 y 24:1 (0,6 y 2,1%, respectivamente) también fueron superiores en la FC. El 20:4(n-6) se acumuló notablemente en el FI (12,5%), porcentaje más de 10 veces superior al de FC y FS, y unas 6 veces mayor que el de la FE. También el 18:2(n-6) se concentró en mayor proporción en el FI (1,4%) frente a valores entre 0,5 y 0,8% presentes en el resto de fosfolípidos. En todas las clases lipídicas polares se detectaron productos derivados del OA como el 18:2(n-9) y el 20:2(n-9), mientras que los del LA fueron menos frecuentes, apareciendo pequeñas cantidades de 20:3(n-6) en la FC, FS y FI. Por lo que respecta a los (n-3), destacar que el 18:3(n-3) sólo fue detectado en la FE, y que la distribución de los dos (n-3) HUFA principales siguió tendencias opuestas en las distintas fracciones lipídicas polares. El 20:5(n-3) representó cerca del 40% del total de (n-3) HUFA en el FI, el 14% en la FC, poco más del 10% en la FE, y únicamente el 3% en la FS, mientras que el 22:6(n-3), supuso un 57% en el FI, entre el 82 y el 85% en la FC y FE, y alrededor del 92% en la FS. El 22:5(n-3) se aproximó al 3% del total de (n-3) HUFA en la FC y se mantuvo entre un 4,2 y un 4,5% en el resto de fosfolípidos, llegando incluso a superar al 20:5(n-3) en la FS (**Tablas 4.3.10 y 4.3.11**).

Los TG mostraron niveles más bajos de saturados en las doradas del grupo DC que los presentes en la FC, FS y FI, y superiores a los de la FE, destacando a nivel individual, el 4,5% de 14:0, y la alta relación 16:0/18:0, que superó incluso, a la encontrada en la FC (**Tablas 4.3.10 y 4.3.11**). El total de MUFA fue 2-3 veces mayor en la clase lipídica neutra que en la FE, FS y FI, y ligeramente superior que en la FC. Individualmente, todos los integrantes del grupo mostraron proporciones superiores en los TG, a excepción del 18:1(n-9) en la FC y del 24:1, que únicamente no fue detectado en la fracción neutra. El contenido total de PUFA en los TG fue similar al de la FC y menor que en el resto de las muestras polares. El sumatorio de (n-6) superó entre 2,4 y 3,3 veces al de la FC, FE y FS, y constituyó algo menos de la mitad del

presente en el FI. El 5% de 18:2(n-6) registrado en los TG, fue más de 4 veces superior a su porcentaje en las clases lipídicas polares, mientras que la proporción de 20:4(n-6) fue similar a la de FC y FS, mitad que la de FE, y 12,5 veces menor que la de FI. Tanto el 18:3(n-6) como el 20:2(n-6) fueron detectados exclusivamente en los TG, mientras que en los productos derivados del 18:1(n-9), no se registraron variaciones importantes. El 18:3(n-3), que estuvo ausente o mínimamente representado en las clases lipídicas polares, alcanzó valores de 0,8% en los TG. La presencia de EPA en los juveniles que recibieron la DC fue superior a la de FC, FE y FS, y menos de la mitad de la del FI. El nivel de DHA en los TG fue el más bajo de todas las clases lipídicas analizadas, representando cerca de la mitad que en la FC y FI, casi una tercera parte que en la FE, y una cuarta parte que en la FS. Este perfil individual dio lugar a un total de (n-3) HUFA ligeramente inferior al de FC, y entre 1,9 y 2,5 veces más pequeño que el del resto de clases lipídicas polares.

4.3.6. Efecto de la deficiencia dietaria de HUFA en el cerebro

La deficiencia de HUFA en la dieta no alteró el contenido lipídico presente en el cerebro de los peces, aunque incrementó la proporción total de LP (65,8 vs. 58,7), y los porcentajes de lisofosfatidilcolina y de esfingomielina/FC, que se desarrollaron conjuntamente. En los lípidos neutros de los peces DD disminuyeron los TG (**Tabla 4.3.8**).

El total de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y ácidos grasos en la forma DMA presentes en el LT del cerebro, no resultaron afectados por la composición lipídica de la dieta (**Tabla 4.3.9**). Sólo la relación (n-3)/(n-6) fue significativamente más baja en los juveniles alimentados con la DD que en el de los que recibieron la DC (5,4 y 7,8, respectivamente). Sin embargo, alcanzaron mayor relevancia, el total de PUFA y de (n-6), así como, sorprendentemente, el total de (n-3) HUFA y de (n-3). Aunque la concentración de 18:1(n-9) se mantuvo invariable en ambos lotes de peces, los ejemplares alimentados con la dieta deficiente en HUFA presentaron un nivel de 18:2(n-9) significativamente mayor. Tanto el 18:2(n-6) como el 18:3(n-3) mostraron concentraciones más elevadas en los ejemplares a los que se suministró la DD, aunque, de entre sus derivados, sólo el 20:3(n-6) fue estadísticamente más alto. Por el contrario, el contenido de 20:4(n-6) fue menor en los juveniles que ingirieron la dieta

sin AP. El 22:6(n-3) constituyó más de las tres cuartas partes del total de los (n-3) HUFA en ambos grupos de peces, siendo mayor en los peces DD.

Los resultados que aparecen en las **Tablas 4.3.10 y 4.3.11** muestran que el perfil de ácidos grasos de los fosfolípidos del cerebro resultó escasamente afectado por la composición lipídica de la dieta, que influyó de forma más notoria en la clase lipídica neutra. Como se observa en la **Tabla 4.3.10**, la FC de los juveniles del grupo DD, presentó, en comparación con la del grupo DC, contenidos más bajos de (n-3) HUFA y (n-3) total (19,6 frente a 21,2%), menor relación (n-3)/(n-6) (5,3 y 10,6, respectivamente) y un porcentaje superior de (n-6) (3,7 vs. 2,0%). A pesar de que el nivel de 18:1(n-9) no varió entre tratamientos, el 18:2(n-9) fue significativamente más alto en los ejemplares a los que se suministró la DD. También más abundantes en estos peces el 18:2(n-6) y el 20:3(n-6), mientras que el 20:4(n-6) disminuyó estadísticamente. Con respecto a los (n-3), señalar la ausencia de LNA y que, dentro de los (n-3) HUFA, el EPA y el DHA fueron menos abundantes en el grupo deficiente en AGE, para niveles de significación de $P < 0,01$ y $P < 0,05$, respectivamente.

La composición en ácidos grasos de la FE del cerebro apenas resultó afectada por la fórmula dietaria, no existiendo diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los totales de ácidos grasos. Individualmente, sólo modificaron su contenido, el 18:2(n-6), que en las doradas DD prácticamente dobló el valor alcanzado en las DC, y el 20:4(n-6) y 22:5(n-3), que fueron más bajos en los primeros (**Tabla 4.3.10**).

De igual manera que en la FE, la FS del cerebro de los juveniles no vio alterada su composición por grupos de ácidos grasos tras la fase experimental. El contenido de 20:2(n-9) fue superior en los ejemplares que ingirieron la dieta deficiente en HUFA a pesar de que el nivel de 18:1(n-9) permaneciera constante en ambos tratamientos. Dentro de los (n-6), únicamente el 18:2 y el 20:3 presentaron variaciones estadísticas, siendo más abundantes en los peces DD. No se detectaron diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los integrantes de la serie (n-3) (**Tabla 4.3.11**).

Tampoco sufrió alteraciones importantes entre grupos experimentales, el perfil de ácidos grasos del FI al final del periodo de alimentación (**Tabla 4.3.11**). El LNA no fue

detectado en los ejemplares de ninguno de los dos tratamientos. Únicamente se registraron diferencias significativas en el porcentaje de 20:2(n-9), que fue mayor en los individuos que recibieron la dieta deficiente en AGE a pesar de no variar el de 18:1(n-9); en la cantidad de 18:2(n-6), que fue más del doble en esos peces; en la de su producto de elongación y desaturación, el 20:3(n-6); así como en el 22:5(n-3) que presentó una proporción más reducida.

Contrariamente a lo observado en los LP, la dieta afectó notablemente a la composición de los TG del cerebro (**Tabla 4.3.11**). Los juveniles del grupo DD presentaron un porcentaje menor de saturados (25,3% frente a 28,8% del grupo DC), MUFA (39,9 y 41,5%, respectivamente), (n-3) HUFA (13,7 y 17,8%) y (n-3) (17,4 y 20,0%), así como una relación (n-3)/(n-6) más baja (1,2 vs. 3,0), y un nivel más alto de PUFA (33,8 frente a 28,6%) debido a la sustancial diferencia en los (n-6) (14,9 vs. 6,7%). Individualmente, tanto los saturados $\leq C16$, como el 16:1, mostraron porcentajes menores en los peces a los que se suministró la dieta carente de AP, evolución opuesta a la observada en el 18:1(n-9) y el 18:2(n-9). En este lote experimental, la concentración de 18:2(n-6) prácticamente triplicó a la del grupo DC, 18:3(n-6) y 20:2(n-6) también fueron significativamente más altos y el ARA se redujo en un 40%. El contenido de 18:3(n-3) en los TG de las doradas que fueron alimentadas con la DD superó en algo más de tres veces al de las que recibieron la DC. Todos los (n-3) HUFA, exceptuando el 20:3, experimentaron una disminución en sus porcentajes cuando no fueron suministrados en la dieta, aunque esta variación fue más acusada para el 20:4, EPA y DPA ($P < 0,01$), que para el DHA ($P < 0,05$).

Tabla 4.3.8. Contenido lipídico y composición en clases lipídicas del cerebro de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)

	DC	DD	P
Lípido total (% peso seco)	42,4 ± 0,6	41,3 ± 0,7	N.S.
Clases lipídicas (% lípido total)			
Lisofosfatidilcolina	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1	<0,05
Esfingomielina + fosfatidilcolina	19,2 ± 1,4	23,7 ± 2,1	<0,05
Fosfatidilserina	6,3 ± 0,7	7,7 ± 1,0	N.S.
Fosfatidilinositol	2,0 ± 0,2	2,5 ± 0,3	N.S.
Fosfatidiletanolamina	21,7 ± 0,5	22,1 ± 0,5	N.S.
Sulfátidos	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	N.S.
Cerebrósidos	6,6 ± 0,2	6,6 ± 0,4	N.S.
Total lípidos polares	58,7 ± 2,1	65,8 ± 2,6	<0,05
Colesterol	17,0 ± 0,6	16,2 ± 0,9	N.S.
Ácidos grasos libres	1,9 ± 0,1	2,1 ± 0,2	N.S.
Triglicéridos	20,8 ± 1,7	14,5 ± 2,0	<0,05
Ésteres de esteroles	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	N.S.
Total lípidos neutros	41,3 ± 2,1	34,2 ± 2,6	<0,05

Valores expresados como media ± DE (n=5 para contenido lipídico y n=3 para composición en clases lipídicas). Cada réplica representa la mezcla de cerebro de 9 peces. N.S., no significativamente diferentes.

Tabla 4.3.9. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) del **lípidio total** del cerebro de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)

	DC	DD	P
Total ácidos grasos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco órgano)	290,1 \pm 14,2	301,5 \pm 9,4	N.S.
14:0	1,4 \pm 0,2	0,8 \pm 0,2	<0,01
16:0DMA	0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,0	N.S.
16:0	15,3 \pm 1,9	15,7 \pm 1,8	N.S.
16:1(n-9+n-7)	4,5 \pm 0,6	3,8 \pm 0,5	N.S.
18:0DMA	4,7 \pm 0,3	4,8 \pm 0,3	N.S.
18:1(n-9)DMA	0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	N.S.
18:1(n-7)DMA	0,5 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	N.S.
18:0	11,3 \pm 2,5	10,7 \pm 1,9	N.S.
18:1(n-9)	20,6 \pm 1,8	19,8 \pm 1,5	N.S.
18:1(n-7)	2,2 \pm 0,2	1,6 \pm 0,2	<0,01
18:2(n-9)	0,1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,0	<0,05
18:2(n-6)	1,8 \pm 0,4	3,7 \pm 0,2	<0,001
18:3(n-3)	0,1 \pm 0,1	0,5 \pm 0,0	<0,001
18:4(n-3)	0,5 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1	N.S.
20:1(n-11+n-9)	1,0 \pm 0,3	0,9 \pm 0,2	N.S.
20:2(n-9)	0,1 \pm 0,1	0,2 \pm 0,0	N.S.
20:3(n-6)	nd	0,2 \pm 0,0	<0,001
20:4(n-6)	1,5 \pm 0,0	1,3 \pm 0,1	<0,01
20:4(n-3)	0,5 \pm 0,4	0,1 \pm 0,1	N.S.
20:5(n-3)	3,7 \pm 0,3	3,2 \pm 0,3	N.S.
22:0	0,7 \pm 0,3	0,4 \pm 0,1	<0,05
22:1(n-11+n-9)	0,9 \pm 0,2	0,7 \pm 0,2	N.S.
22:4(n-6)	0,1 \pm 0,1	nd	N.S.
22:4(n-3)	0,3 \pm 0,2	nd	N.S.
22:5(n-3)	1,1 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	N.S.
24:0	3,3 \pm 1,1	2,0 \pm 0,4	N.S.
24:1	0,5 \pm 0,2	0,7 \pm 0,1	N.S.
22:6(n-3)	19,5 \pm 1,3	23,0 \pm 0,8	<0,01
No identificados	1,5 \pm 0,3	1,1 \pm 0,1	
Total saturados*	32,6 \pm 4,3	29,9 \pm 3,7	N.S.
Total MUFA	29,6 \pm 2,8	27,7 \pm 2,5	N.S.
Total DMA	7,0 \pm 0,5	7,2 \pm 0,4	N.S.
Total PUFA	29,3 \pm 1,8	34,1 \pm 1,3	<0,01
Total (n-6)	3,3 \pm 0,5	5,2 \pm 0,2	<0,001
Total (n-3)	25,7 \pm 1,4	28,3 \pm 1,1	<0,05
(n-3)/(n-6)	7,8 \pm 1,1	5,4 \pm 0,1	<0,01
Total (n-3) HUFA	25,1 \pm 1,1	27,3 \pm 1,0	<0,05

Valores expresados como media \pm DE (n=4 para DC y n=5 para DD). Cada réplica representa la mezcla de cerebro de 9 peces. N.S., no significativamente diferentes; nd, no detectado; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; DMA, dimetilacetil; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados ($\geq\text{C}_{20}$ y ≥ 3 dobles enlaces). * incluye 15:0, 17:0 y 20:0.

Tabla 4.3.10. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de la fosfatidilcolina (FC) y fosfatidiletanolamina (FE) del cerebro de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)

	FC		FE	
	DC	DD	DC	DD
16:0DMA	nd	nd	2,1 ± 0,4	2,4 ± 0,2
16:0	26,4 ± 1,4	27,5 ± 1,7	6,4 ± 0,5	6,2 ± 0,2
16:1(n-9+n-7)	5,7 ± 0,5	5,5 ± 0,4	2,3 ± 0,1	2,1 ± 0,2
18:0DMA	nd	nd	12,8 ± 2,9	14,2 ± 2,0
18:1(n-9)DMA	nd	nd	2,3 ± 0,3	2,7 ± 0,3
18:1(n-7)DMA	nd	nd	1,7 ± 0,4	1,9 ± 0,3
18:0	7,1 ± 0,2	7,3 ± 0,3	12,5 ± 1,9	13,2 ± 1,6
18:1(n-9)	23,9 ± 0,3	23,4 ± 0,3	18,0 ± 0,6	16,4 ± 1,9
18:1(n-7)	1,9 ± 0,0	2,0 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1
18:2(n-9)	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,1 ¹	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0
18:2(n-6)	0,7 ± 0,1	2,5 ± 0,3 ³	0,5 ± 0,0	0,9 ± 0,1 ³
18:3(n-3)	nd	nd	0,1 ± 0,1	nd
18:4(n-3)	nd	nd	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,2
20:1(n-11+n-9)	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,0
20:2(n-9)	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	tr	0,1 ± 0,1
20:2(n-6)	nd	0,1 ± 0,1	nd	nd
20:3(n-6)	tr	0,2 ± 0,0 ²	nd	nd
20:4(n-6)	1,1 ± 0,0	0,9 ± 0,0 ³	2,1 ± 0,1	1,8 ± 0,1 ²
20:4(n-3)	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	nd	nd
20:5(n-3)	3,0 ± 0,1	2,4 ± 0,2 ²	3,6 ± 0,3	3,3 ± 0,3
22:0	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	nd	nd
22:1(n-11+n-9)	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,1	nd	nd
22:4(n-6)	0,1 ± 0,0	tr	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,1
22:5(n-3)	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,0 ± 0,1 ¹
24:0	3,5 ± 0,4	3,1 ± 0,5	nd	nd
24:1	2,1 ± 0,3	2,0 ± 0,3	tr	tr
22:6(n-3)	17,5 ± 0,3	16,6 ± 0,4 ¹	28,4 ± 4,3	27,9 ± 3,6
No identificados	2,0 ± 0,2	1,6 ± 0,3	2,0 ± 0,4	2,3 ± 0,7
Total saturados*	38,8 ± 1,0	40,0 ± 1,3	19,2 ± 2,4	19,7 ± 1,7
Total MUFA	35,0 ± 0,7	34,3 ± 1,0	22,3 ± 0,7	20,3 ± 2,2
Total DMA	nd	nd	19,0 ± 4,0	21,3 ± 2,9
Total PUFA**	24,1 ± 0,2	24,4 ± 0,2	37,5 ± 4,5	36,4 ± 2,8
Total (n-6)	2,0 ± 0,1	3,7 ± 0,3 ³	2,8 ± 0,0	3,0 ± 0,1
Total (n-3)	21,2 ± 0,2	19,6 ± 0,5 ²	34,4 ± 4,4	33,1 ± 3,0
(n-3)/(n-6)	10,6 ± 0,3	5,3 ± 0,7 ³	12,3 ± 1,4	11,0 ± 1,4
Total (n-3) HUFA	21,2 ± 0,2	19,6 ± 0,5 ²	33,5 ± 4,6	32,3 ± 3,2

Valores expresados como media ± DE (n=3). Cada réplica representa la mezcla de cerebro de 9 peces. nd, no detectado; tr, valor <0,05%; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; DMA, dimetilacetil; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados ($\geq C_{20}$ y ≥ 3 dobles enlaces). Dentro de una misma fila, diferencias significativas entre pares de datos son expresadas como: ¹ P<0,05, ² P<0,01, ³ P<0,001. *incluye 14:0, 15:0 y 20:0; ** incluye 16:3.

Tabla 4.3.11. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de la fosfatidilserina (FS), fosfatidilinositol (FI) y triglicéridos (TG) del cerebro de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)

	FS		FI		TG	
	DC	DD	DC	DD	DC	DD
14:0	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1	4,5 ± 0,2	3,2 ± 0,2 ²
16:0	3,2 ± 0,2	4,0 ± 1,6	10,9 ± 1,6	11,9 ± 0,7	18,6 ± 0,2	17,0 ± 0,3 ²
16:1(n-9+n-7)	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,3	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,0	7,4 ± 0,3	5,8 ± 0,2 ³
16:3	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,1	nd	nd	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1
18:0	31,5 ± 1,9	30,0 ± 4,0	24,0 ± 1,6	24,9 ± 1,7	4,5 ± 0,3	4,2 ± 0,2
18:1(n-9)	11,5 ± 0,6	10,2 ± 2,2	8,4 ± 0,8	9,4 ± 0,6	24,1 ± 0,5	25,4 ± 0,6 ¹
18:1(n-7)	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1 ¹	2,7 ± 0,6	3,1 ± 0,4	4,1 ± 0,3	3,2 ± 0,2 ²
18:2(n-9)	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0	tr	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,5 ± 0,0 ³
18:2(n-6)	0,8 ± 0,0	1,2 ± 0,0 ³	1,4 ± 0,1	3,1 ± 0,5 ²	5,0 ± 0,5	13,4 ± 1,7 ²
18:3(n-6)	nd	nd	nd	nd	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,1 ¹
18:3(n-3)	nd	0,1 ± 0,1	nd	nd	0,8 ± 0,0	2,7 ± 0,4 ²
18:4(n-3)	nd	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	1,4 ± 0,0	1,0 ± 0,0 ³
20:1(n-11+n-9)	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,1	3,2 ± 0,3	3,0 ± 0,5
20:2(n-9)	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0 ¹	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,0 ²	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0
20:2(n-6)	nd	nd	nd	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0 ²
20:3(n-6)	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0	¹ 0,3 ± 0,1	1,3 ± 0,2 ²	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
20:4(n-6)	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,1	12,5 ± 1,8	10,7 ± 0,6	1,0 ± 0,1	0,6 ± 0,1 ²
20:3(n-3)	nd	nd	nd	nd	nd	0,1 ± 0,1
20:4(n-3)	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,5 ± 0,0 ²
20:5(n-3)	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,3	12,7 ± 2,0	13,4 ± 0,6	4,9 ± 0,4	2,6 ± 0,3 ²
22:1(n-11+n-9)	0,4 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,3	nd	2,7 ± 0,5	2,5 ± 0,6
22:4(n-6)	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	nd	nd
22:5(n-3)	1,9 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1 ¹	1,8 ± 0,1	1,1 ± 0,1 ²
22:6(n-3)	40,3 ± 1,3	42,0 ± 4,7	19,1 ± 3,8	14,8 ± 1,2	10,2 ± 0,1	9,1 ± 0,7 ¹
24:1	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1	nd	nd
No identificados	1,5 ± 0,3	1,7 ± 0,2	1,2 ± 0,3	1,5 ± 0,5	1,1 ± 0,3	1,0 ± 0,3
Total saturados*	35,9 ± 1,8	35,4 ± 2,1	36,5 ± 3,3	38,3 ± 0,8	28,8 ± 0,3	25,3 ± 0,2 ³
Total MUFA	16,1 ± 1,1	14,1 ± 3,0	13,9 ± 2,1	14,6 ± 0,8	41,5 ± 0,6	39,9 ± 0,5 ¹
Total PUFA**	46,4 ± 1,0	48,8 ± 2,6	48,5 ± 5,2	45,6 ± 0,8	28,6 ± 0,1	33,8 ± 1,0 ³
Total (n-6)	2,1 ± 0,1	2,5 ± 0,3	14,4 ± 1,7	15,3 ± 0,4	6,7 ± 0,5	14,9 ± 1,6 ²
Total (n-3)	43,7 ± 1,3	45,8 ± 3,2	33,6 ± 4,0	29,7 ± 1,0	20,0 ± 0,5	17,4 ± 0,8 ²
(n-3)/(n-6)	20,8 ± 1,6	18,2 ± 4,2	2,4 ± 0,8	2,0 ± 0,1	3,0 ± 0,3	1,2 ± 0,2 ³
Total (n-3) HUFA	43,7 ± 1,3	45,4 ± 3,7	33,5 ± 4,0	29,6 ± 0,9	17,8 ± 0,6	13,7 ± 1,1 ²

Valores expresados como media ± DE (n=3). Cada réplica representa la mezcla de cerebro de 9 peces. nd, no detectado; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados ($\geq C_{20}$ y ≥ 3 dobles enlaces). Dentro de una misma fila, diferencias significativas entre pares de datos son expresadas como: ¹ P<0,05, ² P<0,01, ³ P<0,001. * incluye 15:0, 17:0, 19:0, 20:0, 22:0 y 24:0; ** incluye 16:2 y 16:4.

4.3.7. Perfil lipídico del tracto intestinal en condiciones control

En el presente apartado se detallan las principales características de la composición lipídica de los dos segmentos intestinales, llevando a cabo un estudio comparado entre ambos.

El intestino anterior (IA) de los peces alimentados con la dieta control mostró un contenido lipídico en peso seco significativamente mayor (36%) que el del intestino posterior (IP) (**Tabla 4.3.12**). A pesar de las diferencias encontradas tanto en el TLP (38,2 frente a 44,1% en intestino anterior y posterior, respectivamente), como en el de neutros (61,8 frente a 55,9%), éstos no fueron significativamente diferentes. Las únicas diferencias estadísticas en la distribución de clases lipídicas entre ambos segmentos se pusieron de manifiesto en la proporción de lisofosfatidilcolina (0,7% en IA vs. 0,5% en IP) entre los lípidos polares, y en las de colesterol y TG, dentro de la fracción lipídica neutra (10,8% en IA vs. 13,4% en IP y 41,4% en IA vs. 33,8% en IP, respectivamente). En todo el tracto intestinal, los lípidos polares estuvieron representados principalmente por FC y FE, en tanto que los TG y el colesterol, constituyeron los representantes más destacados dentro de los neutros.

En la **Tabla 4.3.13** se detalla el perfil de ácidos grasos del LT del intestino de peces de los dos grupos experimentales. En ambos segmentos de los ejemplares que se alimentaron con la dieta formulada con AP, el grupo más numeroso fue el de los saturados, que superó el 40%, seguido de MUFA y PUFA, que se mantuvieron en torno al 27%, finalmente, los DMA representaron menos del 1% del total de los ácidos grasos. Sin embargo, la aportación de las series (n-3) y (n-6) al total de los PUFA sí varió en ambos segmentos de intestino, así, en el IA, la serie (n-3) aportó un porcentaje superior que en el IP (22,3% frente a 19,0%, respectivamente), y la (n-6) menor (4,0% vs. 5,6% en el IP), lo que dio lugar a una relación (n-3)/(n-6) más alta en el IA.

El principal ácido graso saturado en ambos segmentos de intestino, el 16:0, mostró un porcentaje menor en el intestino anterior (23,1%) que en el posterior (25,1%), mientras que el 18:0, no modificó significativamente su presencia. Salvo el 16:1, más abundante en el IA, la proporción individual del resto de MUFA se mantuvo

invariable entre los dos segmentos de intestino de peces alimentados con la DC. A pesar de que el principal integrante de los MUFA, el OA, permaneció constante en ambos tramos intestinales, su producto de desaturación, el 18:2(n-9), fue detectado exclusivamente en el IP. Las diferencias encontradas en el total de (n-6) se deben al LA, que significó un 1,6% del total de ácidos grasos en el IA, porcentaje estadísticamente menor que el 2,9% presente en el IP. Productos derivados del 18:2(n-6), como 18:3(n-6) o 20:2(n-6), estuvieron presentes en los dos tramos de intestino, en tanto que el 20:3(n-6) sólo fue detectado en el IA. Los componentes más relevantes de los (n-3) fueron el 22:6, con una proporción cercana al 10% en ambos segmentos intestinales, el 20:5, que redujo su porcentaje en el sentido próximo-distal de un 8,3% a un 6,5%, y el 22:5, también más elevado en el IA (1,8%) que en el IP (1,4%). Debe destacarse la escasa participación del 18:3 en el total de ácidos grasos (0,5%), así como la aparición, dentro de esta serie, del ácido graso de cadena impar, 21:5(n-3), que aportó un 0,3% en ambos segmentos de intestino (**Tabla 4.3.13**).

Como se refleja en la **Tabla 4.3.14**, el perfil de ácidos grasos de la FC resultó muy similar en los dos segmentos de intestino de los juveniles DC. La proporción total de los diferentes grupos de ácidos grasos permaneció invariable, ajustándose al patrón de magnitud en sentido antero-posterior: saturados (55,9% - 47,2%) > PUFA (31,0% - 34,1%) > MUFA (11,6% - 16,7%). La contribución de los (n-3) y de los (n-6) al total de PUFA fue equivalente en ambos segmentos, por lo que la relación entre ambas series no varió a lo largo del eje longitudinal del intestino. Todos los saturados mantuvieron sus proporciones individuales, el 16:0 fue el componente más destacado, representando algo más del 71% del total del grupo en el IA, y cerca del 67% en el IP, seguido del 18:0, que supuso el 23,4 y el 26,5%, respectivamente. Tampoco se alteró el contenido individual de los MUFA, que tuvieron en el OA a su integrante más importante al aportar alrededor del 70% al total del grupo. Dentro de la serie (n-6), el ARA (2,0 - 2,1%), el 18:3 y el 22:5, mantuvieron sus porcentajes en ambos segmentos de intestino, mientras que el 18:2(n-6), 20:2(n-6), 20:3(n-6) y 22:4(n-6), fueron más abundantes en el segmento posterior. Como se mencionó anteriormente, a pesar de estas diferencias, el total de (n-6) no sufrió cambios significativos en el eje próximo-distal del tracto intestinal. También es destacable la escasa aportación del 18:3(n-3) al perfil de ácidos grasos que componen la FC del intestino, con un 0,1% en ambos

segmentos. El sumatorio de los (n-3) HUFA permaneció invariable (26,7 - 28,1%) en la FC de ambos segmentos intestinales de los peces control, el único de sus integrantes que modificó su proporción fue el 22:5(n-3), mostrando un valor más bajo en el IA (1,3%) que en el IP (2,8%).

En la FE, el grupo de ácidos grasos más relevante en las doradas que fueron alimentadas con la dieta que contenía AP fue el de los PUFA (43,9 - 48,5% en IA e IP, respectivamente), seguido de los saturados, más abundantes en el segmento anterior (33,0% frente a 24,6% en el IP), a continuación los DMA, que permanecieron invariables (12,3 - 17,9%), y, finalmente, los MUFA, con mayor presencia en el intestino anterior (7,8%) que en el posterior (6,1%) (**Tabla 4.3.15**). En dirección antero-posterior, un 6,1 y un 6,5% de los PUFA pertenecieron a la serie (n-6), mientras que un 37,1 y un 41,6% eran (n-3), lo que dio lugar a que la relación (n-3)/(n-6) no cambiara entre segmentos. El 18:0, con valores de 17,4 y 15,7%, y el 16:0, significativamente mayor en el IA (13,8%) que en el IP (7,3%), fueron los ácidos grasos más destacados de los saturados en la FE. Dentro de los MUFA, los isómeros 18:1 tuvieron la representación más elevada, siendo además, significativamente mayores en el tramo anterior. El único ácido graso de los (n-6) que difirió significativamente entre segmentos, el 22:4, fue más alto en el IP, mientras que el ARA, principal integrante de esta serie, aportó alrededor de un 4,0% al total de ácidos grasos en ambas secciones del tracto intestinal. Ni los (n-3) HUFA totales (37,1 y 41,5%), ni el DHA, ácido graso más abundante de la FE (27,0% en el IA y 30,7% en el IP), ni el EPA (6,9 - 6,4%), experimentaron cambios significativos en sus contenidos, únicamente el 22:5(n-3) varió entre segmentos, de forma similar a lo descrito para la FC, adquiriendo mayor relevancia en el tramo distal (4,2%), que en el proximal (2,8%).

Al comparar el perfil de ácidos grasos de la FS a lo largo del tracto intestinal de los peces que se alimentaron con la dieta control (**Tabla 4.3.16**), se observaron diferencias más notorias que las registradas en la FC o FE. Únicamente el total de MUFA, grupo menos representativo en esta clase lipídica, mantuvo su porcentaje en ambos segmentos intestinales. Los saturados, que fueron el grupo mayoritario, decrecieron en sentido próximo-distal (75,2 frente a 60,7%), en tanto que los PUFA siguieron la tendencia contraria, aportando un 14,8% en el IA y algo más del doble en el IP. Tanto los (n-3) como los (n-6) fueron menos abundantes en el tramo anterior

que en el posterior (11,9 y 2,8% frente a 23,5 y 4,5%, respectivamente). A nivel individual, todos los MUFA mantuvieron invariables sus proporciones en ambos segmentos intestinales, siendo el 18:1(n-9) su principal componente, al representar más del 50% del total del grupo. Los dos saturados mayoritarios, 18:0 y 16:0, fueron más abundantes en la sección proximal del intestino (55,8 y 15,7%, respectivamente) que en la posterior (46,9 y 10,3%). De la serie (n-6), el LA y el ARA, mantuvieron constantes sus porcentajes en ambos segmentos de intestino, para el primero se registraron valores de 1,5 y 1,9% en IA e IP, respectivamente, y de 0,7 y 1,1% para el segundo. Se detectó la presencia en la FS de numerosos productos de elongación y/o desaturación procedentes del 18:1(n-9), como el 18:2, del 18:2(n-6), como el 18:3, 20:2, 20:3, 22:4 y 22:5, o del 18:3(n-3), como el 18:4, la mayoría de ellos mejor representados en el tramo distal que en el proximal. En cuanto a los (n-3), mencionar que el LNA representó únicamente el 0,1% de los ácidos grasos y que el total de (n-3) HUFA fue la mitad en el IA que en el IP, como consecuencia de que sus elementos más abundantes, el 22:6(n-3) y el 22:5(n-3), fueron más bajos en el tramo proximal (8,8 y 1,1%, respectivamente) que en el distal (18,9 y 2,8%), mientras que el EPA mantuvo su proporción entre segmentos.

El FI vió escasamente modificada su composición en ácidos grasos a lo largo del eje longitudinal del intestino, presentando diferencias significativas exclusivamente en el total de (n-6) (10,5 y 17,7% en IA e IP, respectivamente), y en la relación (n-3)/(n-6) (2,7 en IA y 1,4 en IP) (**Tabla 4.3.17**). Los grupos de ácidos grasos más abundantes en el FI de los juveniles que se alimentaron con la DC fueron saturados y PUFA, que rondaron el 40% en ambos segmentos, los MUFA no llegaron al 13%. El integrante mayoritario de los saturados, el 18:0, representó cerca de una cuarta parte del total de ácidos grasos en ambos tramos intestinales, mientras que el 16:0 varió significativamente (14,9% en IA frente a 9,3% en IP). Todos los MUFA permanecieron constantes, siendo su principal componente el 18:1(n-9), que se aproximó al 7% del total de ácidos grasos. Los elementos más destacados de los (n-6) mostraron pautas diferentes a lo largo del eje antero-posterior del intestino. En tanto que el 18:2(n-6) mantuvo su nivel estable, el 20:4(n-6) presentó un valor más bajo en el IA (5,8%) que en el IP (13,0%). No se detectó la presencia de derivados del OA en el FI, pero sí del LA. Dentro de la serie (n-3), tanto el 18:3, mínimamente representado, como el total

de (n-3) HUFA y sus principales componentes, DHA, EPA y DPA, permanecieron invariables entre segmentos, con valores de 19,0, 4,9 y 2,3%, respectivamente en el IA, y 13,5, 7,8 y 2,7% en el IP.

Las proporciones de todos los grupos de ácidos grasos permanecieron inalteradas en los TG de ambos segmentos intestinales, siendo poco relevantes las escasas variaciones detectadas en sus componentes individuales (**Tabla 4.3.18**). La abundancia relativa por familias fue: saturados (> 41%), monoinsaturados (\approx 37%) y PUFA (17-19%). El principal integrante de los saturados fue el 16:0, que constituyó el 24,7% del total de ácidos grasos, seguido del 18:0, con un 11,7 - 9,3% en sentido antero-posterior, y del 14:0, próximo al 5,5% en ambos segmentos. Los 18C MUFA se aproximaron al 28% del total de ácidos grasos, y los de 16C se mantuvieron entre el 6,1 y el 6,4%, sólo se registraron diferencias significativas en los isómeros de 22C, más de dos veces superiores en el IP. Derivados del OA, como 18:2(n-9) o 20:2(n-9), fueron detectados en ambos segmentos del tracto intestinal, mostrando un porcentaje más elevado en el tramo distal. Los componentes más relevantes de la serie (n-6) fueron nuevamente el 18:2(n-6) y el 20:4(n-6), aunque debemos también señalar la aparición de otros (n-6) como el 18:3, 20:2, 22:4 o 22:5, especialmente en el IP, aunque sin manifestar variaciones estadísticas con respecto al IA. Los principales componentes de los (n-3) HUFA en los TG del intestino de los peces DC fueron el DHA (3,9 - 5,6%), el EPA (4,6 - 3,5%) y el DPA (1,3 - 1,4%), que al igual que el resto del grupo, no variaron entre segmentos.

4.3.8. Efecto de la deficiencia dietaria de HUFA en el tracto intestinal

La deficiencia de ácidos grasos esenciales en la dieta incrementó el contenido lipídico en ambos segmentos de intestino en algo más del 50%, aunque la distribución en lípidos polares o neutros se vio modificada exclusivamente en el IA, donde el TLP se elevó un 26,4%. Individualmente, también parecen resultar más afectadas las clases lipídicas del segmento anterior, que presentó niveles superiores de CL/FG dentro de la fracción polar y de acilglicerolés parciales dentro de la fracción neutra. Por el contrario, tanto TG como EE, disminuyeron un 22,7 y un 65%, respectivamente en el IA de las doradas DD. Por lo que respecta al IP, las variaciones se manifestaron

en la reducción del contenido de FS y de colesterol, un 43 y un 24%, respectivamente (**Tabla 4.3.12**). De forma similar a lo ocurrido en el hígado, la alimentación de los peces con la dieta formulada sin AP, dio lugar a un intestino de poca consistencia, flojo y blanquecino (**Figura 4.2**).

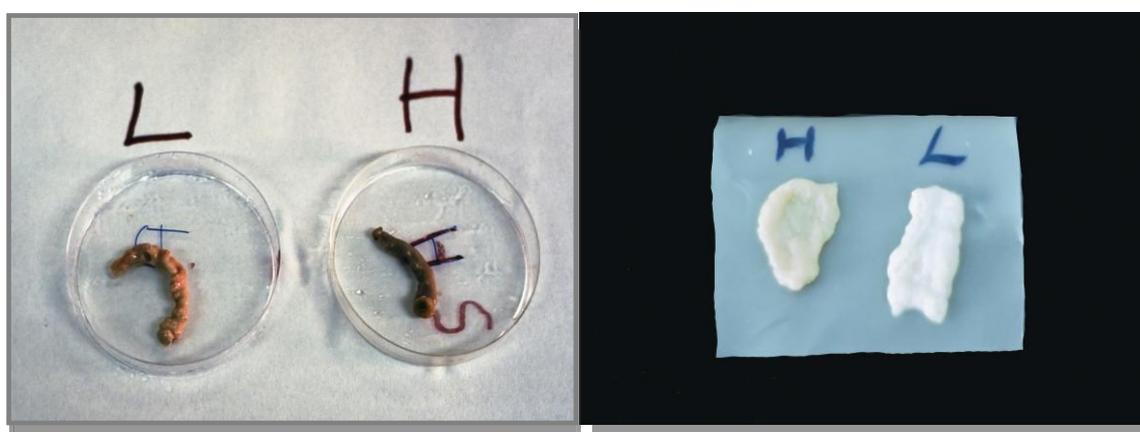


Figura 4.2. Aspecto externo del intestino de los ejemplares experimentales. **Izda.** Segmento extraído de peces alimentados con la DD (L) o con la DC (H). **Dcha.** Segmento abierto por su eje longitudinal extraído de peces alimentados con la DD (L) o con la DC (H).

En la **Tabla 4.3.13**, podemos observar cómo la práctica totalidad de los ácidos grasos del LT, tanto por grupos como individualmente, vieron alteradas sus proporciones en el IA de los peces que ingirieron la dieta deficiente en HUFA al compararlos con los valores obtenidos en los peces del tratamiento control. Así, todos los saturados y MUFA disminuyeron significativamente en el tramo proximal. En los (n-6), que incrementaron su contenido total alrededor de 7 veces, las variaciones experimentadas por sus integrantes no resultaron tan uniformes, ya que de sus dos representantes mayoritarios, el 18:2 se elevó más de 17 veces, mientras que el 20:4 fue 8 veces menos numeroso. Los (n-3) redujeron a menos de un tercio su aportación al total de los PUFA en el IA de peces del grupo DD, a pesar de que el

LNA fue 9 veces mayor en este grupo, ya que todos los (n-3) HUFA, salvo el 20:3(n-3), disminuyeron drásticamente. Como resultado de esta tendencia opuesta de las dos series, la relación (n-3)/(n-6) fue más baja en los ejemplares del lote DD que en los del DC, y el porcentaje total de PUFA más elevado. En el IP, la influencia de la composición lipídica de la dieta parece ser menos acusada que en el IA. La reducción del componente más destacado de los saturados, el 16:0, hizo disminuir el total del grupo. Los MUFA mostraron la pauta contraria gracias al 18:1(n-9), pues el resto de ácidos grasos de esta familia fueron menores. Por lo que respecta a los (n-6), su proporción en el LT del IP fue alrededor de 3,6 veces mayor en los juveniles DD. El 20:4(n-6) descendió desde 2,1% en el grupo DC hasta 0,5% en el DD, mientras que el 18:2(n-6), que representó más del 95% del total de la serie, se incrementó casi 7 veces. Ninguno de los productos derivados del OA o del LA, variaron sus concentraciones. Finalmente, tanto el total de (n-3), como los porcentajes de sus componentes individuales, fueron más bajos en el IP de las doradas del lote DD, a excepción del 18:3, que manifestó la evolución inversa, y el 20:3, que se mantuvo constante. Como acabamos de exponer, las series (n-3) y (n-6) mostraron comportamientos opuestos, teniendo mayor influencia sobre el total de PUFA, que se vió incrementado, la acción de los (n-6) que la de los (n-3). Como consecuencia, la relación (n-3)/(n-6) fue 8,5 veces más baja en los peces que se alimentaron con el pienso carente de AP.

Las variaciones que ambos segmentos de intestino mostraron en el perfil de ácidos grasos de la FC como consecuencia de la deficiencia dietaria de HUFA fueron similares (**Tabla 4.3.14**). Saturados, MUFA y PUFA mantuvieron invariables sus porcentajes totales con respecto a los de los peces DC. Los saturados, debido a que sus representantes mayoritarios, 16:0 y 18:0, no alteraron sus proporciones. En el IA de los juveniles a los que se suministró la DD, los MUFA mantuvieron su proporción total con respecto a la de los DC a pesar de que el 18:1(n-9), que supuso el 73% del total del grupo, incrementó su contenido, debido a que el resto de MUFA disminuyeron significativamente. Por el contrario, en el IP el 18:1, que supuso el 84% del grupo, se mantuvo constante entre tratamientos. Los PUFA mantienen su proporción debido a que tanto la serie (n-3) como la (n-6), mostraron tendencias opuestas equilibradas. Así, en ambos segmentos intestinales de los peces DD, el

total de (n-6) fue 6-7 veces más alto que en los peces DC, mientras que los (n-3) se redujeron hasta un tercio aproximadamente. El incremento de los (n-6) se debió principalmente al LA, ya que el ARA disminuyó su contenido 2-3 veces. Sólo se detectaron diferencias en los derivados del 18:2(n-6) para el 20:2 que multiplicó por 6 el contenido presente en el intestino del grupo DC. Finalmente, el total de (n-3) en la FC se redujo en ambas secciones intestinales a pesar de que el LNA incrementó su proporción desde 0,1% a 1,6 - 1,7%, debido a que los (n-3) HUFA principales disminuyeron de manera significativa en ambos segmentos intestinales cuando los peces fueron alimentados con la DD.

En general, el efecto de la composición en ácidos grasos de la dieta sobre el perfil de ácidos grasos de la FE fue menos evidente que sobre la FC (**Tabla 4.3.15**). No modificaron su contenido en ninguno de los segmentos, los totales de saturados, DMA y PUFA, ni tampoco el total de (n-3) HUFA ni de (n-3) en el IA. El incremento experimentado por los MUFA en ambos tramos de intestino de los peces DD, está directamente relacionado con el ascenso de los isómeros de 18C, ya que los de 16C no variaron. De igual manera, la subida en el total de (n-6) se debe principalmente al 18:2, ya que el 20:4 rebajó su contenido en algo más del 37% en ambos segmentos. De entre los derivados del LA, sólo la proporción de 20:3(n-6) mostró diferencias estadísticas, siendo mayor en el IP de los juveniles del grupo DD. El total de (n-3) HUFA, que constituyó la práctica totalidad de los (n-3), decreció en la FE del IP de los peces alimentados con la dieta carente de AP, no resultando afectado en el tramo anterior. A pesar de ello, los componentes individuales mostraron comportamientos similares en ambos segmentos de intestino, donde 20:5(n-3) y 22:5(n-3) decrecieron significativamente, en tanto que el DHA se mantuvo constante.

La **Tabla 4.3.16** muestra el distinto comportamiento del perfil de ácidos grasos de la FS a lo largo del tracto intestinal en respuesta a la variación en la composición lipídica de la dieta. En el IA, a pesar de que el 18:1(n-9) alcanzó un valor superior en los peces que se alimentaron con la dieta deficiente en AGE, no se modificó el total de MUFA debido a que el resto de componentes se mantuvieron estables. Los saturados $\leq C19$ presentaron concentraciones más bajas en los peces que ingirieron la dieta deficiente en HUFA, y, por tanto, también disminuyó el total del grupo. El total de (n-6) cuadruplicó su proporción gracias al incremento del 18:2 y productos

derivados como 20:2 y 20:3, ya que el nivel de ARA, se mostró independiente del tratamiento dietario. Esta subida en la serie (n-6), junto con la estabilidad del total de (n-3), aún a pesar de que el LNA quintuplicó su proporción en el IA de los peces DD, dio como resultado un porcentaje mayor del total de PUFA y una reducción de la relación (n-3)/(n-6). El sumatorio de (n-3) HUFA permaneció invariable ya que únicamente el 20:5(n-3) vió alterado su contenido por la composición de la dieta, disminuyendo hasta la mitad con respecto a los valores de referencia obtenidos en los ejemplares DC. En la FS del IP, no se vieron afectados por la composición lipídica dietaria, el total de saturados, monoinsaturados ni PUFA. A nivel individual, el componente más destacado de los saturados, el 18:0, que representó cerca del 80% del total del grupo, permaneció invariable entre tratamientos, mientras que 16:0 y 17:0 fueron más bajos en los peces que ingirieron la DD. Todos los MUFA mantuvieron su proporción, independientemente del tratamiento dietario. La mayor presencia de (n-6) en el tramo distal de las doradas alimentadas con la dieta sin AP resultó contrarrestada por la reducción sufrida por los (n-3), lo que hizo mantener constante el total de PUFA. Tanto el 18:2(n-6) como sus productos derivados, 20:2 y 20:3, fueron más abundantes en el IP del grupo DD, mientras que el 20:4 representó aproximadamente un tercio del porcentaje del lote DC. La reducción del total de (n-3) en los juveniles que tomaron la DD, en contra de la tendencia observada para el 18:3(n-3), 4 veces más alto en ese grupo, fue consecuencia de la disminución porcentual del 20:4, 20:5 y 22:5, ya que el DHA permaneció invariable.

El perfil de ácidos grasos del FI de ambos segmentos de intestino resultó afectado de manera similar por la composición lipídica de la dieta (**Tabla 4.3.17**). Las únicas diferencias detectadas en la pauta de variación en los segmentos de intestino de peces alimentados con la DD, con respecto a los valores considerados control, estriban en los saturados y en los productos derivados del 18:2(n-6). El total de saturados permaneció invariable en el IA, al no variar sus componentes mayoritarios, 18:0 y 16:0, mientras que en el IP disminuyó debido a la reducción sufrida por el 18:0. El sumatorio de MUFA en cada sección intestinal de los peces DD coincidió con el obtenido en los peces DC, a pesar de que su elemento más abundante, el 18:1(n-9), incrementó su proporción en el tratamiento DD ya que el resto de integrantes del grupo mantuvieron sus proporciones. El aumento en el porcentaje

total de (n-6) fue menos acusado que la reducción de los (n-3), por lo que el sumatorio de PUFA disminuyó con respecto a los peces control. La subida del nivel de 18:2(n-6) y de su producto derivado 20:2(n-6), fue la causante de la mayor presencia de la serie (n-6) en el FI de los peces que tomaron la dieta deficiente en HUFA, a pesar de que el 20:4 siguiera la pauta contraria. Otros (n-6) como el 20:3 y el 22:4 contribuyeron a esta tendencia en el IP. En cuanto a los (n-3), mientras que el LNA incrementó su valor en el FI de los peces del lote experimental DD, los principales (n-3) HUFA vieron reducida su presencia.

La práctica totalidad de los ácidos grasos de los TG resultaron afectados por la dieta, aunque la incidencia parece más evidente en el IA que en el IP (**Tabla 4.3.18**). En el tramo proximal, el único grupo que no varió su contenido total fue el de los MUFA, a pesar de que todos sus componentes variaron entre tratamientos, mientras que los isómeros 18:1 subieron su porcentaje en los peces DD, los de 16, 20 y 22C lo disminuyeron. Todos los saturados y por tanto su sumatorio, decrecieron en el IA de las doradas que se alimentaron con la dieta deficiente en AGE. La mayor proporción de PUFA en los ejemplares DD con respecto a los DC, fue debida a que los (n-6) incrementaron 8,6 veces su proporción mientras que los (n-3) sólo la disminuyeron 2,3 veces, por lo que la relación entre las dos series de ácidos grasos se redujo de 4,4 a 0,2. El fuerte ascenso experimentado en el total de (n-6) fue debido al LA y a su producto de elongación el 20:2(n-6), ya que 18:3(n-6), 22:4(n-6), y, sobre todo, 20:4(n-6), descendieron. Dentro de la serie (n-3), el 18:3 incrementó su porcentaje casi 8 veces en los TG del IA de los peces que ingirieron la DD con respecto a los que tomaron la DC, a pesar de ello, el total de (n-3) disminuyó, como consecuencia de la escasa aportación de los (n-3) HUFA, que significaron un 1,1% del total de ácidos grasos, habiendo disminuido los tres componentes mayoritarios su presencia con respecto a la presente en el grupo control. En los TG del IP se mantuvo estable la presencia de los tres grupos principales de ácidos grasos en ambos lotes de peces, a pesar de las variaciones experimentadas en sus componentes individuales. Los saturados, sólo vieron reducida la aportación del 14:0, ya que los de 16, 17 y 18C se mantuvieron en los valores control. Por lo que respecta a los MUFA, sólo se mantuvo invariable su componente más destacado, los isómeros 18:1. La subida experimentada por los (n-6) en el grupo deficiente en AGE,

fue compensada por la reducción de los (n-3), lo que trajo consigo el mantenimiento de los valores alcanzados por los PUFA y la disminución, menos acusada que en el segmento anterior, de la relación (n-3)/(n-6). El principal exponente de los (n-6), el 18:2, incrementó su porcentaje más de 5 veces con la DD, en tanto que el segundo componente mayoritario en condiciones control, el ARA, no fue detectado en los juveniles del grupo DD. El comportamiento de los distintos integrantes de la familia (n-3) difirió notablemente entre sí, por un lado, el 18:3 incrementó su proporción en el grupo DD, por otro, todos los (n-3) HUFA de más de tres insaturaciones, fueron más bajos aunque a niveles de significación diferentes ($P < 0,01$ DHA y 20:4(n-3), $P < 0,001$ EPA y DPA).

Tabla 4.3.12. Contenido lipídico y composición en clases lipídicas del intestino anterior y posterior de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)

	Intestino anterior		Intestino posterior	
	DC	DD	DC	DD
Lípido total (% peso seco)	36,0 ± 2,3	54,6 ± 4,7 ³	23,4 ± 3,6	^c 35,3 ± 8,1 ^{2,c}
Clases lipídicas (% lípido total)				
Lisofosfatidilcolina	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0	^a 0,3 ± 0,1 ^a
Esfingomielina	0,8 ± 0,1	1,5 ± 0,4	1,0 ± 0,3	0,9 ± 0,3
Fosfatidilcolina	18,1 ± 2,4	21,4 ± 1,6	18,3 ± 0,2	17,4 ± 2,6
Fosfatidilserina	2,3 ± 0,4	3,2 ± 0,8	3,0 ± 0,4	1,7 ± 0,5 ¹
Fosfatidilinositol	2,9 ± 0,3	4,0 ± 0,6	3,6 ± 0,3	3,1 ± 0,9
CL/FG	0,3 ± 0,2	1,4 ± 0,4 ¹	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,1 ^c
Fosfatidiletanolamina	10,1 ± 2,0	13,0 ± 1,9	13,2 ± 2,0	11,8 ± 0,7
No identificados	3,0 ± 0,2	3,2 ± 0,5	4,2 ± 0,8	3,1 ± 1,1
Total lípidos polares	38,2 ± 3,3	48,3 ± 1,4 ²	44,1 ± 3,0	38,5 ± 6,0 ^a
Acilglicerol parciales	1,2 ± 0,2	2,0 ± 0,1 ²	1,7 ± 0,2	1,9 ± 0,5
Colesterol	10,8 ± 0,3	12,5 ± 2,4	13,4 ± 0,6	^b 10,1 ± 1,6 ¹
Ácidos grasos libres	3,8 ± 0,4	3,6 ± 0,5	4,0 ± 0,3	3,8 ± 0,2
Triglicéridos	41,4 ± 3,2	32,0 ± 2,6 ¹	33,8 ± 1,8	^a 42,0 ± 6,3 ^a
Ésteres de esteroles	4,6 ± 0,9	1,6 ± 0,3 ²	2,9 ± 0,6	3,7 ± 1,1 ^a
Total lípidos neutros	61,8 ± 3,3	51,7 ± 1,4 ²	55,9 ± 3,0	61,5 ± 6,0 ^a

Valores expresados como media ± DE (n=8 para contenido lipídico y n=3 para composición en clases lipídicas). Cada réplica representa la mezcla de intestino de 6 peces. CL, cardiolipín; FG, fosfatidilglicerol. Dentro de una misma fila, diferencias significativas entre pares de datos son expresadas como: ¹ P<0,05, ² P<0,01, ³ P<0,001, para comparaciones entre el mismo segmento intestinal de individuos alimentados con la DC o DD, y como: ^a P<0,05, ^b P<0,01, ^c P<0,001, para comparaciones entre intestino anterior y posterior de individuos alimentados con la misma dieta.

Tabla 4.3.13. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) del **lípidio total** del intestino anterior y posterior de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)

	Intestino anterior		Intestino posterior	
	DC	DD	DC	DD
Total ácidos grasos (µg/mg peso seco tejido)	293,1 ± 23,3	453,4 ± 42,9 ³	161,5 ± 40,2 ^a	308,5 ± 75,0 ^{2,a}
Ácidos grasos				
14:0	3,8 ± 0,2	1,5 ± 0,1 ³	2,4 ± 0,6 ^c	1,7 ± 0,5
16:0	23,1 ± 1,0	15,6 ± 2,1 ³	25,1 ± 1,6 ^a	22,3 ± 1,9 ^{1,c}
16:1(n-9+n-7+n-5)	4,6 ± 0,2	1,9 ± 0,2 ³	4,0 ± 0,4 ^c	2,6 ± 0,4 ^{3,b}
17:0	1,0 ± 0,0	0,6 ± 0,1 ³	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1 ^a
16:3	0,7 ± 0,0	0,4 ± 0,0 ³	0,6 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,1 ²
18:0	12,2 ± 0,6	8,9 ± 0,7 ³	13,7 ± 1,9	11,9 ± 1,9 ^a
18:1(n-9)	19,7 ± 0,9	31,5 ± 1,5 ³	17,8 ± 2,0	26,0 ± 2,7 ^{3,b}
18:1(n-7)	2,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1 ³	2,9 ± 0,2	1,2 ± 0,1 ^{3,a}
18:2(n-9)	nd	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
18:2(n-6)	1,6 ± 0,1	27,7 ± 2,2 ³	2,9 ± 0,6 ^c	19,5 ± 4,7 ^{3,b}
18:3(n-6)	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	nd
18:3(n-3)	0,5 ± 0,0	4,5 ± 0,6 ³	0,5 ± 0,1	3,1 ± 0,9 ^{3,a}
18:4(n-3)	0,8 ± 0,1	0,1 ± 0,0 ³	0,7 ± 0,2	0,2 ± 0,2 ²
20:1(n-11+n-9)	0,9 ± 0,0	0,5 ± 0,0 ³	1,2 ± 0,3	0,7 ± 0,2 ¹
20:2(n-6)	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,0 ³	0,2 ± 0,2	0,4 ± 0,2
20:3(n-6)	tr	tr	nd	nd
20:4(n-6)	1,6 ± 0,2	0,2 ± 0,0 ³	2,1 ± 0,5	0,5 ± 0,2 ^{3,a}
20:3(n-3)	nd	0,1 ± 0,0	nd	0,1 ± 0,1
20:4(n-3)	0,5 ± 0,0	nd ³	0,5 ± 0,0	0,2 ± 0,1 ²
20:5(n-3)	8,3 ± 0,6	0,3 ± 0,1 ³	6,5 ± 0,6 ^b	0,7 ± 0,2 ^{3,a}
22:1(n-11+n-9)	0,6 ± 0,0	0,1 ± 0,0 ³	0,6 ± 0,2	0,3 ± 0,1 ¹
21:5(n-3)	0,3 ± 0,0	nd ³	0,3 ± 0,1	nd ¹
22:4(n-6)	0,2 ± 0,0	tr ³	0,1 ± 0,1	nd
22:5(n-6)	0,2 ± 0,0	nd ³	0,2 ± 0,1	nd
22:5(n-3)	1,8 ± 0,1	0,1 ± 0,0 ³	1,4 ± 0,2 ^b	0,4 ± 0,2 ³
22:6(n-3)	10,1 ± 0,9	1,2 ± 0,3 ³	9,1 ± 1,9	3,2 ± 2,0 ²
No identificados	1,9 ± 0,2	1,7 ± 0,2	2,6 ± 0,6	1,6 ± 0,6
Total saturados*	40,9 ± 1,7	27,5 ± 3,0 ³	43,0 ± 3,0	37,6 ± 3,8 ^{1,b}
Total MUFA**	29,1 ± 1,3	35,8 ± 1,6 ³	27,2 ± 3,1	31,0 ± 2,8 ^a
Total DMA***	0,7 ± 0,0	0,1 ± 0,1 ³	0,4 ± 0,0 ^c	0,2 ± 0,2 ¹
Total PUFA****	27,4 ± 1,6	35,0 ± 2,5 ³	26,8 ± 2,6	29,6 ± 2,2 ^b
Total (n-6)	4,0 ± 0,1	28,3 ± 2,2 ³	5,6 ± 0,8 ^c	20,5 ± 4,1 ^{3,b}
Total (n-3)	22,3 ± 1,5	6,3 ± 0,4 ³	19,0 ± 2,2 ^a	8,8 ± 2,2 ³
(n-3)/(n-6)	5,6 ± 0,3	0,2 ± 0,0 ³	3,4 ± 0,6 ^c	0,4 ± 0,2 ^{3,a}
Total (n-3) HUFA	21,0 ± 1,5	1,7 ± 0,3 ³	17,8 ± 2,5 ^a	4,7 ± 3,0 ³

Valores expresados como media ± DE (n=5). Cada réplica representa la mezcla de intestino de 6 peces. nd, no detectado; tr, valor < 0,05%; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; DMA, dimetilacetales; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados (≥C₂₀ y ≥3 dobles enlaces). Dentro de una misma fila, diferencias significativas entre pares de datos son expresadas como: ¹ P<0,05, ² P<0,01, ³ P<0,001, para comparaciones entre el mismo segmento intestinal de individuos alimentados con la DC o DD, y como: ^a P<0,05, ^b P<0,01, ^c P<0,001, para comparaciones entre IA e IP de individuos alimentados con la misma dieta. * incluye 15:0, 19:0, 20:0, 22:0 y 24:0; ** incluye 14:1, 15:1 y 18:1(n-5); *** incluye 18:0DMA y 18:1(n-9)DMA; **** incluye 16:2.

Tabla 4.3.14. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de la **fosfatidilcolina** del intestino anterior y posterior de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)

Ácidos grasos	Intestino anterior		Intestino posterior	
	DC	DD	DC	DD
14:0	1,1 ± 0,2	0,7 ± 0,1 ¹	1,1 ± 0,2	0,7 ± 0,1 ¹
16:0	39,8 ± 6,8	28,7 ± 4,1	31,6 ± 2,2	26,9 ± 2,2
16:1(n-9+n-7)	1,3 ± 0,1	0,7 ± 0,1 ²	1,5 ± 0,2	1,1 ± 0,1 ^{1,a}
17:0	1,2 ± 0,3	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,7 ± 0,1 ¹
18:0	13,1 ± 2,9	13,6 ± 2,6	12,5 ± 1,4	12,3 ± 0,7
18:1(n-9)	7,9 ± 2,0	14,7 ± 3,2 ¹	12,2 ± 1,8	15,5 ± 1,3
18:1(n-7)	1,9 ± 0,1	1,3 ± 0,1 ²	2,2 ± 0,3	1,5 ± 0,2 ¹
18:2(n-9)	tr	tr	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1 ^a
18:2(n-6)	1,3 ± 0,2	25,2 ± 6,3 ³	2,0 ± 0,3 ^a	28,2 ± 3,6 ³
18:3(n-6)	0,1 ± 0,0	nd ³	0,1 ± 0,0	nd ²
18:3(n-3)	0,1 ± 0,0	1,6 ± 0,2 ³	0,1 ± 0,1	1,7 ± 0,4 ²
18:4(n-3)	tr	tr	nd	0,2 ± 0,0 ^a
20:2(n-6)	0,1 ± 0,0	0,6 ± 0,1 ³	0,2 ± 0,1 ^a	1,2 ± 0,4 ^{2,a}
20:3(n-6)	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,2
20:4(n-6)	2,0 ± 0,5	0,9 ± 0,2 ³	2,1 ± 0,4	0,7 ± 0,2 ²
20:3(n-3)	nd	0,1 ± 0,0 ¹	nd	0,1 ± 0,0
20:4(n-3)	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1 ¹
20:5(n-3)	10,9 ± 3,2	1,3 ± 0,4 ²	9,0 ± 1,0	1,0 ± 0,1 ³
22:4(n-6)	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,0 ^c	nd ²
22:5(n-6)	0,2 ± 0,1	tr	0,4 ± 0,1	tr ²
22:5(n-3)	1,3 ± 0,3	0,7 ± 0,2 ¹	2,8 ± 0,3 ^b	0,6 ± 0,2 ³
22:6(n-3)	14,1 ± 3,0	5,2 ± 1,5 ²	15,9 ± 3,4	4,6 ± 1,2 ²
No identificados	1,6 ± 0,4	2,3 ± 0,7	1,9 ± 0,4	0,7 ± 0,2
Total saturados*	55,9 ± 9,8	44,5 ± 6,8	47,2 ± 3,9	41,5 ± 3,0
Total MUFA**	11,6 ± 2,5	17,1 ± 3,1	16,7 ± 2,5	18,5 ± 1,5
Total PUFA***	31,0 ± 2,6	36,1 ± 7,8	34,1 ± 5,1	39,3 ± 2,3
Total (n-6)	4,0 ± 1,0	27,0 ± 6,4 ²	5,5 ± 0,3	30,7 ± 3,3 ³
Total (n-3)	26,8 ± 2,1	9,0 ± 0,9 ²	28,2 ± 5,1	8,2 ± 1,1 ²
(n-3)/(n-6)	6,4 ± 1,6	0,3 ± 0,1 ³	5,1 ± 1,1	0,3 ± 0,1 ³
Total (n-3) HUFA	26,7 ± 2,0	7,4 ± 0,6 ²	28,1 ± 5,0	6,3 ± 1,6 ²

Valores expresados como media ± DE (n=3). Cada réplica representa la mezcla de intestino de 6 peces. nd, no detectado; tr, valor <0,05%; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados ($\geq C_{20}$ y ≥ 3 dobles enlaces). Dentro de una misma fila, diferencias significativas entre pares de datos son expresadas como: ¹ P<0,05, ² P<0,01, ³ P<0,001, para comparaciones entre el mismo segmento intestinal de individuos alimentados con la DC o DD, y como: ^a P<0,05, ^b P<0,01, ^c P<0,001, para comparaciones entre intestino anterior y posterior de individuos alimentados con la misma dieta. *incluye 15:0, 19:0, 20:0 y 22:0; ** incluye 15:1, 20:1, 22:1 y 24:1; *** incluye 16:3.

Tabla 4.3.15. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de la fosfatidiletanolamina del intestino anterior y posterior de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)

Ácidos grasos	Intestino anterior		Intestino posterior	
	DC	DD	DC	DD
16:0DMA	3,7 ± 1,0	2,3 ± 0,3	5,0 ± 1,1	3,3 ± 0,7
16:0	13,8 ± 3,2	9,3 ± 1,4	7,3 ± 0,3 ^b	6,9 ± 1,1
16:1(n-9+n-7)	1,2 ± 0,4	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,2
17:0	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,0 ¹
16:3	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1
18:0DMA	5,3 ± 1,3	4,1 ± 0,2	8,9 ± 1,8 ^a	8,1 ± 2,0 ^a
18:1(n-9+n-7)DMA	3,3 ± 0,6	3,5 ± 0,3	4,0 ± 0,7	3,4 ± 0,6
18:0	17,4 ± 2,2	18,2 ± 0,1	15,7 ± 1,6	16,4 ± 2,2
18:1(n-9)	4,6 ± 0,1	8,1 ± 1,4 ²	3,1 ± 0,1 ^c	5,7 ± 1,3 ¹
18:1(n-7)	1,8 ± 0,1	2,4 ± 0,4 ¹	1,5 ± 0,1 ^a	2,0 ± 0,3 ¹
18:2(n-9)	nd	nd	0,1 ± 0,1	nd
18:2(n-6)	1,0 ± 0,3	13,5 ± 2,7 ³	1,2 ± 0,2	11,9 ± 3,5 ³
18:3(n-6)	nd	tr	0,1 ± 0,1	nd
18:3(n-3)	nd	0,7 ± 0,2	nd	0,6 ± 0,2
18:4(n-3)	tr	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	nd
20:2(n-6)	nd	0,5 ± 0,1	nd	0,5 ± 0,1
20:3(n-6)	nd	0,4 ± 0,1	tr	0,4 ± 0,0 ³
20:4(n-6)	4,3 ± 0,7	2,6 ± 0,5 ¹	4,0 ± 0,5	2,5 ± 0,4 ¹
20:3(n-3)	nd	0,1 ± 0,1	nd	0,2 ± 0,0
20:4(n-3)	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,1
20:5(n-3)	6,9 ± 1,0	3,4 ± 0,6 ²	6,4 ± 0,1	3,0 ± 0,4 ³
22:4(n-6)	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,0 ^c	0,3 ± 0,1 ¹
22:5(n-6)	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,6 ± 0,1
22:5(n-3)	2,8 ± 0,2	2,3 ± 0,2 ¹	4,2 ± 0,4 ^b	2,8 ± 0,3 ¹
22:6(n-3)	27,0 ± 5,4	21,6 ± 4,1	30,7 ± 2,3	25,7 ± 2,4
No identificados	3,0 ± 0,5	2,5 ± 0,4	2,9 ± 0,4	2,2 ± 0,3
Total saturados*	33,0 ± 3,3	29,2 ± 1,4	24,6 ± 1,9 ^a	24,8 ± 3,2
Total MUFA**	7,8 ± 0,2	11,7 ± 1,8 ¹	6,1 ± 0,2 ^c	9,3 ± 1,6 ¹
Total DMA	12,3 ± 3,1	9,9 ± 1,0	17,9 ± 3,3	14,7 ± 3,5
Total PUFA	43,9 ± 7,0	46,7 ± 3,1	48,5 ± 2,0	49,1 ± 1,7
Total (n-6)	6,1 ± 0,6	17,8 ± 2,6 ²	6,5 ± 0,4	16,2 ± 3,9 ²
Total (n-3)	37,1 ± 6,2	28,5 ± 4,1	41,6 ± 1,8	32,4 ± 2,2 ²
(n-3)/(n-6)	6,0 ± 0,7	1,6 ± 0,5 ³	6,4 ± 0,4	2,1 ± 0,6 ³
Total (n-3) HUFA	37,1 ± 6,3	27,8 ± 4,4	41,5 ± 1,9	31,8 ± 2,5 ²

Valores expresados como media ± DE (n=3). Cada réplica representa la mezcla de intestino de 6 peces. nd, no detectado; tr, valor <0,05%; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; DMA, dimetilacetil; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados (≥C₂₀ y ≥3 dobles enlaces). Dentro de una misma fila, diferencias significativas entre pares de datos son expresadas como: ¹ P<0,05, ² P<0,01, ³ P<0,001, para comparaciones entre el mismo segmento intestinal de individuos alimentados con la DC o DD, y como: ^a P<0,05, ^b P<0,01, ^c P<0,001, para comparaciones entre intestino anterior y posterior de individuos alimentados con la misma dieta. * incluye 14:0, 15:0, 19:0 y 20:0; ** incluye 20:1 y 24:1.

Tabla 4.3.16. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de la fosfatidilserina del intestino anterior y posterior de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)

Ácidos grasos	Intestino anterior		Intestino posterior	
	DC	DD	DC	DD
16:0	15,7 ± 1,7	11,0 ± 2,6 ¹	10,3 ± 0,6 ^b	7,8 ± 1,0 ¹
16:1(n-9+n-7)	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,1
17:0	1,6 ± 0,1	1,0 ± 0,3 ¹	1,3 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,1 ¹
18:0	55,8 ± 3,0	46,3 ± 5,2 ¹	46,9 ± 1,6 ^a	45,2 ± 2,4
18:1(n-9)	3,9 ± 1,0	7,2 ± 1,6 ¹	4,0 ± 0,4	5,6 ± 1,3
18:1(n-7)	2,3 ± 0,5	2,0 ± 0,4	1,8 ± 0,4	1,7 ± 0,2
18:2(n-9)	nd	nd	0,2 ± 0,0 ^c	0,2 ± 0,0 ^a
18:2(n-6)	1,5 ± 0,2	9,4 ± 2,7 ³	1,9 ± 0,3	9,8 ± 1,4 ³
18:3(n-6)	tr	nd	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1
19:0	1,0 ± 0,0	0,7 ± 0,1 ¹	1,2 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,2
18:3(n-3)	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,1 ²	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1 ¹
18:4(n-3)	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1
20:0	0,6 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,2
20:1(n-11+n-9)	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1
20:2(n-9)	nd	nd	nd	0,1 ± 0,1
20:2(n-6)	0,1 ± 0,1	0,7 ± 0,2 ²	nd	0,7 ± 0,1 ¹
20:3(n-6)	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1 ¹	0,2 ± 0,0	0,6 ± 0,2 ¹
20:4(n-6)	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0,3	0,4 ± 0,0 ²
20:3(n-3)	nd	0,2 ± 0,1	nd	0,2 ± 0,0 ¹
20:4(n-3)	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,0 ^a	tr ^{1,a}
20:5(n-3)	1,0 ± 0,2	0,5 ± 0,1 ²	1,3 ± 0,2	0,4 ± 0,1 ³
22:4(n-6)	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,2	0,5 ± 0,1 ^b	0,4 ± 0,1
22:5(n-6)	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,7 ± 0,1 ^b	0,5 ± 0,1 ¹
22:5(n-3)	1,1 ± 0,3	1,0 ± 0,2	2,8 ± 0,2 ^b	1,5 ± 0,2 ^{3,a}
22:6(n-3)	8,8 ± 2,0	10,4 ± 2,0	18,9 ± 2,6 ^b	16,0 ± 0,4 ^b
No identificados	2,4 ± 0,3	4,3 ± 1,3	3,3 ± 0,8	2,8 ± 0,4
Total saturados*	75,2 ± 4,3	60,5 ± 7,3 ¹	60,7 ± 2,3 ^b	56,3 ± 3,3
Total MUFA**	7,5 ± 1,6	10,4 ± 1,1	7,3 ± 1,0	8,7 ± 1,6
Total PUFA***	14,8 ± 3,0	24,8 ± 5,7 ¹	28,6 ± 2,8 ^b	32,2 ± 1,5
Total (n-6)	2,8 ± 0,6	11,5 ± 3,3 ²	4,5 ± 0,2 ^b	12,6 ± 1,6 ³
Total (n-3)	11,9 ± 2,5	13,3 ± 2,3	23,5 ± 2,9 ^b	19,0 ± 0,2 ^{1,a}
(n-3)/(n-6)	4,3 ± 0,0	1,2 ± 0,2 ³	5,2 ± 0,7 ^a	1,5 ± 0,2 ³
Total (n-3) HUFA	11,5 ± 2,5	12,6 ± 2,2	23,2 ± 2,9 ^b	18,1 ± 0,4 ^{1,a}

Valores expresados como media ± DE (n=3). Cada réplica representa la mezcla de intestino de 6 peces. nd, no detectado; tr, valor <0,05%; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados ($\geq C_{20}$ y ≥ 3 dobles enlaces). Dentro de una misma fila, diferencias significativas entre pares de datos son expresadas como: ¹ P<0,05, ² P<0,01, ³ P<0,001, para comparaciones entre el mismo segmento intestinal de individuos alimentados con la DC o DD, y como: ^a P<0,05, ^b P<0,01, ^c P<0,001, para comparaciones entre intestino anterior y posterior de individuos alimentados con la misma dieta. * incluye 14:0 y 15:0; ** incluye 22:1 y 24:1; *** incluye 16:3.

Tabla 4.3.17. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) del **fosfatidilinositol** del intestino anterior y posterior de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)

Ácidos grasos	Intestino anterior		Intestino posterior	
	DC	DD	DC	DD
14:0	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,2
15:0	1,0 ± 0,2	1,6 ± 0,3 ¹	1,0 ± 0,1	0,7 ± 0,2 ^a
16:0	14,9 ± 3,5	18,3 ± 3,7	9,3 ± 0,3 ^a	13,0 ± 1,2 ²
16:1(n-9+n-7)	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,3 ± 0,2
17:0	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,8 ± 0,1 ¹
18:0	24,4 ± 3,0	22,1 ± 5,1	28,1 ± 0,8	22,9 ± 1,7 ²
18:1(n-9)	7,2 ± 0,1	10,3 ± 2,4 ¹	6,5 ± 0,4	8,7 ± 1,0 ¹
18:1(n-7)	3,2 ± 0,9	2,0 ± 0,6	1,8 ± 0,2	1,8 ± 0,4
18:2(n-9)	nd	0,1 ± 0,1	nd	0,1 ± 0,1
18:2(n-6)	3,8 ± 1,0	12,9 ± 3,9 ²	3,8 ± 0,6	14,7 ± 2,7 ³
18:3(n-6)	nd	nd	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
18:3(n-3)	0,1 ± 0,1	0,8 ± 0,2 ²	0,2 ± 0,1	1,0 ± 0,3 ¹
18:4(n-3)	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,2	1,3 ± 0,3 ¹
20:2(n-6)	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,1 ¹	nd	1,1 ± 0,2 ^{1,a}
20:3(n-6)	0,2 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,9 ± 0,2 ^{2,a}
20:4(n-6)	5,8 ± 0,5	4,1 ± 0,3 ²	13,0 ± 1,8 ^b	4,8 ± 1,1 ²
20:3(n-3)	nd	nd	nd	0,2 ± 0,2
20:4(n-3)	0,7 ± 0,4	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1
20:5(n-3)	4,9 ± 1,2	2,0 ± 0,5 ²	7,8 ± 1,4	1,8 ± 0,6 ²
22:4(n-6)	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,1 ¹
22:5(n-6)	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,1 ¹	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,0
22:5(n-3)	2,3 ± 0,3	1,1 ± 0,3 ²	2,7 ± 0,3	1,2 ± 0,1 ²
22:6(n-3)	19,0 ± 5,3	8,0 ± 2,2 ¹	13,5 ± 0,8	10,2 ± 0,9 ²
No identificados	5,9 ± 1,6	8,7 ± 2,1	5,0 ± 0,8	9,8 ± 1,1
Total saturados*	42,8 ± 7,0	45,0 ± 4,4	40,7 ± 0,9	38,9 ± 0,7 ^{1,a}
Total MUFA**	12,9 ± 1,4	14,4 ± 3,3	11,0 ± 0,7	12,5 ± 0,9
Total PUFA***	39,5 ± 3,5	31,9 ± 2,0 ¹	43,3 ± 1,6	38,9 ± 1,4 ^{1,a}
Total (n-6)	10,5 ± 2,2	18,1 ± 3,8 ¹	17,7 ± 1,6 ^a	22,5 ± 1,6 ¹
Total (n-3)	27,7 ± 4,3	13,4 ± 3,6 ²	25,4 ± 0,8	16,2 ± 0,9 ³
(n-3)/(n-6)	2,7 ± 0,4	0,7 ± 0,1 ²	1,4 ± 0,1 ^b	0,7 ± 0,1 ²
Total (n-3) HUFA	27,0 ± 4,1	11,9 ± 3,4 ²	24,6 ± 0,9	13,9 ± 1,3 ³

Valores expresados como media ± DE (n=3). Cada réplica representa la mezcla de intestino de 6 peces. nd, no detectado; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados ($\geq C_{20}$ y ≥ 3 dobles enlaces). Dentro de una misma fila, diferencias significativas entre pares de datos son expresadas como: ¹ P<0,05, ² P<0,01, ³ P<0,001, para comparaciones entre el mismo segmento intestinal de individuos alimentados con la DC o DD, y como: ^a P<0,05, ^b P<0,01, para comparaciones entre intestino anterior y posterior de individuos alimentados con la misma dieta. * incluye 19:0, 20:0, 22:0 y 24:0; ** incluye 20:1, 22:1 y 24:1; *** incluye 16:3.

Tabla 4.3.18. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de los triglicéridos del intestino anterior y posterior de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)

Ácidos grasos	Intestino anterior		Intestino posterior	
	DC	DD	DC	DD
14:0	5,5 ± 0,3	2,0 ± 0,6 ³	5,4 ± 0,2	2,3 ± 0,6 ²
16:0	24,7 ± 0,9	17,0 ± 3,3 ¹	24,7 ± 1,9	23,7 ± 6,4
16:1(n-9+n-7)	6,1 ± 0,2	2,4 ± 0,6 ³	6,4 ± 0,4	2,4 ± 0,6 ³
17:0	1,0 ± 0,1	0,7 ± 0,1 ¹	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,2
16:3	0,8 ± 0,1	0,4 ± 0,1 ³	0,7 ± 0,0	0,4 ± 0,0 ¹
18:0	11,7 ± 0,8	9,0 ± 0,9 ¹	9,3 ± 2,0	11,5 ± 2,8
18:1*	28,1 ± 1,0	34,9 ± 2,2 ¹	26,3 ± 1,2	29,9 ± 3,3
18:2(n-9)	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,1
18:2(n-6)	1,8 ± 0,6	23,7 ± 5,3 ³	3,5 ± 1,0	18,5 ± 4,1 ²
18:3(n-6)	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0 ²	0,2 ± 0,1	nd ²
18:3(n-3)	0,5 ± 0,0	3,9 ± 1,0 ³	0,6 ± 0,1	3,3 ± 0,6 ³
18:4(n-3)	1,0 ± 0,1	0,1 ± 0,1 ³	1,0 ± 0,1	0,2 ± 0,1 ³
20:1(n-11+n-9)	1,5 ± 0,5	0,6 ± 0,2 ¹	2,5 ± 0,7	0,9 ± 0,3 ¹
20:2(n-9)	0,1 ± 0,1	nd	0,3 ± 0,0 ^a	tr ¹
20:2(n-6)	nd	0,2 ± 0,0 ²	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0
20:4(n-6)	0,6 ± 0,1	0,1 ± 0,0 ²	0,4 ± 0,0	nd ¹
20:3(n-3)	nd	tr	nd	0,1 ± 0,1
20:4(n-3)	0,5 ± 0,1	tr ²	0,5 ± 0,0	0,1 ± 0,1 ²
20:5(n-3)	4,6 ± 1,4	0,4 ± 0,2 ²	3,5 ± 0,5	0,3 ± 0,1 ³
22:1(n-11+n-9)	1,0 ± 0,3	0,3 ± 0,1 ¹	2,2 ± 0,6 ^a	0,8 ± 0,3 ¹
22:4(n-6)	0,2 ± 0,0	nd ¹	0,2 ± 0,0	nd ²
22:5(n-6)	nd	nd	0,1 ± 0,1	nd
22:5(n-3)	1,3 ± 0,3	0,1 ± 0,1 ²	1,4 ± 0,1	0,2 ± 0,2 ³
22:6(n-3)	3,9 ± 0,4	0,5 ± 0,2 ²	5,6 ± 1,0	1,1 ± 0,4 ²
No identificados	2,3 ± 0,3	2,0 ± 0,4	1,7 ± 0,3	2,0 ± 0,2
Total saturados**	43,7 ± 1,2	29,6 ± 4,9 ²	41,4 ± 4,3	39,3 ± 9,6
Total MUFA***	37,3 ± 1,6	38,4 ± 1,6	37,6 ± 2,2	34,3 ± 3,3
Total PUFA****	16,6 ± 1,9	30,0 ± 4,9 ¹	19,2 ± 2,2	24,4 ± 5,8
Total (n-6)	2,8 ± 0,5	24,2 ± 5,3 ³	4,4 ± 1,2	18,7 ± 6,1 ¹
Total (n-3)	12,0 ± 2,3	5,2 ± 1,1 ²	12,8 ± 1,3	5,2 ± 1,6 ²
(n-3)/(n-6)	4,4 ± 1,5	0,2 ± 0,1 ²	3,0 ± 0,5	0,3 ± 0,1 ²
Total (n-3) HUFA	10,5 ± 2,1	1,1 ± 0,3 ³	11,2 ± 1,1	1,7 ± 0,6 ²

Valores expresados como media ± DE (n=3). Cada réplica representa la mezcla de intestino de 6 peces. nd, no detectado; tr, valor <0,05%; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; HUFA, ácidos grasos altamente insaturados ($\geq C_{20}$ y ≥ 3 dobles enlaces). Dentro de una misma fila, diferencias significativas entre pares de datos son expresadas como: ¹ P<0,05, ² P<0,01, ³ P<0,001, para comparaciones entre el mismo segmento intestinal de individuos alimentados con la DC o DD, y como: ^a P<0,05, para comparaciones entre intestino anterior y posterior de individuos alimentados con la misma dieta. * predominantemente 18:1(n-9); ** incluye 15:0, 19:0, 20:0, 22:0 y 24:0; *** incluye 14:1, 15:1 y 24:1; **** incluye 16:2 y 16:4.

4.4. Transporte transepitelial de cloruro, sodio y glucosa.

4.4.1. Parámetros bioeléctricos y movimientos unidireccionales y netos de cloruro y sodio en los segmentos anterior y posterior del intestino. Efectos de la adición de teofilina y forskolina. Niveles de AMPc intracelular.

Parámetros bioeléctricos

Una vez montadas las secciones de ambos segmentos de intestino en la cámara de Ussing en presencia de la solución Ringer (ver Material y métodos, págs. 32-36), se esperaba unos 20 min hasta alcanzar la estabilidad del tejido antes de iniciar el experimento. A partir de ese momento (t_0), se registraban las características eléctricas del epitelio intestinal (diferencia de potencial transmural (DP), intensidad de corriente de cortocircuito (I_{cc}) y conductancia tisular (G_t)), a intervalos de 20 min, durante un periodo de 2 horas (t_{120}), con el fin de determinar su evolución a lo largo del tiempo. Se analizó el efecto de la dieta sobre los parámetros eléctricos, comparando pares de valores obtenidos en un mismo segmento de intestino de peces que ingirieron la DD o la DC, así como las diferencias existentes entre el tramo proximal y distal de los ejemplares alimentados con una misma dieta experimental.

Los registros eléctricos obtenidos a lo largo del periodo experimental de 2 horas, aparecen reflejados en la **Figura 4.3** para el segmento anterior, y en la **Figura 4.4** para el segmento posterior de peces alimentados con la dieta control (a) o con la dieta deficiente en HUFA (b). Debemos reseñar que para facilitar la comprensión de los resultados, las comparaciones estadísticas entre IA e IP de doradas alimentadas con la misma dieta experimental no se han reflejado en la presente memoria aunque sí se hace referencia en el texto.

Bajo nuestras condiciones experimentales, la DP permaneció estadísticamente estable a lo largo del tiempo en los dos segmentos de intestino estudiados, tanto en los individuos que ingirieron la dieta que carecía de AP, como en los que tomaron la que contenía el aceite de origen marino. Así, en el IA de los peces alimentados con la DD, la DP se mantuvo estable entre $1,12 \pm 0,12$ mV y $0,86 \pm 0,09$ mV al inicio (t_0) y final (t_{120}) del periodo de incubación, respectivamente, mientras que en el de los peces

del grupo DC, los valores promediaron $1,02 \pm 0,15$ mV al comienzo de los registros y $0,81 \pm 0,08$ mV, al final de los mismos. En el IP, se repitió la tendencia observada en el segmento proximal, con un rango similar de oscilación de la DP, entre $1,18 \pm 0,14$ mV (t_0) y $0,97 \pm 0,11$ mV (t_{120}) en el de los ejemplares que ingirieron la DD, y de $0,93 \pm 0,15$ (t_0) y $0,77 \pm 0,13$ mV (t_{120}) en el de los que se alimentaron con la DC. En todas las mediciones realizadas, el lado serosal del tejido fue eléctricamente positivo con respecto al lado mucosal.

La deficiencia de AGE en el alimento no alteró la DP en ninguno de los dos segmentos de intestino. De igual forma, tampoco varió significativamente, para ninguno de los tratamientos dietarios, el valor de la DP entre el segmento anterior y posterior del intestino (**Figuras 4.3 y 4.4**).

Al igual que ocurrió con la DP, la lcc de ambos tramos intestinales permaneció invariable a lo largo del periodo experimental cuando fueron incubados en condiciones control, independientemente de la dieta ingerida por el animal. En el IA de los peces alimentados con la DD, los valores de lcc fueron $11,33 \pm 2,40$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ a tiempo 0, y $8,96 \pm 2,78$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, tras 120 min de experimento. En este mismo segmento de peces alimentados con la DC, los registros se mantuvieron entre $10,01 \pm 1,71$ y $8,51 \pm 1,49$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, al principio y final del ensayo, respectivamente. En el IP de los ejemplares que ingirieron la dieta sin AP, la lcc se elevó hasta $45,88 \pm 8,21$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (t_0) y $29,76 \pm 5,40$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (t_{120}), mientras que en el de los juveniles del grupo control, promedió $13,75 \pm 2,51$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ y $12,38 \pm 1,68$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ al inicio y final del registro, respectivamente.

Por lo tanto, la deficiencia dietaria de HUFA incrementó significativamente la lcc en el tramo posterior del intestino para todos los tiempos ensayados (**Figura 4.4**), no afectando al tramo anterior (**Figura 4.3**). Este efecto en el segmento posterior de los peces que recibieron la DD, dio lugar a que la lcc fuera mayor que la registrada en el segmento anterior de los peces que se alimentaron con esa misma dieta (**Figura 4.4.b vs. Figura 4.3.b**), no siendo significativas, por el contrario, las diferencias encontradas al comparar la lcc a lo largo del eje antero-posterior del intestino de doradas que ingirieron la DC (**Figura 4.4.a vs. Figura 4.3.a**).

La Gt del IA se mantuvo estable a lo largo del periodo experimental, independientemente de la dieta ingerida, con medias próximas a 10 mS/cm² en ejemplares que ingirieron la DD, y de 11,11 ± 2,73 (t₀) y 7,76 ± 2,28 mS/cm² (t₁₂₀), en los que tomaron la DC. El IP tampoco experimentó variaciones temporales significativas de la Gt, oscilando entre 48,83 ± 7,72 (t₀) y 37,39 ± 7,31 mS/cm² (t₁₂₀) en el grupo DD, y entre 24,03 ± 4,29 (t₀) y 16,80 ± 5,08 mS/cm² (t₁₂₀) en el grupo DC.

La composición lipídica de la dieta no afectó significativamente a la Gt del IA de los peces (**Figura 4.3**), aunque sí lo hizo sobre la del segmento posterior, que fue superior para cada tiempo de registro, en los individuos alimentados con la DD con respecto a los que tomaron la DC (**Figura 4.4**). Independientemente de la dieta ingerida, las conductancias tisulares registradas en la sección anterior del intestino de los ejemplares fueron más bajas que las de la sección posterior (**Figura 4.3** vs. **Figura 4.4**), salvo tras 120 min de experimento en los peces DC, donde los valores obtenidos no mostraron diferencias significativas.

Movimientos transepiteliales de cloruro

En la **Figura 4.5** se cuantifica el transporte de cloruro a través del tracto intestinal de juveniles de dorada alimentados con las dos dietas experimentales.

Cuando los peces fueron alimentados con la DD, no hubo absorción neta de cloruro en el tramo proximal del intestino ($J_{\text{neto}} = 0,46 \pm 0,34 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$), debido a que los movimientos del ión en ambos sentidos del tejido fueron iguales, $5,29 \pm 0,74 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ para el flujo del lado mucosal al serosal, y $4,83 \pm 0,94$, para el flujo en sentido serosa-mucosa. En las doradas a las que se suministró la DC, el movimiento unidireccional en sentido mucosa-serosa ($J_{\text{m-s}} = 7,96 \pm 0,94 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$) fue superior al alcanzado en el grupo DD, mientras que el de serosa a mucosa ($J_{\text{s-m}}$) no resultó modificado ($3,25 \pm 0,47 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$), dando lugar a un flujo neto (J_{neto}) absortivo de $4,71 \pm 0,31 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$.

Independientemente de la dieta recibida, los flujos unidireccionales de cloruro en el segmento posterior del tracto intestinal de los juveniles de dorada mostraron valores superiores a los obtenidos en el tramo anterior. Los ejemplares del grupo DD presentaron un flujo neto nulo en el IP ($-0,53 \pm 0,46 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$), debido a la igualdad

en los flujos unidireccionales que lo originaron ($J_{m-s} = 12,25 \pm 0,96 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ y $J_{s-m} = 12,78 \pm 1,43 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$). Por el contrario, en los juveniles del grupo DC, el J_{m-s} fue mayor que el J_{s-m} ($10,85 \pm 0,90 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ vs. $7,19 \pm 0,52 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$, respectivamente), dando lugar a una absorción neta de $3,66 \pm 0,29 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$. Esta absorción neta es de menor magnitud que la obtenida en el intestino anterior de peces alimentados con la misma dieta ($P < 0,05$).

Movimientos transepiteliales de sodio

Los flujos unidireccionales y netos de sodio a través del intestino de juveniles de ambos grupos experimentales aparecen reflejados en la **Figura 4.6**

De igual manera a lo ocurrido con el cloruro, los peces alimentados con la DD, no mostraron absorción neta de sodio en el segmento anterior del intestino ($J_{\text{neto}} = -0,18 \pm 0,30 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$) ya que los movimientos unidireccionales del ión a través del tejido fueron iguales ($4,66 \pm 0,52 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ para el J_{m-s} y $4,84 \pm 0,85$ para el J_{s-m}). Sin embargo, en los juveniles alimentados con la DC, se registró una absorción neta de $3,78 \pm 0,20 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$, originada por un flujo de mucosa a serosa de $6,95 \pm 0,47 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ y un flujo en sentido contrario de $3,17 \pm 0,38 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$.

Dentro de cada lote experimental, los movimientos unidireccionales de sodio fueron más elevados en el IP que en el IA, a excepción del flujo de mucosa a serosa en peces alimentados con la dieta formulada con aceite de pescado, que permaneció invariable. Las doradas que tomaron la DD, no mostraron absorción neta en el tramo distal del intestino, debido a un movimiento en sentido mucosa-serosa, de igual proporción que el de serosa a mucosa ($J_{m-s} = 9,40 \pm 1,04 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ y $J_{s-m} = 8,97 \pm 1,16 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$). En los juveniles del grupo DC, el J_{m-s} fue mayor que el J_{s-m} ($8,07 \pm 1,21 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ y $6,15 \pm 0,95 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$, respectivamente), dando lugar a un J_{neto} de $1,92 \pm 0,50 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$, de menor magnitud que el obtenido en el intestino anterior de peces alimentados con la misma dieta ($P < 0,01$).

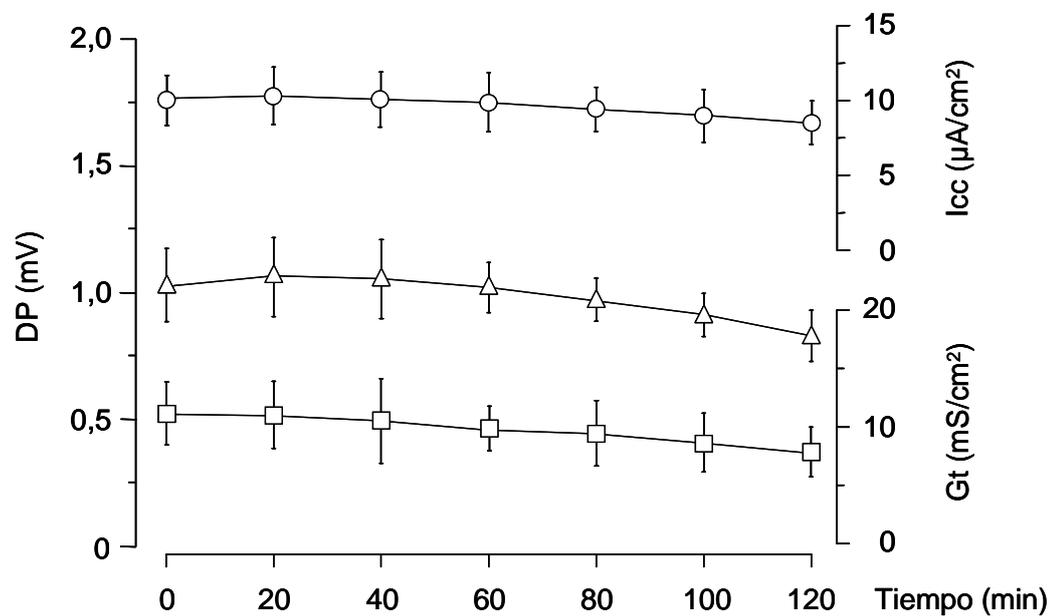
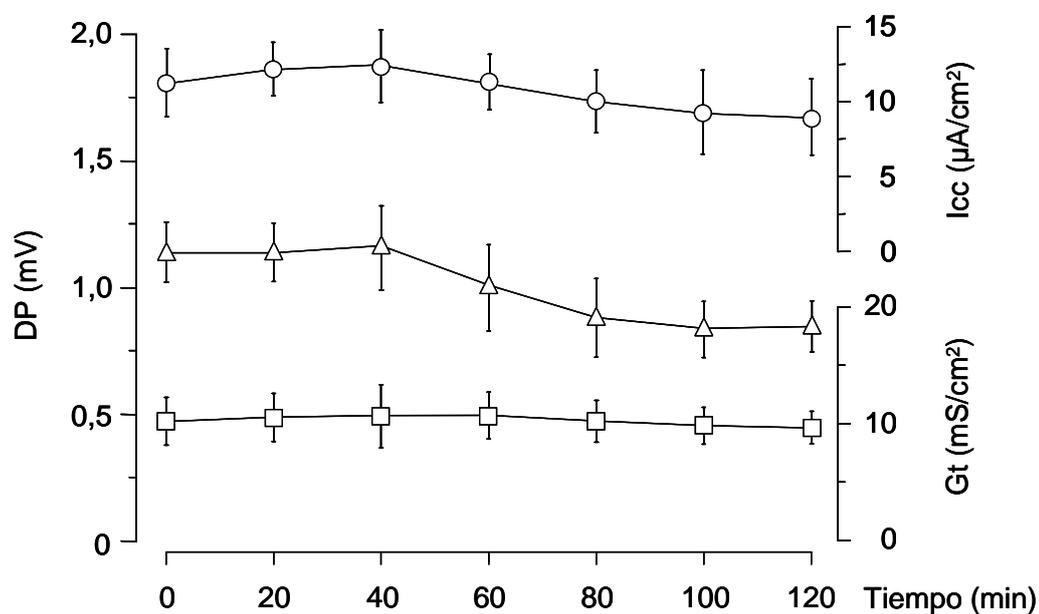
(a) IADC**(b) IADD**

Figura 4.3. Evolución temporal de los parámetros eléctricos en el **intestino anterior** de juveniles de dorada en presencia de la solución Ringer. **(a)** Dieta control, **(b)** dieta deficiente en HUFA. Icc (○), DP (△) y Gt (□). Valores expresados como media \pm EEM (n=9).

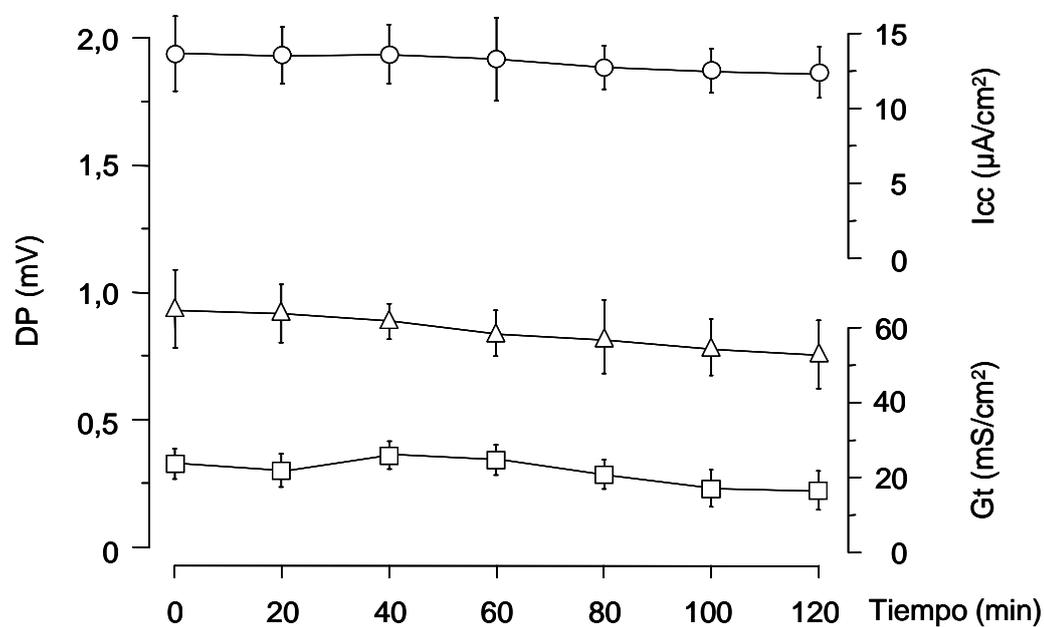
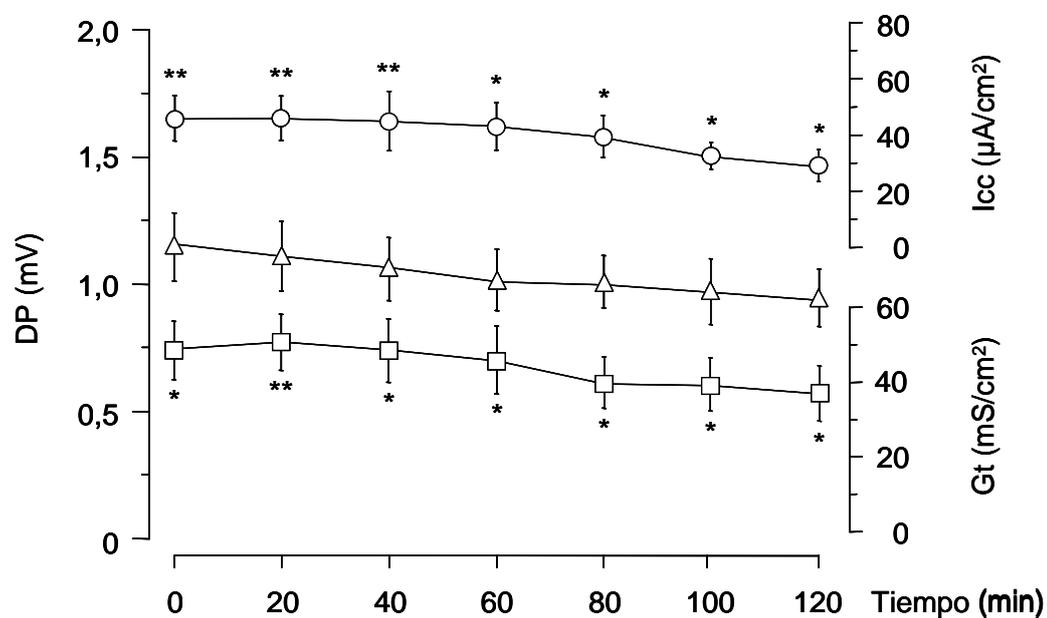
(a) IPDC**(b) IPDD**

Figura 4.4. Evolución temporal de los parámetros eléctricos en el **intestino posterior** de juveniles de dorada en presencia de la solución Ringer. **(a)** Dieta control, **(b)** dieta deficiente en HUFA. Icc (○), DP (△) y Gt (□). Diferencias significativas con la dieta control: * P<0,05, ** P<0,01. Valores expresados como media ± EEM (n=9).

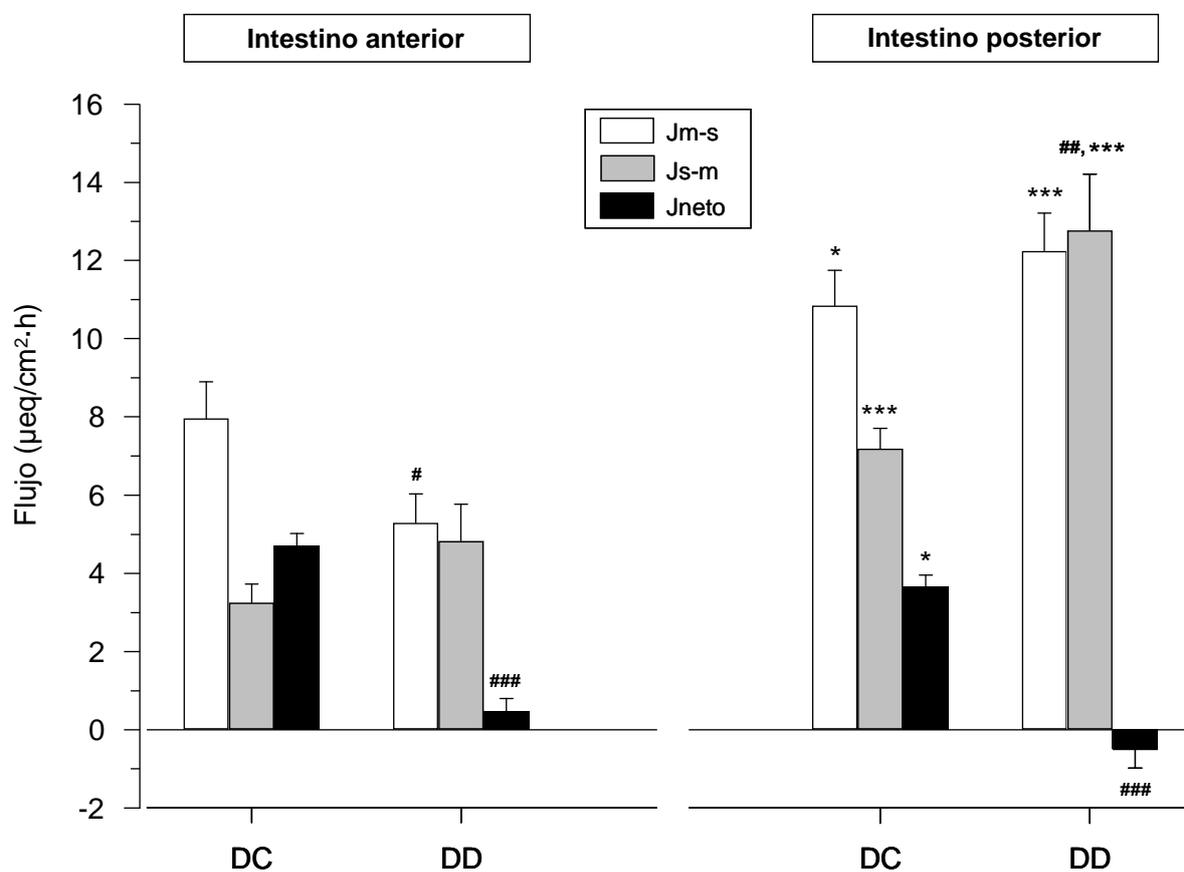


Figura 4.5. Flujos de cloruro a través del intestino anterior y posterior de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD). J_{m-s} , flujo de mucosa a serosa; J_{s-m} , flujo de serosa a mucosa; J_{neto} , flujo neto. Diferencias significativas con el segmento anterior de peces alimentados con la misma dieta: * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$. Diferencias significativas con el mismo segmento de intestino de peces alimentados con la DC: # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$. Valores expresados como media \pm EEM ($n=12$).

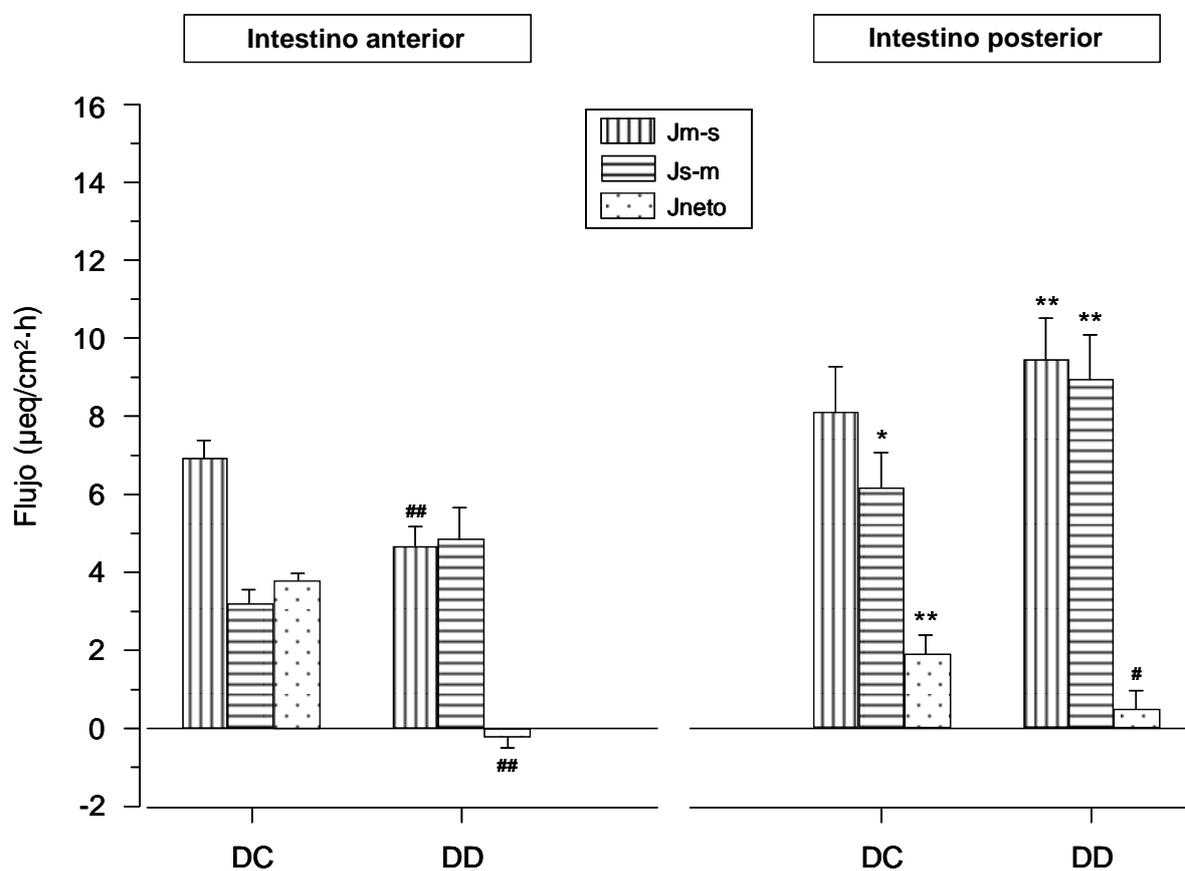


Figura 4.6. Flujos de sodio a través del intestino anterior y posterior de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD). J_{m-s} , flujo de mucosa a serosa; J_{s-m} , flujo de serosa a mucosa; J_{neto} , flujo neto. Diferencias significativas con el segmento anterior de peces alimentados con la misma dieta: * $P<0,05$, ** $P<0,01$. Diferencias significativas con el mismo segmento de intestino de peces alimentados con la DC: # $P<0,05$, ## $P<0,01$. Valores expresados como media \pm EEM ($n=10$).

ADICIÓN DE TEOFILINA (3 mM).

La teofilina es un alcaloide que incrementa los niveles de AMPc intracelular al inhibir la fosfodiesterasa, enzima que cataliza la hidrólisis del enlace ribosa-fosfato del AMPc, transformándolo en AMP (Pansu y col., 1989). Al igual que otras sustancias que incrementan los niveles de AMPc, tales como prostaglandinas, VIP (“vasoactive intestinal peptide”) o toxina del cólera, la teofilina inhibe la absorción de fluidos y electrolitos pudiendo producir incluso secreción de los mismos (Field y col., 1980; Gazitúa y Robinson, 1982; Smith, 1983).

Efectos sobre los parámetros bioeléctricos

Los efectos de la adición de teofilina sobre las características eléctricas del intestino de juveniles alimentados con la dieta control (a) o deficiente en HUFA (b), aparecen reflejados en la **Figura 4.7** para la sección anterior, y en la **Figura 4.8** para la sección posterior. Una vez alcanzada la estabilización del epitelio (t_0), se tomaron registros durante 30 min de la DP, Icc y Gt del tejido en presencia de la solución Ringer, valores considerados como controles. Transcurrido este periodo de incubación (t_{30}), se añadió teofilina a ambos lados del segmento intestinal para dar una concentración final de 3 mM en cada pocillo de la semicámara, y se continuó con los registros durante 60 min adicionales (t_{90}).

La teofilina no alteró los valores de la DP obtenidos en el tramo anterior del intestino de los peces alimentados con la DD, que permanecieron constantes entre $0,87 \pm 0,10$ y $0,71 \pm 0,10$ mV, justo antes (t_{30}) y tras 60 min de incubación en presencia del alcaloide (t_{90}), respectivamente. Por el contrario, en los juveniles que ingirieron la DC, dio lugar a una disminución significativa de este parámetro, desde $0,92 \pm 0,08$ mV (t_{30}) hasta $0,69 \pm 0,08$ mV (t_{90}). En el segmento posterior, se apreció el mismo comportamiento de la DP que el observado en el segmento anterior, es decir, no se manifestó efecto alguno para los ejemplares del grupo DD ($0,96 \pm 0,11$ y $0,88 \pm 0,08$ mV, antes y después de añadir la sustancia, respectivamente), dando lugar a una reducción de la DP en las de las doradas del grupo DC desde $1,07 \pm 0,09$ mV (t_{30}) a $0,79 \pm 0,08$ mV (t_{90}).

La lcc no experimentó variación significativa en el segmento anterior de los individuos de ninguno de los dos grupos experimentales tras la adición de teofilina 3 mM. El rango de la lcc registrada en el IA de los ejemplares que ingirieron la DD osciló entre $8,76 \pm 2,31$ y $9,98 \pm 1,52 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ justo antes y 1 h después de añadir el alcaloide al pocillo de incubación, respectivamente, y entre $9,36 \pm 1,89$ y $7,22 \pm 1,38 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ en el de los juveniles alimentados con la DC. En los peces pertenecientes al grupo DD, el IP presentó una lcc que se mantuvo estable entre $32,50 \pm 3,58$ (t_{30}) y $31,78 \pm 3,28 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (t_{90}), mientras que en el de los que tomaron la DC, tendió a disminuir, aunque no significativamente, desde $14,03 \pm 3,10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ cuando fue incubado en las condiciones iniciales, hasta $6,97 \pm 2,98 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, 60 min más tarde de la adición de la teofilina.

Finalmente, la Gt del segmento anterior de peces alimentados con la dieta deficiente en HUFA experimentó un incremento significativo tras 60 min de incubación en presencia de la teofilina, desde $10,27 \pm 1,23 \text{mS}/\text{cm}^2$ hasta $14,03 \pm 1,19 \text{mS}/\text{cm}^2$, mientras que en el de los que tomaron la dieta control, se mantuvo invariable en medias ligeramente superiores a $10 \text{mS}/\text{cm}^2$. La adición de la teofilina no modificó la Gt en la sección posterior del intestino de las doradas pertenecientes al grupo DD ($51,06 \pm 7,27$ (t_{30}) y $49,87 \pm 7,12 \text{mS}/\text{cm}^2$ (t_{90})), pero sí en la del grupo DC, donde experimentó un incremento después de la incubación con teofilina desde $19,26 \pm 4,37 \text{mS}/\text{cm}^2$ (t_{30}) hasta $31,86 \pm 5,64 \text{mS}/\text{cm}^2$ (t_{90}).

Efectos sobre el transporte de cloruro

Los flujos unidireccionales y netos de cloruro obtenidos en presencia de la solución de trabajo y tras la adición de la teofilina en el tramo proximal y distal del intestino, se representan en la **Figura 4.9** (a) y (b), respectivamente.

La teofilina incrementó los flujos unidireccionales a través del segmento anterior de los peces alimentados con la dieta deficiente en HUFA, aunque el flujo neto resultante permaneció invariable y no distinto de cero ($-1,01 \pm 0,54 \mu\text{eq}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$ y $-1,29 \pm 0,63 \mu\text{eq}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$, sin y con teofilina, respectivamente). En los peces que tomaron la dieta que contenía AP, la absorción neta detectada en condiciones control fue anulada con la incubación en presencia del alcaloide ($J_{\text{neto}} = 4,37 \pm 0,52 \mu\text{eq}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$ y $-1,12 \pm 0,48 \mu\text{eq}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$, respectivamente). Esta pauta se debe tanto a la disminución

del J_{m-s} de $7,82 \pm 0,92 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ a $4,64 \pm 0,85 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$, como al incremento del J_{s-m} , desde $3,45 \pm 0,74 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ hasta $5,76 \pm 0,66 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$.

En la sección distal del intestino de individuos del grupo DD, la teofilina 3 mM no produjo cambios significativos en los movimientos unidireccionales ni netos de cloruro, que permanecieron nulos antes ($-0,45 \pm 0,76 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$) y tras 60 min en presencia del alcaloide ($1,48 \pm 0,94 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$). En el IP de peces alimentados con la DC, la incubación con teofilina no alteró significativamente el J_{m-s} , y dobló el de serosa a mucosa ($6,96 \pm 0,78 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ inicialmente, frente a $14,29 \pm 1,82 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$, tras la adición de teofilina 3mM), anulando la absorción neta de cloruro encontrada en las condiciones iniciales con la solución Ringer ($J_{\text{neto}} = 2,97 \pm 0,49 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ vs. $-1,09 \pm 0,91 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$).

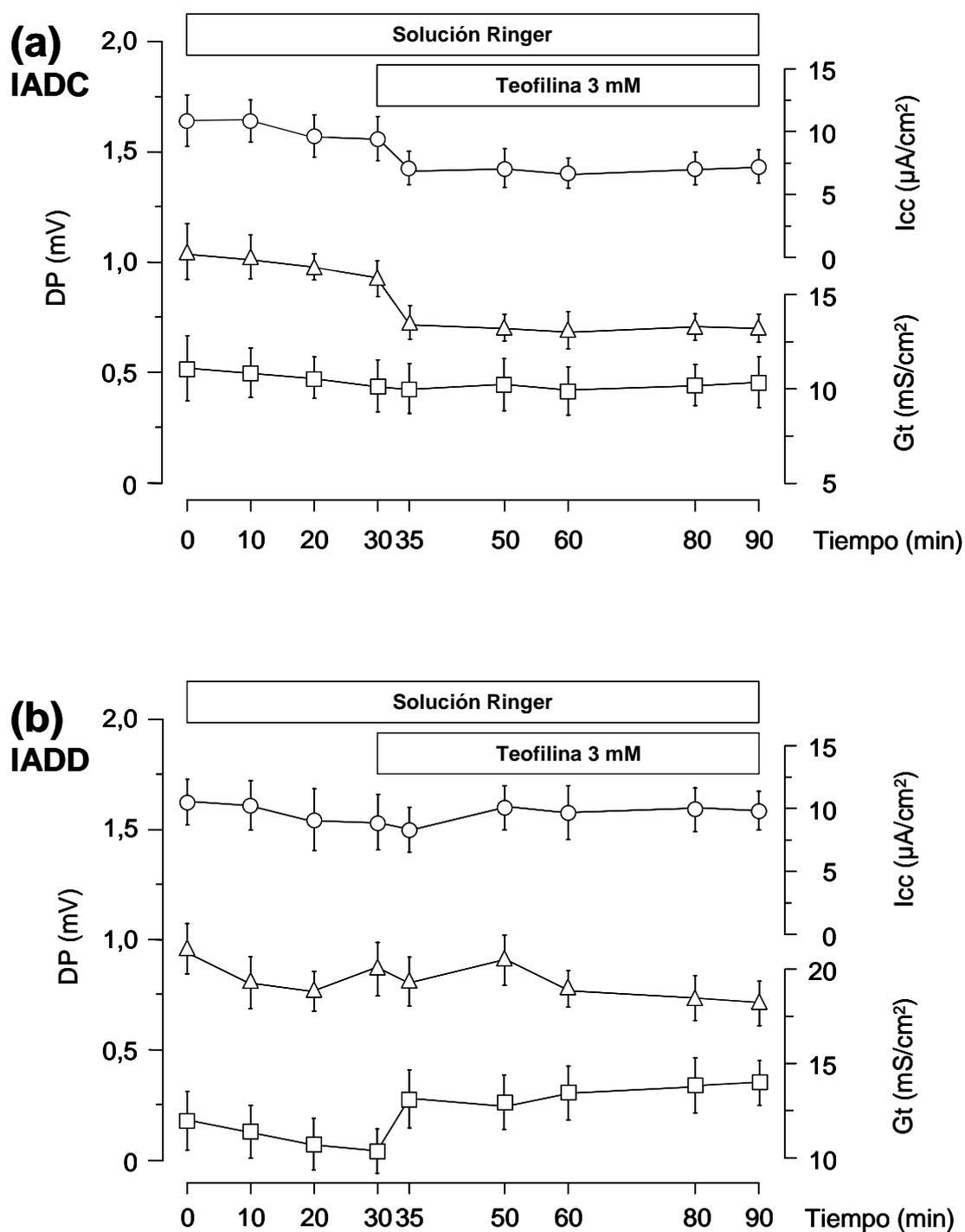


Figura 4.7. Efecto de la adición de teofilina 3 mM sobre los parámetros eléctricos a través del **intestino anterior** de juveniles de dorada. **(a)** Dieta control, **(b)** dieta deficiente en HUFA. Icc (O), DP (Δ) y Gt (\square). Valores expresados como media \pm EEM (n=5).

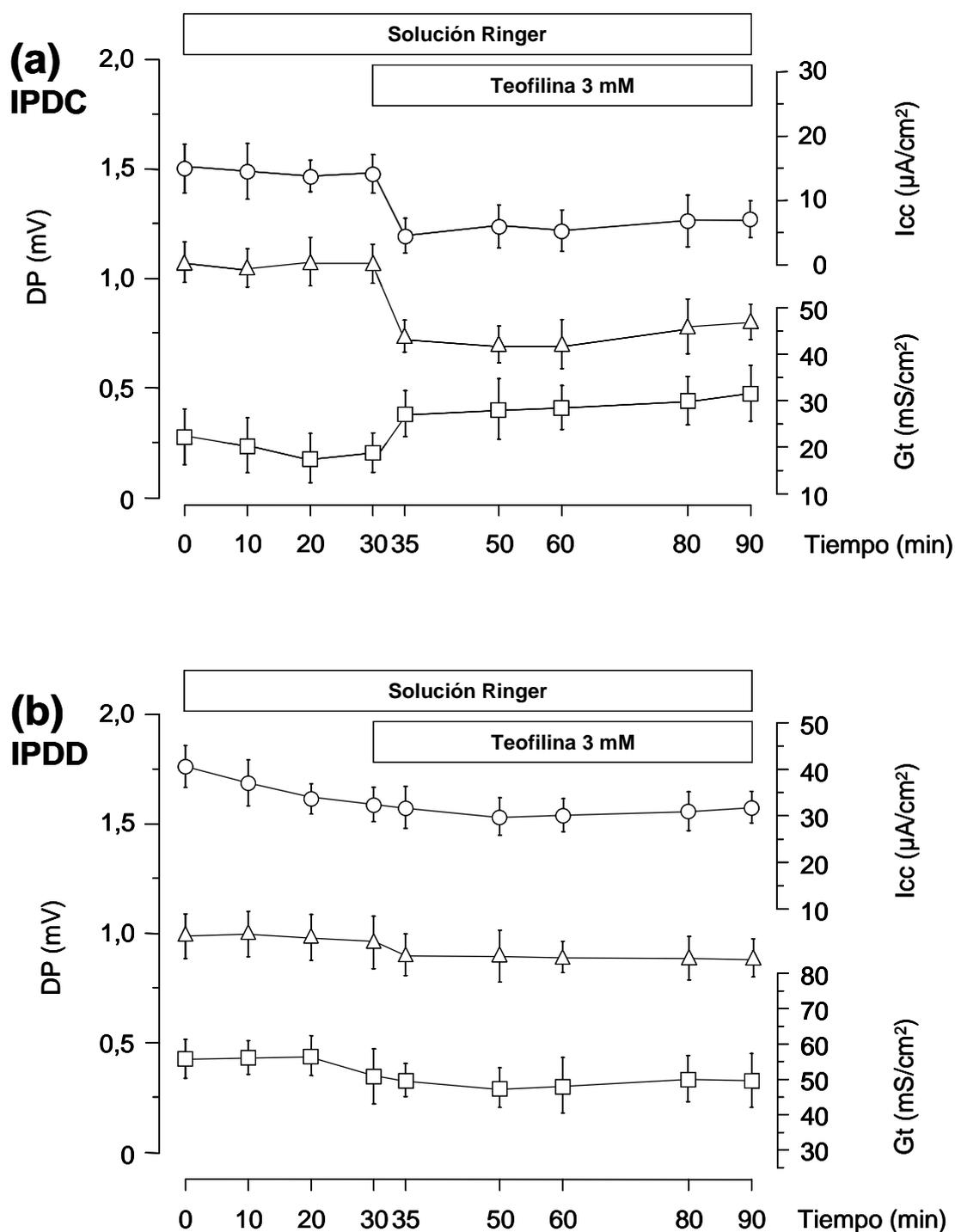


Figura 4.8. Efecto de la adición de teofilina 3 mM sobre los parámetros eléctricos a través del **intestino posterior** de juveniles de dorada. **(a)** Dieta control, **(b)** dieta deficiente en HUFA. Icc (○), DP (△) y Gt (□). Valores expresados como media ± EEM (n=5).

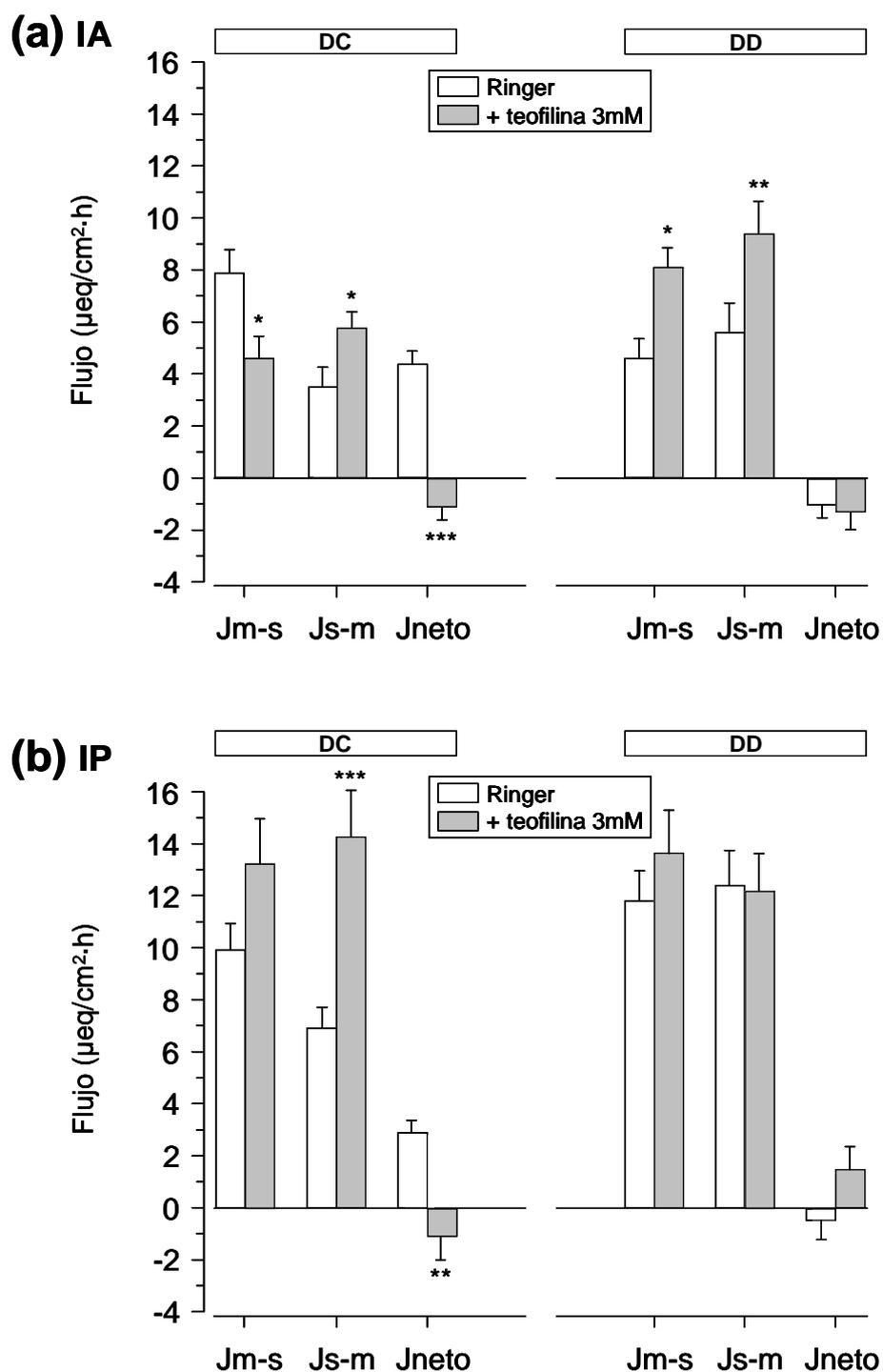


Figura 4.9. Efecto de la adición de teofilina 3 mM sobre los flujos de cloruro a través del **intestino anterior (a)** y **posterior (b)** de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD). Diferencias significativas con las condiciones iniciales con solución Ringer: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Valores expresados como media \pm EEM ($n=5$).

ADICIÓN DE FORSKOLINA (10^{-5} M).

La forskolina es un diterpeno extraído de las raíces de la planta *Coleus forskohlii* (Bhat, 1977) que activa la adenilato ciclasa, incrementando la cantidad de AMPc intracelular (Metzger y Lindner, 1981; Seamon y Daly, 1981; Seamon y col., 1981). Los efectos de la forskolina se desarrollan rápidamente y son reversibles, resultando una sustancia particularmente útil para el estudio de alteraciones en el transporte de macromoléculas y electrolitos mediados por el AMPc (Bridges y col., 1983; Kiliaan y col., 1996).

Efectos sobre los parámetros bioeléctricos

Como se aprecia en la **Figura 4.10** y **4.11**, el efecto de la adición de forskolina 10^{-5} M al medio de incubación, sobre las características eléctricas del epitelio intestinal de peces varió según el segmento de intestino y la dieta ingerida por el animal.

En el tramo anterior de los peces alimentados con la DD, la incubación en presencia de forskolina no alteró los valores de la DP del tejido, que fueron $0,94 \pm 0,15$ instantes antes de añadir la sustancia (t_{30}) y $0,79 \pm 0,12$ mV, 60 min más tarde (t_{90}). En este mismo segmento de peces alimentados con la DC, la DP disminuyó significativamente desde $1,03 \pm 0,09$ mV a $0,81 \pm 0,11$ mV, a los 30 y 90 min de ensayo, respectivamente. La inclusión de forskolina en el pocillo de la semicámara no produjo modificación significativa de la DP en la sección distal del intestino de los ejemplares del grupo DD ($1,05 \pm 0,11$ mV y $0,91 \pm 0,10$ a t_{30} y t_{90} , respectivamente), sin embargo, disminuyó las medias en la de los juveniles que ingirieron la DC, desde $1,04 \pm 0,12$ mV hasta $0,78 \pm 0,07$ mV.

La lcc se mantuvo constante en $7,82 \pm 1,90$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (t_{30}) y $8,29 \pm 1,72$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ (t_{90}) en el IA de las doradas que ingirieron la DD, mientras que en el de las que recibieron el tratamiento dietario DC, disminuyó significativamente desde $9,38 \pm 1,07$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, hasta $5,81 \pm 1,22$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$. Independientemente de la dieta ingerida por el pez, la inclusión de forskolina 10^{-5} M en el medio de incubación, no modificó la lcc del IP, a pesar de que en los peces DC se apreció una tendencia no significativa a reducirse. Así, se registraron valores de $29,13 \pm 6,31$ y $28,29 \pm 2,76$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, tras 30 y 90 min de

experimento, y de $17,18 \pm 3,82$ y de $8,31 \pm 2,82 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ a esos mismos tiempos de ensayo, en los individuos del grupo DD o DC, respectivamente.

Por último, la incubación en presencia de forskolina 10^{-5} M no alteró significativamente la Gt del segmento anterior del intestino registrada en las condiciones iniciales, en ninguno de los dos grupos de peces, promediando valores de $8,41 \pm 1,12 \text{ mS}/\text{cm}^2$ (t_{30}) y $10,24 \pm 1,71 \text{ mS}/\text{cm}^2$ (t_{90}) en el de los que recibieron la dieta deficiente en HUFA, y de $8,18 \pm 1,64 \text{ mS}/\text{cm}^2$ y $9,13 \pm 1,78 \text{ mS}/\text{cm}^2$ en el de los ejemplares a los que se suministró la DC. En el IP de los juveniles que se alimentaron con la dieta carente de AP, la Gt presentó valores constantes de $53,85 \pm 4,83$ (t_{30}) y $51,06 \pm 4,29 \text{ mS}/\text{cm}^2$ (t_{90}), mientras que en el de los que pertenecían al grupo DC, las medias mostraron una tendencia no significativa a incrementarse desde $26,02 \pm 4,66 \text{ mS}/\text{cm}^2$ (t_{30}) hasta $37,39 \pm 5,51 \text{ mS}/\text{cm}^2$ (t_{90}).

Efectos sobre el transporte de cloruro

La **Figura 4.12** (a) y (b), muestra la influencia que la adición de forskolina 10^{-5} M tiene sobre los flujos unidireccionales y netos de cloruro en el segmento anterior y posterior del intestino de peces alimentados con las dos dietas experimentales. En general, los flujos obtenidos en este conjunto de experimentos fueron muy similares a los obtenidos al adicionar teofilina al medio de incubación.

Los movimientos unidireccionales y netos de cloruro en el IA de peces alimentados con la DD, no resultaron afectados al incubar el tejido en presencia de forskolina, manteniéndose el flujo neto nulo. Antes de la adición de la sustancia, el J_{neto} fue de $-1,19 \pm 0,73 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$, y después, $J_{\text{neto}} = 0,62 \pm 0,40 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$. En los peces alimentados con la dieta control, la adición de forskolina afectó significativamente a los flujos netos a través del segmento anterior, anulando la absorción de $5,10 \pm 0,77 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ existente cuando el tejido fue incubado con la solución Ringer. Esta variación fue debida tanto al descenso del $J_{\text{m-s}}$ desde $8,07 \pm 1,64 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ hasta $4,66 \pm 0,62 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$, como al incremento del $J_{\text{s-m}}$ desde $2,97 \pm 0,51 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ hasta $6,15 \pm 1,10 \mu\text{eq}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$.

La forskolina 10^{-5} M no produjo cambios significativos en los flujos unidireccionales ni netos de cloruro a través del IP de los peces del grupo DD, que

permanecieron nulos antes ($-0,89 \pm 0,81 \mu\text{eq}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$) y después ($-1,11 \pm 0,57 \mu\text{eq}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$) de la adición de la sustancia. Sin embargo, en el IP de los juveniles alimentados con la DC, anuló la absorción neta medida en presencia de la solución Ringer ($4,40 \pm 0,73 \mu\text{eq}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$), debido, fundamentalmente, al aumento significativo del flujo en dirección serosa-mucosa desde $7,52 \pm 0,67 \mu\text{eq}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$ inicialmente, hasta $11,30 \pm 1,27 \mu\text{eq}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$, tras la adición del diterpeno.

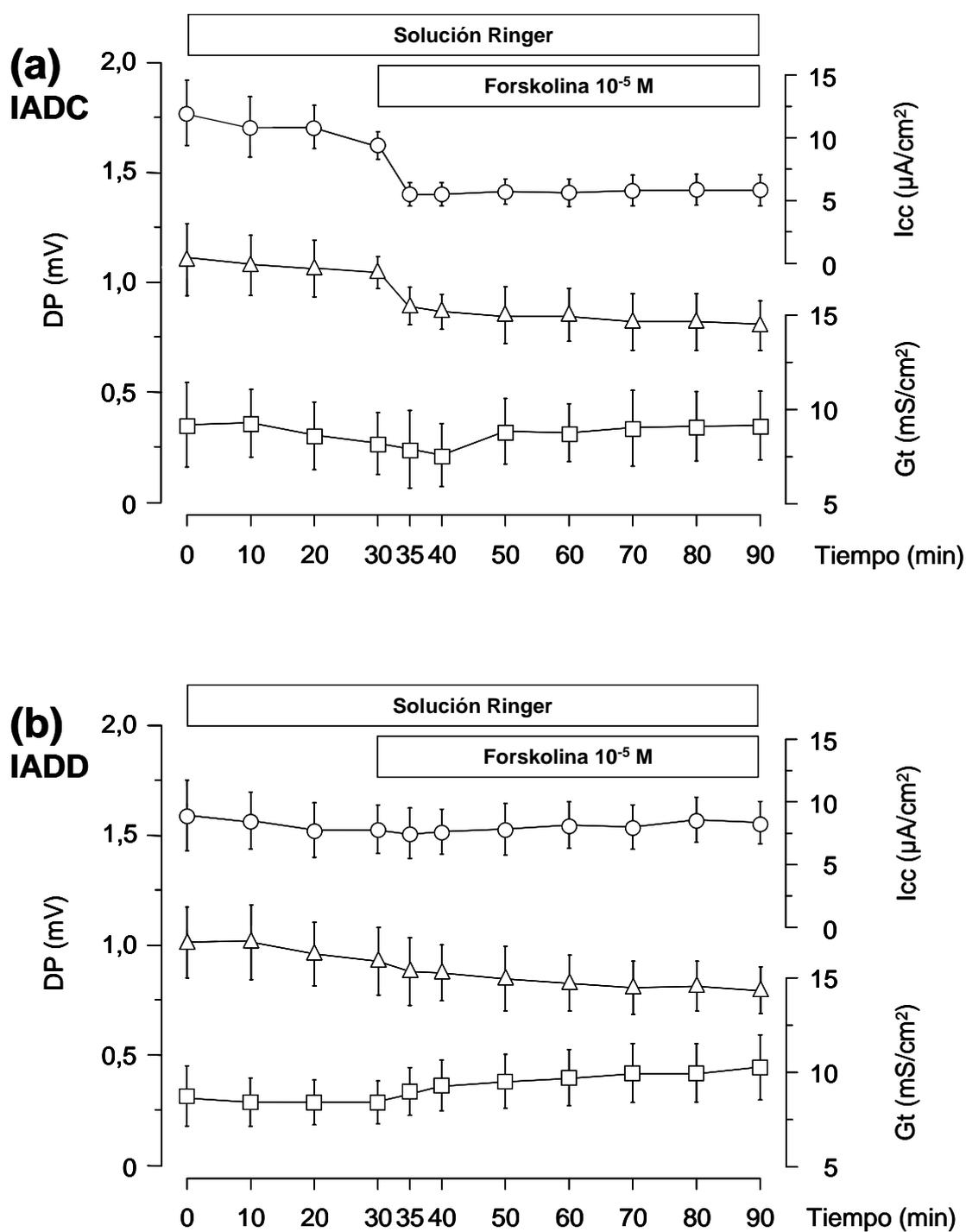


Figura 4.10. Efecto de la adición de forskolina 10^{-5} M sobre los parámetros eléctricos a través del **intestino anterior** de juveniles de dorada. **(a)** Dieta control, **(b)** dieta deficiente en HUFA. Icc (\circ), DP (\triangle) y Gt (\square). Valores expresados como media \pm EEM ($n=6$ para dieta control y $n=5$ para dieta deficiente en HUFA).

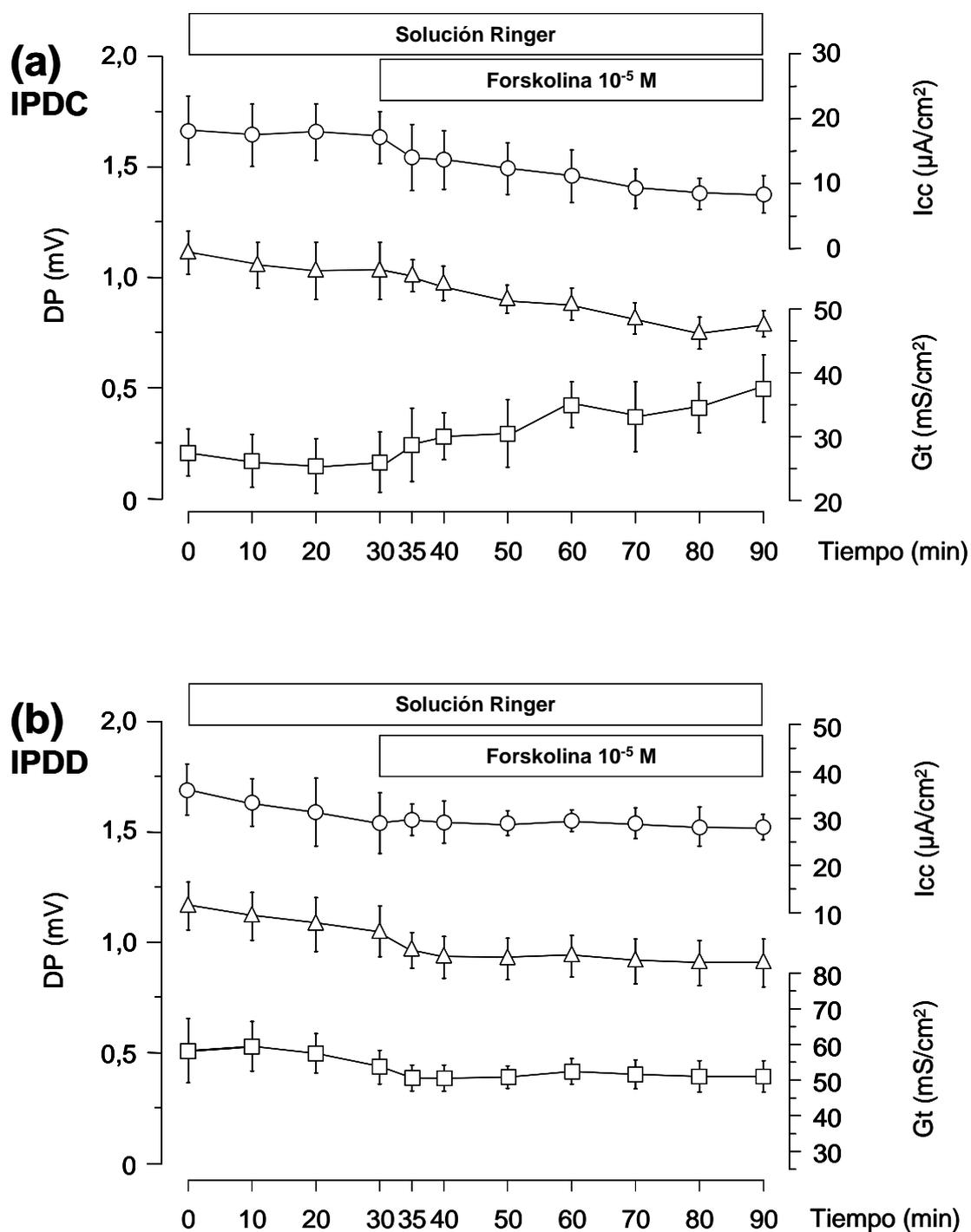


Figura 4.11. Efecto de la adición de forskolina 10^{-5} M sobre los parámetros eléctricos a través del **intestino posterior** de juveniles de dorada. **(a)** Dieta control, **(b)** dieta deficiente en HUFA. Icc (\circ), DP (\triangle) y Gt (\square). Valores expresados como media \pm EEM (n=6).

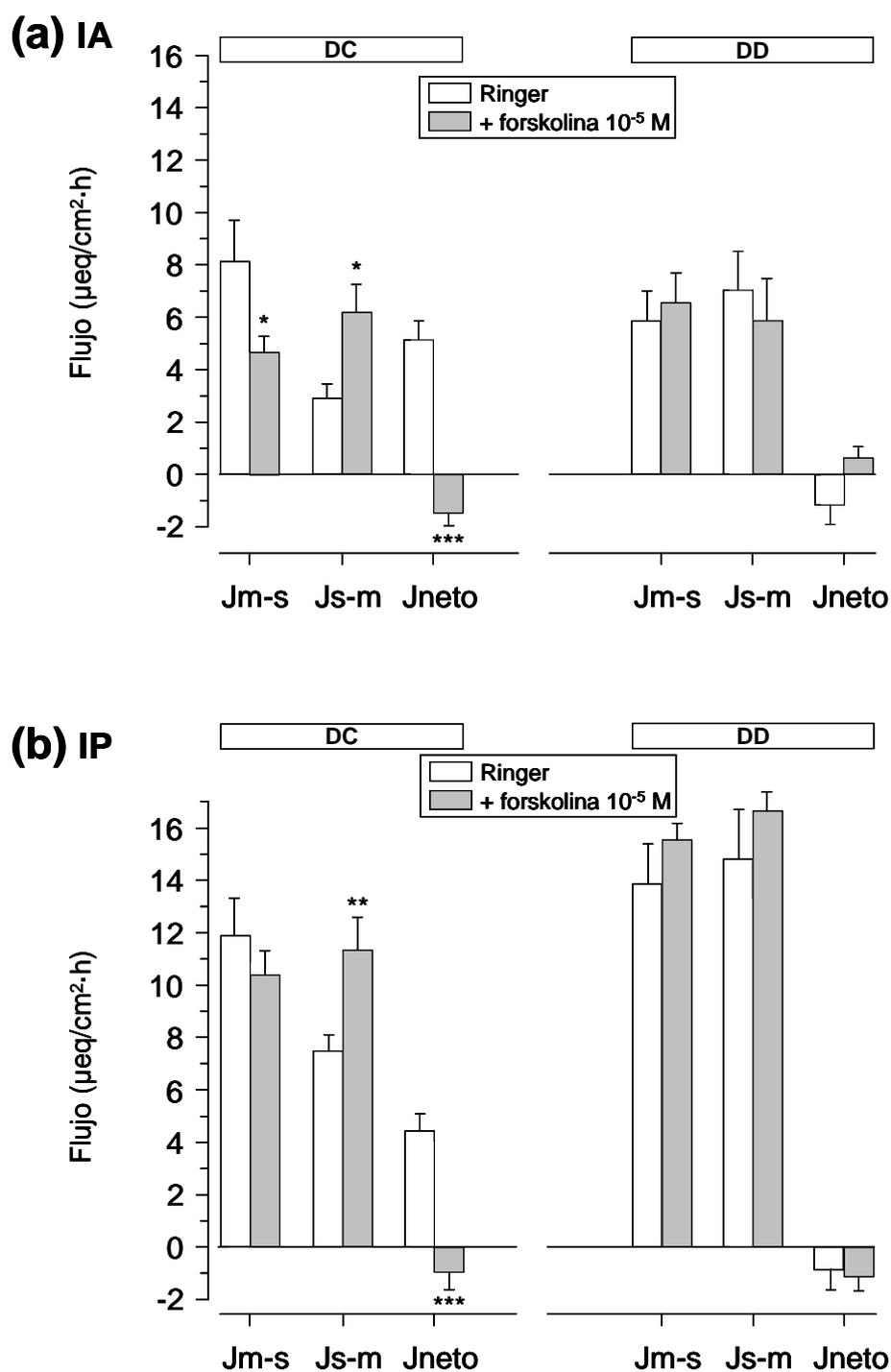


Figura 4.12. Efecto de la adición de forskolina 10^{-5} M sobre los flujos de cloruro a través del intestino anterior (a) y posterior (b) de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD). Diferencias significativas con las condiciones iniciales: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Valores expresados como media \pm EEM ($n=6$).

PRODUCCIÓN DE AMPc INTRACELULAR.

El efecto que la composición lipídica dietaria tiene sobre la producción de AMPc intracelular en condiciones control, parece variar a lo largo del eje longitudinal del intestino. Así, las cantidades de AMPc detectadas en el IA permanecieron estables entre lotes experimentales ($9,63 \pm 0,26$ nmol/mg tejido en los ejemplares que ingirieron la dieta deficiente en HUFA y $11,68 \pm 1,15$ nmol/mg tejido en los que se alimentaron con la dieta control). Por el contrario, en el IP, el nivel de AMPc en peces del grupo DD fue inferior que en los peces del grupo DC ($5,59 \pm 0,84$ nmol/mg tejido frente a $11,18 \pm 0,70$ nmol/mg tejido, respectivamente) (**Figura 4.13**).

La adición de teofilina 3 mM o de forskolina 10^{-5} M al medio de incubación, mostró efectos semejantes en la producción de AMPc intracelular en el intestino de los juveniles de dorada, dando lugar a un incremento significativo tanto en el segmento proximal como en el distal de ambos grupos de peces, aunque con un nivel de significación mayor en los que recibieron la dieta deficiente en HUFA ($P < 0,001$), que en los que se alimentaron con la dieta control ($P < 0,01$, $P < 0,05$).

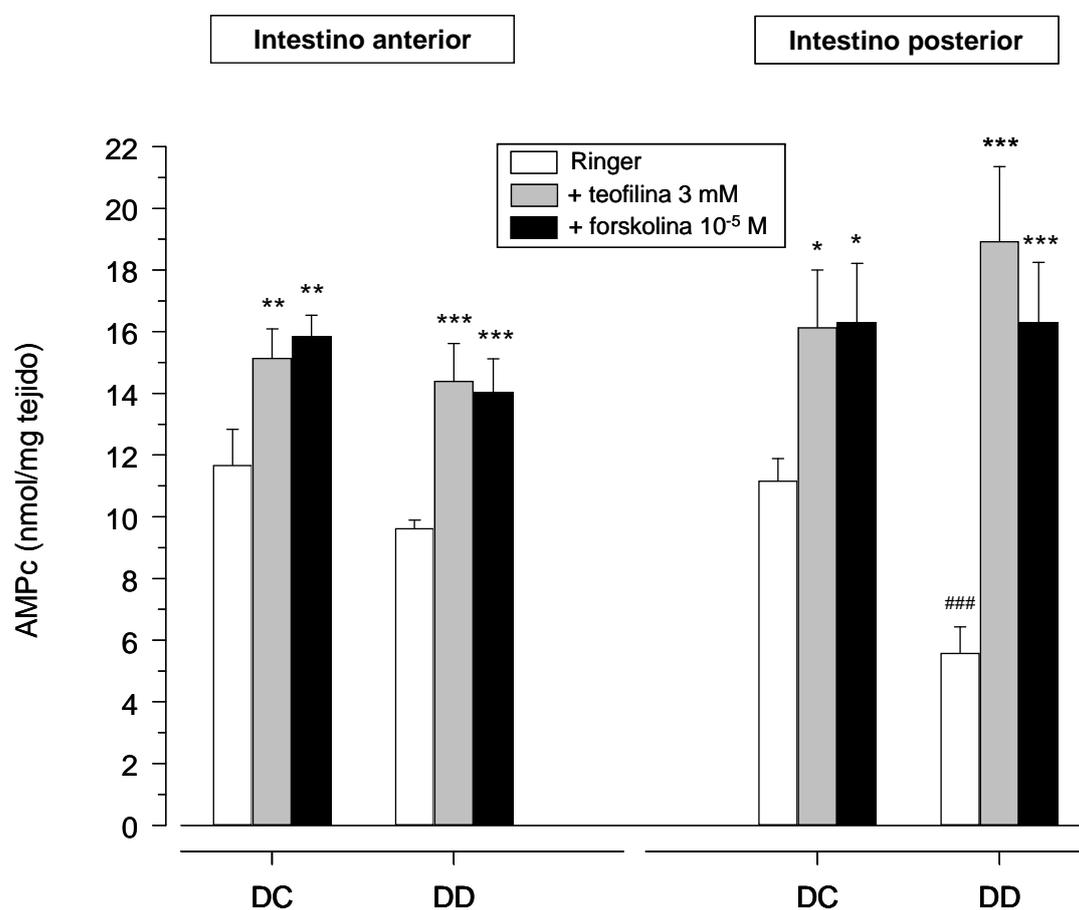


Figura 4.13. Efecto de la adición de teofilina 3 mM y de forskolina 10⁻⁵ M sobre los niveles de AMPc intracelular en el intestino anterior y posterior de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD). Diferencias significativas con las condiciones iniciales de incubación en solución Ringer: * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001. Diferencias significativas con la DC: ### P<0,001. Valores expresados como media ± EEM (n=8 para el grupo DC y n=7 para el grupo DD).

4.4.2. Movimientos unidireccionales y netos de glucosa en los segmentos anterior y posterior del intestino. Efectos de la adición de floricina.

La solución Ringer empleada para la incubación del tracto intestinal durante el desarrollo de estos experimentos, fue idéntica a la de los estudios de transporte de cloruro y de sodio. En la **Figura 4.14** se muestran los flujos unidireccionales y netos de glucosa en el intestino anterior (a) y posterior (b) de doradas alimentadas con las dos dietas experimentales, así como el efecto que la adición de floricina 1 mM tiene sobre los mismos. La floricina es un potente inhibidor competitivo y reversible del sistema de cotransporte de glucosa dependiente de sodio, en una amplia variedad de células y tejidos.

En el IA de los peces alimentados con la DD, el movimiento unidireccional de glucosa en sentido mucosa a serosa fue de $1,50 \pm 0,28$ nmol/cm²·h y el de serosa a mucosa de $2,08 \pm 0,38$ nmol/cm²·h, lo que dio lugar a un flujo neto, no distinto de cero, de $-0,58 \pm 0,22$ nmol/cm²·h. Idéntica tendencia se observó en los ejemplares que ingirieron la DC, donde el flujo neto también fue igual a cero, debido a un $J_{m-s} = 3,23 \pm 0,40$ nmol/cm²·h y un $J_{s-m} = 3,21 \pm 0,51$ nmol/cm²·h.

La adición de floricina 1mM no modificó los flujos unidireccionales ni netos en ninguno de los dos grupos de peces. En los ejemplares que se alimentaron con la DD los valores registrados fueron de $J_{m-s} = 2,67 \pm 1,11$ nmol/cm²·h, $J_{s-m} = 3,69 \pm 0,77$ nmol/cm²·h y $J_{neto} = -1,02 \pm 0,60$ nmol/cm²·h, mientras que en los que ingirieron la DC, $J_{m-s} = 2,60 \pm 0,69$ nmol/cm²·h, $J_{s-m} = 2,25 \pm 0,33$ nmol/cm²·h y $J_{neto} = 0,35 \pm 0,27$ nmol/cm²·h.

Cuando se incubó el IP de los juveniles de dorada del grupo DD con la solución Ringer de trabajo, no se detectó absorción neta de glucosa ($J_{neto} = -1,24 \pm 1,01$ nmol/cm²·h) debido a la similitud de los movimientos unidireccionales ($J_{m-s} = 11,26 \pm 2,68$ nmol/cm²·h y $J_{s-m} = 12,50 \pm 0,95$ nmol/cm²·h). La adición de la floricina 1 mM al medio de incubación no modificó los flujos unidireccionales ($J_{m-s} = 10,68 \pm 2,35$ nmol/cm²·h, $J_{s-m} = 11,44 \pm 0,99$ nmol/cm²·h) ni el neto ($J_{neto} = -0,76 \pm 1,04$ nmol/cm²·h). Por el contrario, los juveniles alimentados con la DC, presentaron una

absorción neta de glucosa de $7,56 \pm 0,96$ nmol/cm²·h, producida por un J_{m-s} de $12,34 \pm 1,77$ nmol/cm²·h y un J_{s-m} de $4,78 \pm 1,02$ nmol/cm²·h. Al añadir la floricina, se produjo una disminución significativa de la absorción neta ($J_{\text{neto}} = 3,10 \pm 0,47$ nmol/cm²·h) debido exclusivamente a la reducción del flujo de mucosa a serosa ($J_{m-s} = 7,34 \pm 0,78$ nmol/cm²·h) ya que el flujo en sentido contrario no se vio afectado.

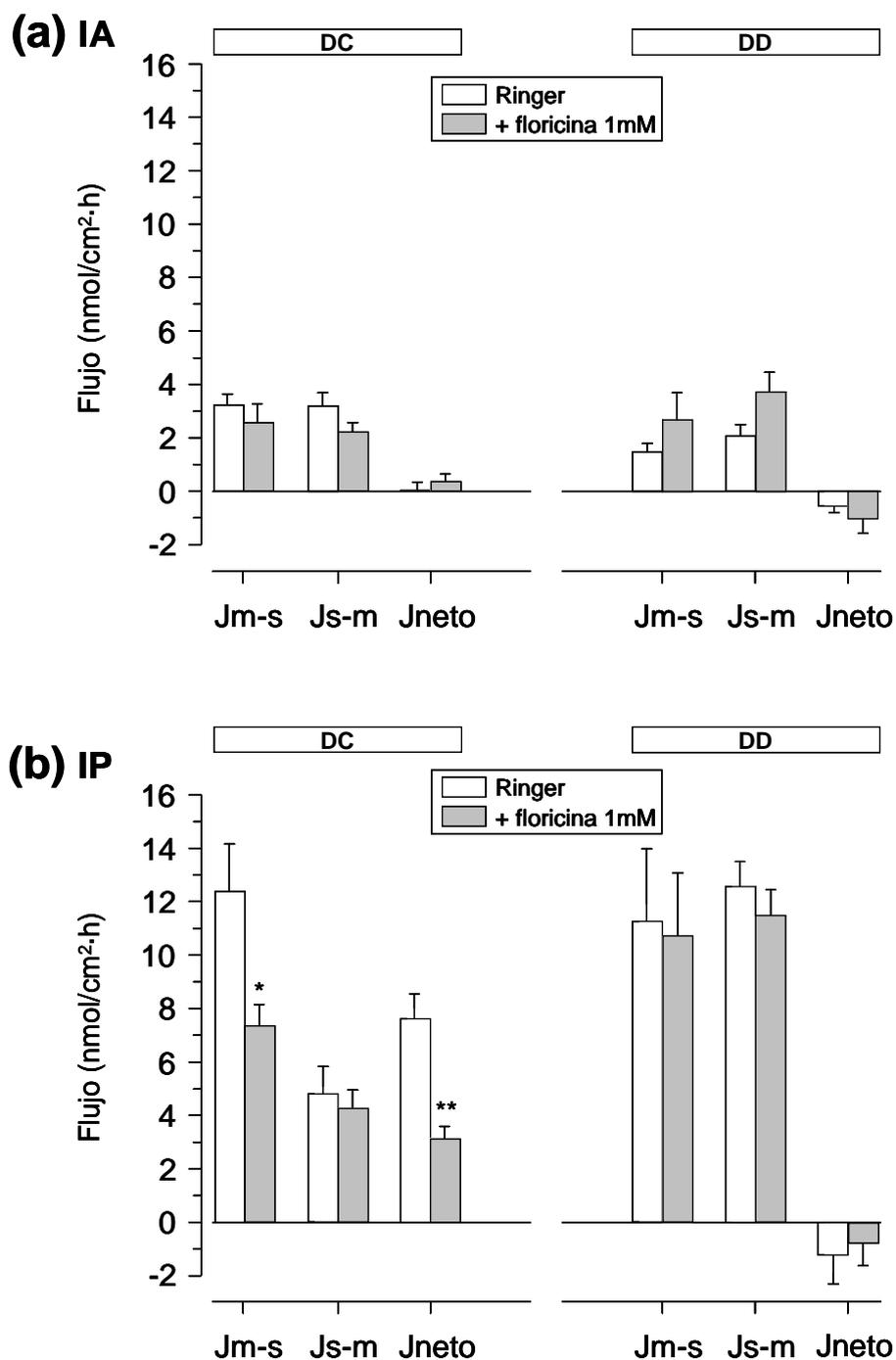


Figura 4.14. Efecto de la adición de floricina 1 mM sobre los flujos de glucosa a través del **intestino anterior (a)** y **posterior (b)** de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD). Diferencias significativas con las condiciones iniciales: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. Valores expresados como media \pm EEM ($n=5, 6$).

4.5. Análisis bioquímico del medio interno. Parámetros plasmáticos.

Como se refleja en la **Tabla 4.5.1**, la mayoría de los parámetros plasmáticos analizados no fueron afectados por la composición lipídica dietaria. Sólo se detectaron diferencias significativas en el nivel plasmático de cloro, colesterol total y TG, que mostraron valores superiores en los ejemplares a los que se suministró la dieta formulada con AP (DC).

Tabla 4.5.1. Composición en electrolitos, proteína total, colesterol total y triglicéridos del plasma sanguíneo de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)

	DC	DD	P
Calcio (mg/dl)	13,3 ± 0,8	13,3 ± 1,3	N.S.
Fósforo (mg/dl)	9,1 ± 1,4	9,3 ± 2,0	N.S.
Sodio (mmol/dl)	185,2 ± 4,8	183,2 ± 11,4	N.S.
Potasio (mmol/dl)	5,1 ± 0,8	5,4 ± 1,1	N.S.
Cloro (mmol/dl)	166,6 ± 5,5	156,8 ± 8,8	<0,001
Proteínas totales (g/l)	38,5 ± 3,3	37,2 ± 2,5	N.S.
Colesterol total (mmol/l)	7,6 ± 0,8	4,7 ± 0,3	<0,001
Triglicéridos (mmol/l)	4,3 ± 1,0	2,3 ± 0,6	<0,001

Valores expresados como media ± DE (n=45 para DC y n=41 para DD). N.S., no significativamente diferentes.

5. DISCUSIÓN

La continuidad del desarrollo de la acuicultura pasa, ineludiblemente, por la reducción de los ingredientes de origen marino en la formulación de las dietas. La limitada capacidad que tienen los peces carnívoros para metabolizar carbohidratos de elevado peso molecular (Young y col., 2006; Moreira y col., 2008), impide que se incremente significativamente su participación en la dieta, por lo que las investigaciones han centrado su atención en la búsqueda de fuentes de proteína y lípido alternativas a las harinas y aceites de pescado, disponibles para producciones a gran escala, sostenibles, y económicamente efectivas (Sargent y col., 2002; Bell y Waagbo, 2008; Turchini y col., 2009). En este sentido, los piensos comerciales para peces carnívoros como la dorada incorporan ya entre un 30 y un 40% de AVs en su formulación, si bien el precio de esta materia prima muestra una preocupante tendencia al alza.

Dentro del ciclo de desarrollo del pez, la fase de engorde es la que conlleva la mayor necesidad de alimento, y por tanto, de materias primas. En la presente memoria de investigación, se aborda la problemática de la disminución del AP en los piensos de engorde para dorada, mediante la elaboración de dos dietas experimentales isoproteicas e isolipídicas, de bajo contenido lipídico (15%), donde el aporte de harina de pescado se mantuvo invariable y dentro de los valores de referencia de las dietas para peces marinos carnívoros (400-600 g/kg), mientras que la fuente lipídica se modificó entre tratamientos, combinando aceites de origen terrestre animal (AOA) y vegetal, en la dieta deficiente en HUFA (DD), y utilizando una mezcla de AP y AOA en la dieta control (DC) (ver **Tabla 3.1**).

Como se señaló en el apartado de Material y métodos, para generar la deficiencia dietaria de HUFA, se desengrasó la harina de pescado. En función de su origen, la harina de pescado puede contener entre un 8 y un 15% de aceite residual, con un 20-35% de (n-3) HUFA (Bimbo, 2000; Bransden y col., 2003; Regost y col., 2003b), por lo que la cantidad de harina sin desengrasar utilizada en nuestra dieta DC (530g/kg), aportaría alrededor de un 1% de HUFA en peso seco, cantidad suficiente para satisfacer las necesidades de AGE de los juveniles de dorada y garantizar un adecuado crecimiento y supervivencia (Kalogeropoulos y col., 1992; Ibeas y col., 1994, 1996). En esta dieta, se incluyó además 35 g/kg de AP, un suplemento muy

inferior al que suele utilizarse hoy en día como referencia para especies carnívoras/omnívoras marinas (Regost y col., 2003a,b; Montero y col., 2005; Bell y col., 2006; Mourente y Bell, 2006; Almada-Pagán y col., 2007; Benedito-Palos y col., 2007, 2008). En cualquier caso, la dieta DC así formulada aportó 2,53% de HUFA (n-3 + ARA) y un 42,5% de ácidos grasos saturados. En definitiva, las dietas preparadas presentaron proporciones similares de proteína total y más bajas de lípido total, que la mayoría de las dietas comerciales y que las utilizadas en otras investigaciones desarrolladas recientemente en juveniles de dorada (Dópido, 2006; Benedito-Palos y col., 2007, 2008; Montero y col., 2008; Fountoulaki y col., 2009).

A pesar de la variación de los ingredientes lipídicos utilizados y de sus proporciones, la distribución de clases lipídicas en las dietas experimentales resultó escasamente modificada, si exceptuamos la mayor presencia de EE en la DD que podría tener su origen en los AVs empleados en su elaboración (Clark y Levitt, 1956; Christie, 1982; Sandstrom y Cleland, 1989; Cequier-Sánchez y col., 2008). De manera similar, la eliminación del AP y la inclusión de aceite de maíz y linolénico en esta dieta, dio lugar a proporciones elevadas de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y PUFA de 18C propios de estas fuentes lipídicas, así como a la casi total ausencia de HUFA (0,09% p.s.), aporte insuficiente para satisfacer las necesidades mínimas de estos AGE en los juveniles de dorada.

Influencia de la composición en ácidos grasos de la dieta sobre el crecimiento de los ejemplares

Los índices de crecimiento de los juveniles DC fueron muy similares a los obtenidos recientemente por Fountoulaki y col. (2009) en la misma especie, usando como control una dieta comercial formulada con 150 g/kg de AP como única fuente lipídica. Índices de crecimiento superiores o inferiores a los reportados en otras fuentes bibliográficas (Benedito-Palos y col. 2007, 2008; Montero y col., 2008; Díaz-López y col., 2009, 2010; Bouraoui y col., 2011), podrían atribuirse al peso de los ejemplares experimentales, que presentan superiores velocidades de crecimiento y capacidades más altas de metabolización y aprovechamiento del alimento durante fases tempranas de su desarrollo (von Bertalanfi, 1938; Querellou, 1984; Guillaume y

col., 2002). De hecho, aunque el crecimiento depende de la interacción entre múltiples variables, el peso de los peces y la temperatura son los parámetros fundamentales considerados en los distintos modelos matemáticos de crecimiento que se han desarrollado para las especies en condiciones de cultivo, incluyendo a la dorada (Petridis y Rogdakis, 1996; Hernández y col., 2003; Libralato y Solidoro, 2008; Mayer y col., 2008). Otros factores ambientales como salinidad o calidad del agua (Brett, 1979; Bouef y Payan, 2001; Laiz-Carrión y col., 2005), o la mejora genética de los individuos (Benedito-Palos y col., 2008), también pueden haber tenido cierta influencia en la variabilidad de los resultados. En cualquier caso, y en concordancia con lo descrito para otras especies (Watanabe, 1987; Turchini y col., 2003; Montero y col., 2004; Higgs y col., 2006), nuestros resultados con la dieta DC de bajo contenido graso, indican que es factible incluir AOA en proporciones elevadas en la dieta de juveniles de dorada en sustitución al AP sin afectar al crecimiento del pez, siempre y cuando, como en nuestro estudio, se garanticen los requerimientos de AGE de los ejemplares.

Los aceites de origen terrestre, tanto vegetales como animales, están ausentes en la dieta natural de peces marinos carnívoros como la dorada. Su composición en ácidos grasos difiere sustancialmente de la de los AP, principalmente en la longitud de la cadena y el grado de instauración de sus integrantes, características que pueden afectar a la aceptación de las dietas por los peces (Grisdale-Helland y col., 2002; Geurden y col., 2005, 2007). En nuestro estudio, tras el periodo de adaptación inicial de los peces a las nuevas características organolépticas de las dietas experimentales, ni la tasa de ingestión, ni la eficiencia del alimento o de la proteína, resultaron afectadas al sustituir parcial o totalmente, el AP por otras fuentes lipídicas carentes de HUFA. Estos resultados coinciden con los obtenidos tanto en dorada (Benedito-Palos y col., 2007, 2008; Montero y col., 2008, Díaz-López y col., 2009), como en otros teleósteos marinos como la lubina (Montero y col., 2005; Mourente y Bell, 2006), el sargo (Piedecausa y col., 2007), el bacalao (Bell y col., 2006) o el rodaballo (Regost y col., 2003b).

A lo largo del periodo de engorde no hubo incidencia de mortalidad en ninguno de los dos tratamientos dietarios. Los índices de crecimiento tras 4 meses de experimentación fueron, sin embargo, más bajos en los peces que recibieron la dieta

que carecía de AP, por lo que al no haber diferencia en la aceptación de las dietas, ni cambios en otros componentes dietarios, sugerimos que las diferencias encontradas se deben a que los peces no vieron cubiertas sus necesidades mínimas de AGE. Sustituciones elevadas del AP por AVs individuales de perfil equilibrado, o por mezclas bien balanceadas de AVs, son posibles sin mostrar efectos adversos en el crecimiento y/o mortalidad de los ejemplares (Hardy y col., 1987; Bell y col., 2003a; Bendiksen y col., 2003; Izquierdo y col., 2003, 2005; Mourente y col., 2005b; Richard y col., 2006b; Jutfelt y col., 2007; Miller y col., 2007; Benedito-Palos y col., 2007, 2008, 2009; Fountoulaki y col., 2009; Díaz-López y col., 2009, 2010). Sin embargo, en general, la sustitución total o superior al 75% del AP en la dieta de especies marinas afecta negativamente el crecimiento y/o supervivencia de los peces (Regost y col., 2003b; Izquierdo y col., 2003, 2005; Benedito-Palos y col., 2007, 2008; Montero y col., 2008), y sólo cuando la proporción de harina de pescado usada como fuente proteica contiene cantidad suficiente de HUFA (n-3) y (n-6) para satisfacer los requerimientos de AGE de la especie, como es el caso de la dieta control de nuestro estudio, se hace posible elevar este grado de sustitución (Glencross y col., 2003; Bell y col., 2006; Almada-Pagán y col., 2007; Piedecausa y col., 2007; Bouraoui y col., 2011).

A pesar de la deficiencia dietaria de AGE, el IHS de ambos grupos experimentales permaneció invariable y similar al descrito para dorada por otros autores (Martín, 2003; Díaz-López y col., 2009; Fountoulaki y col., 2009). Otro de los índices indicativos de la evolución del engorde del pez, el factor de condición (K), también permaneció constante, independientemente del tratamiento alimentario suministrado, y coincidiendo con valores habituales encontrados en la literatura para esta especie y bajo diferentes tratamientos dietarios (Ibeas y col., 1996, 1997; Laiz-Carrión y col., 2005; Díaz-López y col., 2009).

Influencia de la composición en ácidos grasos de la dieta control (DC) sobre la composición lipídica de los órganos y células sanguíneas

La ausencia de alimento en los nichos ecológicos de los peces es un suceso frecuente que les obliga al ayuno o a modificar la dieta. Los lípidos juegan un papel fundamental en estas situaciones de cambio del régimen dietario en especies

carnívoras, que han desarrollado mecanismos fisiológicos para subsanar dichos desajustes en el suministro de nutrientes, con el fin de mantener la homeostasis lipídica y la funcionalidad de órganos vitales como el **cerebro**, a expensas de alteraciones del metabolismo intermediario en tejidos como **hígado** y **músculo esquelético** (Vigliano y col., 2002). Éstos órganos son considerados por tanto, indicadores válidos para evaluar el posible grado de afección del pez por la composición lipídica dietaria. Por otro lado, el **hematocrito** está integrado casi exclusivamente por glóbulos rojos o eritrocitos, responsables del transporte del oxígeno necesario para los procesos de oxidación, desde las branquias hasta los órganos y tejidos del pez, así como de la recogida del CO₂ producido en las reacciones metabólicas celulares. Modificaciones en la composición lipídica de la membrana del eritrocito pueden afectar a la flexibilidad celular y a la permeabilidad selectiva, poniendo en riesgo su función fisiológica. El **tracto intestinal** de peces juega un papel vital en la absorción de nutrientes y electrolitos, en el mantenimiento de la homeostasis del animal y en la defensa ante patógenos externos que entran en el organismo a través de la boca, por lo que su integridad funcional es crítica para el adecuado desarrollo de los ejemplares. Teniendo en cuenta que la composición en ácidos grasos de los lípidos corporales de los peces está directamente influenciada por la de los lípidos de la dieta (Watanabe, 1987; Brodtkorb y col., 1997; Dosanjh y col., 1998; Sargent y col., 2002; Izquierdo y col., 2003; Jobling y Bendiksen, 2003; Díaz-López y col., 2009, 2010), el análisis detallado del perfil lipídico de los órganos citados y del hematocrito en peces alimentados con la DC (35% AP, 65% AOA), aportará valiosa información sobre el estado de salud y bienestar de los juveniles de dorada a lo largo de su desarrollo, sobre su valor nutricional, así como sobre las alteraciones que una dieta deficiente en AGE pudiera generar en ellos.

En la dorada, como en la mayoría de los salmónidos, la grasa de reserva es depositada principalmente en el tejido adiposo y el músculo y, en menor proporción, en el hígado (Takama y col., 1994; Jobling y col., 1998). Aunque en mamíferos, tanto el tejido adiposo como el tejido hepático parecen ser igualmente importantes para la síntesis de ácidos grasos *de novo*, en peces, esta función parece estar centrada preferentemente en el **hígado** (Sargent y col., 1989; Tocher, 2003; Bouraoui y col., 2011). Los estudios disponibles señalan que en la dorada, el hígado es efectivamente

el centro para la biosíntesis de los lípidos y que la dieta regula la actividad enzimática lipogénica (Kaushik, 1997). Asimismo, constituye el órgano más importante en la oxidación de los ácidos grasos y proporciona PUFA de cadena larga a otros tejidos (Poisson y col., 1992; Rincón-Sánchez y col., 1992). En este sentido, el **músculo** de los peces DC presentó el nivel más alto de TG de todos los órganos analizados, confirmando su implicación en el almacenamiento de ácidos grasos destinados a suplir las necesidades energéticas inherentes a la natación activa (Stubhaug y col., 2005a). Como era de esperar, el hígado DC también presenta niveles elevados de TG, debido a su participación en los procesos de almacenamiento de grasa de reserva. Las altas proporciones de productos de la actividad lipásica como ácidos grasos libres y EE detectadas en el hígado, corroboran la importancia de éste órgano en la actividad metabólica de los peces, tanto en los procesos de 'turnover' de los fosfolípidos, como en los de oxidación de los ácidos grasos con fines energéticos. Henderson (1996), postuló que el músculo esquelético, el hígado y el corazón son los tejidos más importantes implicados en la oxidación de los ácidos grasos en especies dulceacuícolas. Más recientemente, Stubhaug y col. (2005a), confirman que en el salmón Atlántico, el músculo blanco y rojo, y el hígado, se encargan de ajustar las tasas de la β -oxidación en relación a los cambios dietarios en el perfil de ácidos grasos. Señalar por último, que los valores de LT y las proporciones de las distintas clases lipídicas presentes en músculo e hígado de peces alimentados con la DC, son similares a los descritos por otros autores para esta misma especie alimentada con dietas formuladas con AP (Almansa y col., 2001a; Díaz-López y col., 2009; Fountoulaki y col., 2009; Martín y col., 2009).

La influencia de los lípidos dietarios sobre la funcionalidad de las membranas celulares, afecta también a las **células sanguíneas**. Así, la inmuno-modulación de los lípidos dietarios guarda relación con los cambios en la estructura lipídica de las membranas de las células implicadas en la respuesta inmune, incluyendo los mecanismos que tienen lugar en los leucocitos durante los procesos de fagocitosis (Montero e Izquierdo, 2001). En nuestros peces control, la relación colesterol/fosfolípidos más elevada se detectó en el hematocrito, superando incluso a la presente en órganos donde los cambios rápidos en la fluidez de la membrana juegan un papel primordial como son cerebro e intestino. Sorprendentemente, la

distribución de clases lipídicas del hematocrito en dorada y salmón Atlántico son semejantes, destacando el elevado nivel de colesterol encontrado, y que la FC fue, con diferencia, la clase polar más importante (Lee y col., 1989; Thompson y col., 1995). Las diferencias existentes entre ambas especies estriban en la mayor proporción de TG y menor de FE en las clases lipídicas de dorada, pudiendo ser atribuidas a las diferentes condiciones medioambientales en las que se desarrollan ambas especies, a las variaciones en la formulación dietaria o a que en nuestro estudio, se analizó conjuntamente el 'pool' de células sanguíneas, mientras que en el trabajo con el salmón se separaron los eritrocitos de los leucocitos, que contienen mayores proporciones de TG y menores de FE (Thompson y col., 1995).

El **cerebro** presentó el nivel más alto de lípido de todos los órganos analizados y una composición exclusiva de clases lipídicas. La alta proporción de TLP confirma que el sistema nervioso central es muy rico en fosfolípidos, imprescindibles para el correcto funcionamiento neuronal y visual de los peces (Ayala y col., 1991, 1993; Sargent y col., 1993, 2002; Tanaka y col., 2003). Es de destacar la presencia única entre las clases polares del cerebro, de sulfátidos y cerebrósidos, glucoesfingolípidos formados por una esfingosina esterificada por un ácido graso y un glúcido, componentes de las membranas plasmáticas de las células del tejido nervioso de vertebrados. El contenido de LT del cerebro de juveniles DC, es menor que el encontrado para esta especie por Benedito-Palos y col. (2010) usando dietas basadas en AP como única fuente lipídica. El elevado contenido lipídico detectado por estos autores es atribuido a la sorprendentemente alta proporción del TLN (más del 75% del LT), y en particular, de los TG (55,7%), muy superiores al 41,3% y 20,8%, respectivamente, encontrados en nuestro estudio. El suministro prolongado de una dieta de alta energía, con un 21% de lípido en peso seco, podría haber generado esta excesiva deposición de TG observada en todos los tejidos analizados por Benedito-Palos y col. (2010), incluyendo el cerebro.

El alto contenido lipídico y de TG presente en ambos segmentos del **intestino** de peces DC, especialmente en el tramo anterior, podría justificarse por la elevada demanda de energía metabólica necesaria para la digestión mecánica y química de los alimentos y para los procesos absortivos. Este alto contenido graso, concuerda con el señalado recientemente para esta misma especie por otros autores (Caballero

y col., 2003; Martín y col., 2010). Igualmente, la disminución del contenido de LT y de TG en el sentido próximo-distal, coincide con la heterogeneidad descrita para enterocitos aislados de ciegos pilóricos, intestino anterior e intestino posterior de la misma especie, alimentada con una dieta comercial rica en (n-3) HUFA (Dópido, 2006). No sorprende la presencia en el intestino de niveles importantes de ácidos grasos libres y diacilgliceroles, procedentes de la digestión luminal de los lípidos dietarios (Leger, 1985; Sheridan, 1988; Caballero y col., 2003), de la actividad metabólica asociada a los procesos digestivos anteriormente mencionados, o del fuerte 'turnover' de fosfolípidos que tiene lugar en este epitelio (Pérez y col., 1999; Tocher y col., 2002, 2004; Bell y col. 2003b; Mourente y col., 2005a; Dópido, 2006). La proporción de colesterol, significativamente más alta en el tramo posterior, y la relación colesterol/TLP que se mantiene constante en ambos segmentos intestinales (**Tabla 4.3.12**), se relacionan indudablemente con su papel estructural en las membranas biológicas, interviniendo directamente en la regulación de las propiedades físicas de la bicapa lipídica, responsables de la fluidez y funcionalidad de las membranas. Así, Brasitus y col. (1985), detectaron mecanismos regulatorios que modulaban el contenido de colesterol de las membranas de las microvellosidades, con el objetivo de mitigar cambios en la fluidez lipídica. Una alta relación colesterol/fosfolípidos en las membranas plasmáticas produce un aumento en la rigidez de las mismas y viceversa, contribuyendo a regular la funcionalidad del epitelio intestinal en el transporte de agua, electrolitos y nutrientes (Brasitus y Schachter, 1982; Di Constanzo y col., 1983; Schedl y col., 1989; Meddings y col., 1990), y su adaptación ante los cambios de temperatura (Crockett y Hazel, 1995; Robertson y Hazel, 1997) o tonicidad del medio (Leray y Florentz, 1983; Leray y col., 1984).

En definitiva, frente a otras dietas experimentales y comerciales formuladas con AP y AVs, nuestra dieta control, de bajo contenido graso (15% p.s.), parece haber contribuido a mantener niveles moderados de grasa corporal y equilibradas las proporciones de las distintas clases lipídicas, a pesar de haber sustituido buena parte de los AGE del AP, por ácidos grasos saturados y MUFA presentes en AOA.

La composición en ácidos grasos del LT de los órganos aporta información global sobre el papel que cada órgano juega en las funciones fisiológicas mediadas por ácidos grasos, incluyendo la regulación de la expresión génica o la producción de

eicosanoides. Los ácidos grasos del LT resultan de la combinación de los presentes en los LN y en los fosfolípidos. Por tanto, el análisis del perfil de ácidos grasos de los TG y de las distintas clases de fosfolípidos, proporciona una información más detallada sobre el papel que un determinado ácido graso juega en cada órgano. Se discute a continuación algunas de las características más significativas del perfil de ácidos grasos de los órganos de los peces alimentados con la DC, intentando destacar las particularidades más relevantes en las distintas clases lipídicas en relación con su funcionalidad y con la información disponible hasta la fecha para dorada y otras especies de teleósteos.

Independientemente del órgano estudiado, los ácidos grasos más abundantes en el LT fueron 16:0, 18:0, 18:1(n-9), 20:5(n-3) y 22:6(n-3). Como cabía esperar, los lípidos neutros reflejaron más fielmente que los lípidos polares el perfil de ácidos grasos dietario (Watanabe, 1987; March, 1993; Sargent y col., 2002; Tocher, 2003; Skalli y Robin, 2004; Schulz y col., 2005), debido a que un limitado número de ácidos grasos tiende a dominar en los lípidos polares, independientemente de su presencia en la dieta. Así, saturados como el 16:0 o MUFA como el 18:1(n-9), se localizan preferentemente en la posición sn-1 de la molécula de diacilglicerol, mientras que un monoinsaturado o un poliinsaturado como EPA, DHA o ARA se unen en la posición sn-2 (Henderson y Tocher, 1987; Jump, 2002; Sargent y col., 2002). No obstante, tanto el TLP, como las clases lipídicas polares individuales son también afectadas por la dieta, en mayor o menor medida, dependiendo del órgano analizado. En general, podemos afirmar que en los peces alimentados con la DC, las enzimas involucradas en los procesos de deacilación/reacilación han mantenido la característica distribución de los ácidos grasos dentro de las diferentes clases de fosfolípidos propia del ambiente marino. Así, a pesar de la variedad de órganos y células estudiados en la presente memoria, la distribución de los ácidos grasos dentro de las diferentes clases lipídicas polares, siguió con ligeras modificaciones, las pautas resumidas por Tocher y col. (2008). La FC presentó los mayores niveles de 16:0 y 18:1(n-9) de todas las clases lipídicas polares, y generalmente más bajos de PUFA que la FE y FS. La FE mostró los niveles más bajos de saturados, intermedios de MUFA y los más altos de (n-3) HUFA, excepto en el cerebro, donde fue superada por la FS, debido a la mayor acumulación de DHA. La FS se caracterizó por poseer las proporciones más altas de

18:0 y bajas de HUFA (salvo en el cerebro). Finalmente, el FI también tuvo alta presencia de 18:0 y baja de PUFA, y la más destacada de ARA, mostrando la menor relación (n-3)/(n-6) de todos los fosfolípidos.

La retención preferencial de DHA y ARA observada en los órganos y células sanguíneas, acumulándose por encima de los niveles suministrados en la DC, confirma su escasa disponibilidad como sustratos para la β -oxidación (Bell y col., 2001; Bendiksen y Jobling, 2003) y su destacada importancia fisiológica en los peces. Ambos ácidos grasos se encuentran en altas concentraciones en cerebro y retina de mamíferos y peces, indicando su vital papel en la función neuronal y visual (Sastry, 1985; Crawford, 1993; Sargent y col. 1993; Uauy-Dagach y col., 1994, Tanaka y col. 2003; Valenzuela, 2009). Además, el DHA tiene un papel relevante en el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de las membranas celulares, facilitando, gracias a su particular disposición espacial, que le confiere una sorprendente flexibilidad, la creación de una fase hexagonal en lugar de la convencional bicapa, facilitando rápidos cambios conformacionales en las proteínas de membrana, que de otra manera serían energéticamente desfavorables (Sargent y col., 1993; Teague y col., 2002). El DHA se acumula en todas las clases lipídicas polares, preferentemente en la FE, facilitando rápidos eventos de fusión de membrana como los que tienen lugar, por ejemplo, en los procesos sinápticos y de fertilización del óvulo por el esperma (Glaser y Gross, 1994; Zalata y col., 1998). En todas las muestras analizadas, y como se ha descrito para la seriola (Tanaka y col., 2003), el ARA se localiza casi exclusivamente en el FI. Concretamente, Sargent y col. (1989) señalan que se encuentra anclado en la posición sn-2 del FI y que desempeña un papel crucial en la transducción de las señales celulares. El ARA, juega un papel preponderante como precursor de eicosanoides, compuestos biológicos altamente activos de 20C, derivados de los C20 PUFA, principalmente ARA y EPA. Prácticamente cualquier tejido del pez es capaz de producir eicosanoides, que intervienen en un amplio rango de acciones fisiológicas como la coagulación sanguínea, respuesta inmune, respuesta antiinflamatoria, tono cardiovascular, función renal, función neuronal, osmorregulación y reproducción (Sargent y col., 2002).

Es interesante resaltar también, que los ácidos grasos saturados presentes en músculo, hígado y cerebro de los ejemplares que recibieron la DC se mantuvieron

estables alrededor del 30%, a pesar de que su nivel en la dieta fue muy superior (42,5%). Esta misma tendencia hacia la estabilidad de los saturados en determinados tejidos fue observada en trucha arco iris (Yu y col., 1977) y pez gato (Stickney y Andrews, 1971). Por tanto, parece factible pensar en la existencia de un mecanismo en los peces para regular y mantener el adecuado nivel de saturación de sus lípidos, de manera que el valor de la relación insaturados/saturados refleja, en cada órgano, el equilibrio de los sistemas enzimáticos implicados en la producción y/o esterificación de esos ácidos grasos, necesario para su correcto funcionamiento. En nuestro estudio, esta relación resulta más baja en el hematocrito e intestino, que en el resto de órganos. En el intestino, existen potentes mecanismos para la regulación homeoviscosa de las membranas celulares de un epitelio osmoregulador, que está en constante contacto con un medio de tonicidad variable y que es responsable del transporte de agua, electrolitos y nutrientes. Se hace necesario por lo tanto, ajustar de manera precisa el grado de insaturación de sus membranas mediante la modificación de la actividad de las enzimas implicadas en su deacilación/reacilación y elongación/desaturación, las proporciones de las distintas moléculas de fosfolípidos, e incluso, la relación colesterol/fosfolípidos. En el hematocrito, es igualmente esencial mantener una proporción insaturados/saturados adecuada para evitar la fragilidad de su membrana celular (Lee y col., 1989; Thompson y col., 1995).

Destacar por último, que la relación (n-3)/(n-6) se mantuvo bastante estable en todos los órganos y hematocrito, oscilando entre valores de 3,4 y 5,6, salvo en el cerebro, donde se elevó hasta 7,8, reflejando una vez más, la bien documentada importancia de esta relación no sólo de cara a asegurar la correcta funcionalidad de las estructuras de la membrana (Sargent y col., 2002), sino también en el mantenimiento de un equilibrio en la actividad de las enzimas involucradas en la producción de eicosanoides. En este sentido, ciertos ácidos grasos poliinsaturados de la dieta y más específicamente la relación EPA/ARA, modulan la biosíntesis de eicosanoides (Willis, 1981; Bell y col., 1991a; Ashton y col., 1994). Así, el EPA reduce la producción de eicosanoides con acción proinflamatoria derivados del ARA, incrementando la formación de eicosanoides de baja actividad biológica derivados del EPA *vía* lipooxigenasa (12-HEPE) (Surette y col., 1995). Bell y col. (1994), trabajando con astrocitos de cerebro de rodaballo, encontraron una disminución de PGE₂ y PGF₂

al añadir EPA al cultivo celular y demostraron que la alimentación de esta especie con aceites de origen vegetal reducía los niveles plasmáticos del tromboxano TXB₂, derivado del ARA. Esta modificación puede ser debida a inhibiciones competitivas entre dichos ácidos grasos como sustratos de varias enzimas: a) de la $\Delta 6$ desaturasa, que modificaría la síntesis de ARA y EPA a partir de 18:2(n-6) y 18:3(n-3), respectivamente, sobre todo en peces de agua dulce; b) de las acilasas y transacilasas que esterifican dichos ácidos grasos en el FI como sustrato previo en la síntesis de eicosanoides c) directamente de la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa por la síntesis de eicosanoides (Montero e Izquierdo, 2001). Ashton y col. (1994) probaron en trucha arcoiris dietas basadas en ácido linoleico, o (n-3) HUFA y encontraron que la proporción relativa de eicosanoides derivados del ARA y EPA fue de 14:1 para los peces alimentados con la dieta basada en ácido linoleico, frente a 1:1,5 para los peces alimentados con la dieta rica en (n-3) HUFA. Además, no se pudo detectar LTB₅ en los peces alimentados con la dieta rica en linoleico, demostrando el relevante papel de los ácidos grasos de la serie (n-3) en el mantenimiento del equilibrio de eicosanoides.

La elevada presencia de 18:1(n-9) y 18:2(n-6) en los TG del **músculo** de las doradas del grupo DC frente a las clases lipídicas polares, confirma el uso preferencial de éstos ácidos grasos como fuente de energía metabólica para la natación (Sidell y col., 1995; McKenzie, 2001; Sargent y col., 2002). No obstante, también parecen ser importantes para la producción de energía en este órgano, ácidos grasos monoinsaturados de 16, 20 y 22C, así como saturados de 14 y 16C. De hecho, el 22:1(n-11) fue detectado exclusivamente en los TG, coincidiendo con la apreciación de que en rarísimas ocasiones está presente en cantidades significativas en los fosfolípidos, por lo que se le asigna una función exclusivamente energética en peces (Sargent y col., 2002). Por tanto, la oxidación selectiva de monoinsaturados y saturados frente a PUFA en este tejido, contribuiría a explicar la retención de ARA, DHA, y en menor medida de EPA en sus lípidos polares, como se evidencia en nuestro trabajo y en otros llevados a cabo en dorada y otras especies carnívoras marinas (Regost y col., 2003b; Izquierdo y col., 2005; Montero y col., 2005; Mourente y Bell, 2006; Fountoulaki y col., 2009), así como en salmónidos (Skuladottir y col., 1990; Brodtkorb y col., 1997; Bell y col., 1998; Miller y col., 2007). Esta acumulación

de DHA en el músculo, es clave en la evaluación de la calidad nutricional del filete de cara al consumo humano. En este sentido, la Sociedad Internacional para el Estudio de Ácidos Grasos y Lípidos (ISSFAL) sugiere una ingesta diaria de 500 mg de EPA+DHA en adultos y un mínimo de 200 mg de DHA en el caso de mujeres embarazadas y lactantes. Además, la EFSA, Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, recomienda el consumo diario de, al menos, 250 mg de EPA+DHA, para mantener una buena salud cardiovascular. Una ración de 200 g, libre de espinas y piel, de un pez perteneciente a la DC aportaría aproximadamente 400 mg de DHA y 200 mg de EPA, cubriendo holgadamente estas recomendaciones. A pesar de que los aceites de origen animal aportan menores proporciones de 18:2(n-6) que la mayoría de los AVs utilizados en acuicultura, la presencia de este ácido graso en los fosfolípidos del músculo, y por ende, en su LT, es mayor que en cualquier otro órgano estudiado. Este hecho debe hacernos reflexionar sobre la inclusión del 18:2(n-6) en las dietas para acuicultura, de cara a preservar el valor nutricional del pescado para consumo humano, ya que como se demuestra en éste y otros estudios, se trata de un ácido graso que se incorpora fácilmente al músculo de los animales (Turchini y col., 2009), en detrimento de la incorporación de otros más beneficiosos como el EPA o el DHA.

El perfil de ácidos grasos presente en los TG de **hígado** de los peces DC es semejante al del músculo. Así, el 26-27% de 18:1(n-9), y el aproximadamente 3% de los MUFA de 20 y 22C, parecen indicar que ambos órganos presentan especificidades similares a la hora de oxidar éstos ácidos grasos monoinsaturados. Por el contrario, la mayor proporción de saturados de 16C y, sobre todo, de 18C presente en los TG del hígado, sugiere que su β -oxidación es importante en este órgano de manera similar a lo observado para diversas especies de teleósteos (Tocher y col., 2002; Stubhaug y col., 2005a). Por otro lado, la marcada acumulación de PUFAs, especialmente de la serie (n-3), en los fosfolípidos hepáticos, se debe indudablemente al papel estructural de estos compuestos en las biomembranas de numerosos orgánulos implicados en la alta actividad oxidativa y lipogénica del hígado, así como a su presencia en las lipoproteínas resultantes de esta actividad lipogénica. Al comparar el perfil de ácidos grasos de los peces alimentados con la DC, con los obtenidos para esta misma especie por Martín (2003), observamos que, a pesar de

que las dietas empleadas presentaron una composición en ácidos grasos totalmente diferente, y que los ejemplares experimentales eran machos reproductores, los peces mantuvieron su perfil de ácidos grasos en el TLP prácticamente iguales a los de nuestro estudio, mientras que el de los TG mostró las diferencias existentes entre las dietas. Estas observaciones parecen indicar la existencia de mecanismos homeostáticos lipídicos muy precisos y bien definidos genéticamente en la dorada.

Como se señaló anteriormente, la relación insaturados/saturados presente en el **hematocrito** de los peces DC, es tan baja como la de ambos segmentos del tracto intestinal, lo que parece indicar una baja fluidez de sus membranas. Por otro lado, podemos suponer que la elevada relación colesterol/fosfolípidos encontrada en las membranas de las células sanguíneas, también participa activamente en la regulación de la fluidez de sus membranas (Hazel, 1995; Crockett, 1998), reduciendo la fragilidad celular, proporcionando la flexibilidad necesaria para discurrir por el minúsculo diámetro de los capilares sanguíneos y, en definitiva, contribuyendo a mantener su funcionalidad. Los escasos estudios existentes que analizan la composición en ácidos grasos del hematocrito dificultan la discusión de nuestros resultados. Tomando como referencia el estudio de Thompson y col. (1995) en salmón Atlántico, observamos que el LT de los eritrocitos de salmón es especialmente rico en (n-3) HUFA, sobre todo en DHA, mientras que el hematocrito de dorada presenta valores casi 4 veces más bajos de éste ácidos graso, aunque similares de EPA, diferencias que podrían ser atribuidas al patrón típicamente de aguas frías que presenta el eritrocito de salmón con necesidad de ácidos grasos con mayor número de insaturaciones (Henderson y Tocher, 1987). Del análisis individualizado de la composición en ácidos grasos de las distintas clases lipídicas polares, destacamos la alta presencia de ARA en el FI del eritrocito de salmón Atlántico, que contrasta con los mayores niveles de EPA frente a ARA presentes en esta clase lipídica en la dorada, y que sugiere, bien la mayor disponibilidad del (n-6) PUFA para la producción de eicosanoides en el salmón, bien una mayor relevancia del EPA como componente estructural y como precursor de eicosanoides en la dorada. Por otro lado, 18:0 y 18:1(n-9) presentan porcentajes entre 2 y 3 veces más bajos en el salmón Atlántico. Muchas de estas variaciones pueden ser atribuidas a las diferentes condiciones ambientales y dietarias en las que se desarrollan ambas especies.

La concentración de DHA presente en el **cerebro** de los peces DC fue la más alta de todos los órganos estudiados, acercándose al 20% del total de ácidos grasos y alcanzando su máxima representatividad en la FS (40,3%). Esta mayor concentración del DHA en la FS, a diferencia de lo observado en el resto de órganos, donde se acumula de manera preferente en la FE, es probablemente debida a que la FS sea el fosfoglicérido que presenta mayor abundancia de la especie molecular di-22:6(n-3) (Sargent y col., 1993). Estudios de modelación molecular indican que las especies di-22:6(n-3) de los fosfoglicéridos generan estructuras altamente ordenadas dentro de las bicapas lipídicas (Teague y col., 2002). El DHA juega un papel crítico en el desarrollo y funcionamiento del cerebro, y del sistema nervioso en general, durante las primeras etapas del periodo postnatal (Valenzuela, 2009), por lo que su papel es fundamental en los fosfolípidos de cerebro y retina, observándose una función visual reducida en mamíferos (Innis, 1991; Connor y col., 1990, 1992) y peces (Sargent y col., 2002) que presentan bajas concentraciones de este ácido graso en estos órganos. La detección de una proporción relevante de 24:1 en la FC, coincide con la aparición en esta clase lipídica de una especie molecular única, como es la combinación 18:1-24:1 en las posiciones sn-1 y sn-2, y cuya funcionalidad aún no se ha definido claramente (Sargent y col., 1993). Nuestros resultados apoyan la función estructural del 24:1 al estar presente en todas los fosfolípidos del cerebro, pero no en los TG. También se considera interesante destacar la elevada selectividad en la acilación del EPA en la molécula de FI del cerebro de la dorada y de la seriola, en proporción 1:1 con el ARA (Tanaka y col., 2003), probablemente con el objetivo de regular la producción de eicosanoides derivados de uno u otro ácido graso. Además, teniendo en cuenta que la activación de la proteinkinasa C (PKC) es más potente cuando los diacilgliceroles presentan ARA (Bell y Sargent, 1987; Pettitt y Wakelam, 1998), el equilibrio EPA/ARA en el cerebro, podría ayudar a la regulación de este proceso. Finalmente, debemos citar la presencia en éste órgano, de manera casi exclusiva y en cantidades representativas, de dimetilacetales (DMA), concentrados en la FE. Los DMA son éteres de ácidos grasos que proceden exclusivamente de los plasmalógenos. Los plasmalógenos son glicerofosfolípidos que llevan en su posición sn-1 una cadena de 18:0 (y en menor medida 16:0 y 18:1(n-9)), así como un ácido graso poliinsaturado, específicamente ARA o DHA, ocupando la posición sn-2. Por lo tanto, la cantidad de DMAs refleja estequiométricamente la cantidad de

plasmalógenos, constituyentes mayoritarios de la vaina de mielina, presentes principalmente en la FE (plasmeniletanolaminas), en menor medida en la FC, y de manera esporádica en otros fosfolípidos como el FI. Además de contribuir a la integridad estructural de la membrana, los plasmalógenos están implicados en múltiples funciones celulares como la formación de vesículas y la fusión de membranas, el transporte de iones y la generación de señales de segundos mensajeros como el factor activador de plaquetas (PAF). El enlace vinil-eter de estas moléculas les confiere propiedades antioxidantes que mitigan la formación de radicales libres causantes de daño celular (Nagan y Zoeller, 2001; Brites y col., 2004; Farooqui y col., 2008).

Salvo excepciones puntuales, ambos **segmentos intestinales** manifestaron en los peces DC los niveles más altos de 16:0 y 18:0 de todas las clases lipídicas polares, el primero de ellos principalmente en la FC, y el segundo en la FS, así como los más reducidos de 18:1(n-9) en FC, FS y FE, de los más bajos en EPA y valores medios de DHA. Esta distribución de ácidos grasos da lugar a que para cada clase fosfolipídica, el ratio insaturados/saturados en ambos segmentos de intestino sea, con la excepción del presente en el FI del hematocrito, el más reducido de todos los órganos analizados y hematocrito.

La probable mayor acilación de los ácidos grasos saturados 16 y 18C en las posiciones sn-1 de las moléculas de fosfoglicerol, especialmente en la FC y FE, las más abundantes de las clases lipídicas polares, o la elevada proporción colesterol/fosfolípido total encontrada en ambos segmentos, deben conferir al enterocito un equilibrio entre la fluidez y la rigidez de la membrana, necesario para su correcto funcionamiento en condiciones ambientales cambiantes (Di Constanzo y col., 1983; Crockett y Hazel, 1995). La presencia de DMAs en el LT del intestino, aunque en proporciones inferiores al 1%, es atribuible a la presencia de dos importantes plexos nerviosos en este tejido. El plexo de Auerbach o plexo mientérico o externo (entre las capas musculares longitudinal y circular), que controla los movimientos gastrointestinales y el plexo de Meissner o plexo interno (en la submucosa), que regula la secreción gastrointestinal y el flujo sanguíneo local (Hill y col., 2006). Por último, podemos afirmar que el perfil de ácidos grasos de ambos segmentos intestinales es muy similar. No obstante, se detectan pequeñas modificaciones en el

nivel de ciertos ácidos grasos, considerados clave para conferir a las membranas celulares sus propiedades físicas y que podrían explicar, al menos en parte, las diferencias de funcionalidad encontradas en el eje antero-posterior de los ejemplares alimentados con la DC. Así, destacaremos la menor presencia de 16:0 en todos los fosfolípidos del tramo posterior salvo en la PC, de 18:1(n-9) en la FE, así como de 18:0 en la FS. Igualmente es relevante el hecho de que el porcentaje de DHA en la FS y de ARA en el FI fuera más de dos veces superior en el tramo distal. En conjunto, estas variaciones de composición en ácidos grasos del intestino de doradas DC, dieron lugar a una relación insaturados/saturados significativamente más baja en todas las clases lipídicas del tramo anterior, que al mantenerse constante la proporción colesterol/fosfolípido, podría ser responsable, al menos parcialmente, de las diferencias funcionales encontradas.

En definitiva, de nuestras observaciones parece deducirse que, a nivel lipídico, el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de las membranas celulares depende de la interacción de un amplio conjunto de factores. Entre estos factores podrían incluirse, no sólo la relación insaturados/saturados, o el contenido de colesterol y del total de fosfolípidos, sino también, la proporción relativa de cada clase fosfolípida, la composición de ácidos grasos específica de cada una de ellas, en particular, de 16:0, 18:1(n-9), EPA, DHA y ARA, y el ratio entre familias de ácidos grasos como las series (n-3) y (n-6).

Influencia de la composición en ácidos grasos de la dieta deficiente en HUFA (DD) sobre la composición lipídica de los órganos y células sanguíneas

Seguidamente se analizan las alteraciones más destacables producidas por la deficiencia dietaria de AGE, al sustituir totalmente el AP por una mezcla de AOA y AVs. Estas alteraciones se ven reflejadas en el patrón lipídico del órgano o tejido, pudiendo comprometer su funcionalidad, afectar al saludable desarrollo de los juveniles y reducir el efecto beneficioso que el pescado tiene para el consumidor.

La deficiencia dietaria de AGE puede modificar el contenido lipídico de ciertos tejidos y órganos de los peces (Bell y col., 2001; Dópido, 2006; Menoyo y col., 2006; Benedito-Palos y col., 2008; Peng y col., 2008; Díaz-López y col., 2009). Diversos

autores han demostrado que la deficiencia de AGE puede dar lugar a alteraciones metabólicas y endocrinas relacionadas con el almacenamiento y la oxidación de los ácidos grasos, que conllevan mayores flujos de estos compuestos desde el tejido adiposo hacia el hígado y músculo (Browning y Horton, 2004; Avramoglu y col., 2006). En nuestro estudio, no todos los órganos resultaron afectados de la misma manera por la ingestión prolongada de la DD, sino que se generó una alta deposición grasa en el hígado y en el intestino, que no se manifestó a nivel de la masa muscular, el hematocrito o el cerebro. Benedito-Palos y col. (2010), también observaron diferencias en los patrones de conservación lipídica en órganos de doradas alimentadas con dietas en las que se sustituyó el AP por niveles crecientes de AVs.

Tanto el IHS como el aspecto general del hígado, se relacionan con la existencia de alteraciones metabólicas como hígado graso o esteatosis hepática, propia de peces obesos y que puede estar inducida por la deficiencia dietaria de AGE (Caballero y col., 2004; Piedecausa y col., 2007; Peng y col., 2008; Fountoulaki y col., 2009). Esta deficiencia dificulta un adecuado empaquetamiento de las lipoproteínas necesarias para el transporte de los lípidos desde el hígado, dando lugar a la acumulación de grasa en este tejido (Henderson y Tocher, 1987). La administración de AVs en proporciones elevadas en la dieta de peces carnívoros y omnívoros se suele asociar con este incremento de la deposición grasa en el hígado (Kalogeropoulos y col., 1992; Rodríguez y col., 1997; Bell y col., 2001; Tocher y col., 2002; Menoyo y col., 2004, 2006; Ruyter y col., 2006; Francis y col., 2007; Benedito-Palos y col., 2008; Peng y col., 2008), que va ligado con frecuencia al aumento del IHS (Piedecausa y col., 2007; Peng y col., 2008; Fountoulaki y col., 2009), y a la formación de vesículas de grasa en hepatocitos (Caballero y col., 2002, 2004; Rodríguez y col., 2002; Benedito-Palos y col., 2008). Un desequilibrio lipídico dietario como es la deficiencia de HUFA, pudo dificultar igualmente la adecuada síntesis y transporte de quilomicrones a nivel del enterocito (Leger, 1985), dando lugar a un incremento lipídico en el intestino, similar al registrado en el hígado (51 y 60 %, respectivamente), y que puede llegar a producir la acumulación grasa en los enterocitos y en los espacios intercelulares del epitelio intestinal (Olsen y col., 1999, 2003; Caballero y col., 2003; Sitjà-Bobadilla y col., 2005; Dópido, 2006). Otros síntomas indicadores de un “tejido graso”, como son la inflamación, abrasión, blanda

consistencia y palidez (Castell y col., 1972a; Takeuchi y col., 1983; Deplano y col. 1989, 1991; March, 1993; Rodríguez y col., 2002), se manifestaron tanto en el hígado, como en ambos segmentos intestinales de las doradas DD (**Figuras 4.1 y 4.2**). No obstante, el incremento del IHS que suele ir asociado a un hígado graso (Piedecausa y col., 2007; Peng y col., 2008; Fountoulaki y col., 2009), no se registró en nuestro estudio, tal vez debido a que el fuerte incremento de lípido fue acompañado de una disminución significativa de su contenido hídrico (67,89% en DC y 64,91% en DD), y por lo tanto, del peso del hígado. Esta disminución de agua asociada al incremento de grasa también tuvo lugar en el IA (66,67% en DC y 62,39% en DD) y en el IP (72,65% en DC y 69,55% en DD).

A pesar de los desajustes generados por la dieta en el hígado, no resultaron afectadas sus proporciones relativas del TLP y TLN, ni la de TG. El incremento homogéneo del LT a lo largo del tracto intestinal de las doradas DD, es similar al descrito en enterocitos de esta misma especie por Dópido (2006), utilizando una dieta elaborada con aceite de oliva (72% de 18:1(n-9)) como único aporte lipídico. Así, la deposición grasa observada por el autor en condiciones de deficiencia dietaria de HUFA en enterocitos y musculatura subyacente de cada tramo de intestino, ronda igualmente el 50%. Sin embargo, la respuesta de la distribución de las clases lipídicas a la deficiencia de AGE, resulta diferente en el intestino completo y en las células aisladas. Así, mientras que en los enterocitos tiene lugar un incremento generalizado de los TG, al analizar el tejido completo, el IA aumenta su contenido en LP y disminuye el de TG, mientras que el IP responde de manera inversa. Las diferencias encontradas se deben probablemente a la metodología empleada, al utilizar el tejido completo en nuestro estudio o células aisladas por Dópido (2006). Variaciones en la distribución de otras clases lipídicas, como colesterol o FG, entre ambos segmentos intestinales en respuesta a la deficiencia de AGE evidencian diferencias funcionales a lo largo del tracto intestinal de peces, como ya ha sido señalado previamente por otros autores (Lorenzo y col., 1987b; Dópido y col., 2004; Dópido, 2006).

Los peces que ingirieron la DD, redujeron la presencia de colesterol en el **músculo**, probablemente por su menor presencia en la dieta o para responder a la demanda de otros tejidos a los que el hígado no pudo abastecer adecuadamente. En general, las variaciones en el perfil de ácidos grasos del LT se deben a las

modificaciones observadas en los TG, si bien, el tejido también refleja en sus fosfolípidos el alto nivel de 18:2(n-6) y 18:3(n-3) de la DD y trata de mantener los niveles de ARA, EPA y, sobre todo DHA, a pesar de que su presencia es prácticamente nula en la DD. Estas variaciones en el perfil de ácidos grasos del músculo afectan indudablemente a su calidad nutricional, de manera que un filete de estos peces aportaría aproximadamente un 40% menos de DHA y un 55% menos de EPA por unidad de peso, que uno de los peces DC. Podemos decir entonces, que la alimentación con la DD dio lugar a pescado de peor calidad nutricional y menos beneficioso para la salud, al disminuir el ICP (índice de calidad de los lípidos) e incrementar el IT (índice de trombogenicidad). Resultados similares han sido obtenidos por Turchini y col. (2003) al sustituir completamente el AP por aceite de origen vegetal o de animales terrestres en trucha marrón, *Salmo trutta*.

El **hígado** de peces alimentados con la DD, mostró un perfil de ácidos grasos totalmente desbalanceado con respecto al de los peces control, no sólo en los TG, sino también en el total de fosfolípidos, y, por tanto, en el LT, reflejando la importancia que los ácidos grasos de la dieta tienen sobre la integridad funcional del principal centro metabólico del pez. Es evidente por tanto, la existencia en los peces DD de una desregulación metabólica, relacionada probablemente, con la excesiva disponibilidad de 18:2(n-6), ácido graso poco común en la dieta de peces marinos carnívoros, que es masivamente esterificado en fosfolípidos y TG (Caballero y col., 2004; Menoyo y col., 2004; Ruyter y col., 2006; Francis y col., 2007; Benedito-Palos y col., 2008). Creemos interesante resaltar que, a pesar de la menor proporción de 16:0 presente en la DD (18,9%), frente a la DC (24,0%), los niveles de este ácido graso en el TLP y TG de ambos grupos de peces fue similar. Por el contrario, la cantidad de 18:1(n-9) en la DD superó a la de la DC (27,5% vs. 22,1%), observándose una acumulación preferente del monoinsaturado en el TLP de los peces DD, mientras que en los TG de este grupo, se incrementó en menor medida con respecto a los valores de referencia de los peces DC. Estos hechos sugieren que tanto el 16:0 como el 18:1(n-9) están siendo esterificados mayormente en los fosfolípidos para mantener, en lo posible, el equilibrio necesario para preservar la integridad estructural y funcional de la membrana de los hepatocitos, ante la escasa disponibilidad de (n-3) HUFA como EPA y DHA. En este sentido, los monoinsaturados y saturados se esterifican de

forma preferente en la posición sn-1 de la molécula del fosfoglicérido, mientras que los HUFA compiten con los PUFA por unirse en la posición sn-2. Por tanto, la alta disponibilidad del 18:2(n-6) en los peces del grupo DD, disminuye la posibilidad de esterificar HUFA, por simple competitividad de los sustratos por las enzimas acil-transferasas implicadas en este proceso.

Diversos estudios en salmón Atlántico y trucha han demostrado que la actividad de la ruta biosintética de los HUFA se incrementa sustancialmente en los peces en los que se sustituye el AP por AVs (Buzzi y col., 1996; Rodríguez y col., 1997; Bell y col., 2001, 2002; Tocher y col., 2002; Zheng y col., 2004, 2005), probablemente debido a la reducción en la supresión de la actividad enzimática producida por la elevada presencia de (n-3) HUFA en el AP (Tocher y col., 2003). La limitada capacidad elongasa-desaturasa de los peces carnívoros marinos incluyendo la dorada (Mourente y Tocher, 1993; Ghioni y col., 1999; Seileiz y col., 2003; Almada-Pagán y col., 2007; Díaz-López y col., 2010), se evidencia en nuestro estudio, a pesar de lo cual es posible detectar en los peces DD, un incremento generalizado en la producción de pequeñas cantidades de derivados de cadena más larga y/o insaturada procedentes del 18:1(n-9) y de los C18 (n-6) y (n-3) PUFA. Este incremento, que se hace más evidente en el hígado, se correspondería con la acción de la $\Delta 6$ desaturasa en la producción de 18:2(n-9) y 18:3(n-6), seguidamente elongados a sus respectivos C20, y de la posterior intervención de la $\Delta 5$ desaturasa para obtener 20:3(n-9). La ausencia de derivados de desaturación del 18:3(n-3), parece contradecir lo descrito en otros trabajos donde las desaturasas $\Delta 6$ y $\Delta 5$ muestran cierta preferencia por los (n-3) PUFA (Tocher y Dick, 1990; Sargent y col., 2002), o para mamíferos, donde el orden de preferencia es: (n-3) > (n-6) > (n-9) (Stubbs y Smith, 1984). En nuestro estudio, sólo es posible detectar cierta cantidad de 20:3(n-3) derivado por elongación directa del ácido linolénico, posiblemente en un intento de compensar la deficiencia dietaria de (n-3) HUFA. Sin embargo, esta mayor tasa de conversión de los precursores C18 (n-6) y (n-9), frente a los (n-3) ha sido descrita para la dorada (Díaz-López y col., 2009, 2010) y otras especies (Tocher y col., 2006) y podría deberse a la mayor disponibilidad en la dieta de los ácidos grasos precursores. En definitiva, el incremento de la actividad desaturasa ante la deficiencia dietaria de AGE, incluyendo la $\Delta 9$, que inserta una insaturación en el ácido graso saturado, es interpretado como

un intento de regular el índice de insaturación y por lo tanto, la fluidización y correcta funcionalidad de la membrana, participando de este modo las desaturasas en la regulación del orden lipídico de la bicapa (Hagar y Hazel, 1985; Buzzi y col., 1996; Rodríguez y col., 1997). No olvidemos que una grasa saturada, como el 18:0 presente abundantemente en el sebo de vaca, es sólida a temperatura ambiente y que un sólo doble enlace, como en el 18:1(n-9) del aceite de oliva, le convierte en una molécula altamente fluida. Los sucesivos dobles enlaces añaden flexibilidad y confieren a los ácidos grasos propiedades únicas más relacionadas con su capacidad de ordenación y fusión en las membranas.

Los eritrocitos no sintetizan su propio lípido sino que lo obtienen del plasma circundante (Shohet, 1977). Aunque la ingestión prolongada de una dieta deficiente en HUFA no dio lugar a una acumulación grasa en el **hematocrito**, probablemente debido a la alta velocidad de regeneración a la que están sometidas las células sanguíneas, sí se evidenció alteraciones en el perfil de ácidos grasos, coincidiendo con las observaciones de otros autores en peces (Leray y col., 1986; Ashton y col., 1994; Kiron y col., 1994), y en mamíferos (Hagave y col., 1991). Aunque se aprecia un intento por mantener invariable la cantidad de (n-3) HUFA en los fosfolípidos de los peces del grupo DD, se produce una significativa reducción de los niveles de EPA (entre 2 y 5 veces) en todas las clases lipídicas polares salvo en el FI donde permaneció invariable, y una disminución del DHA en la FC. Varios investigadores han postulado la existencia de una correlación positiva entre la alimentación de los peces con dietas ricas en ácidos grasos saturados con escaso aporte de (n-3) HUFA, y la fragilidad en la membrana de los eritrocitos, tanto en salmónidos como en especies carnívoras marinas (Boggio y col., 1985; Salte y col., 1988; Erdal y col., 1991; Kiron y col., 1994; Klinger y col., 1996; Montero y col., 1998). Esta mayor fragilidad celular se traduce en mayor susceptibilidad a la lisis celular, lo que podría poner en peligro los procesos de transporte e intercambio de oxígeno y CO₂ a los tejidos en los peces del grupo DD (Montero e Izquierdo, 2001).

Nuestros resultados ponen de manifiesto la sorprendente capacidad del **cerebro** para mantener una composición lipídica estable a pesar de la ingestión prolongada de una dieta con un fuerte desequilibrio en su composición en ácidos grasos, como la DD (Ashton y col., 1993; Fernández Borrás, 1993; Mourente y Tocher, 1994; Bell y col.,

1995b; Benedito-Palos y col., 2010). El mantenimiento de la concentración de DHA en el cerebro de los peces que ingirieron la dieta deficiente en HUFA, sugiere que una amplia variedad de funciones neuronales, incluidas el comportamiento social y funciones visuales fueron preservadas. El cerebro parece activar potentes mecanismos homeostáticos dirigidos a preservar el 'turnover' de sus lípidos estructurales a partir de sus reservas endógenas, hecho que se evidencia con la disminución de los TG y el aumento de ácidos grasos libres. El único ácido graso que experimentó un incremento generalizado en los fosfolípidos del cerebro de este grupo de peces, fue el 18:2(n-6), como consecuencia del elevado aporte dietario de este ácido graso (27,2%). A pesar del 7% de 18:3(n-3) presente en este pienso, no fue incorporado en las clases lipídicas polares sino en los TG, demostrando que no es un buen sustrato para su esterificación en los fosfolípidos. Al analizar los efectos de la deficiencia de DHA sobre la visión de los peces, Bell y col. (1995b) observaron que, dentro de los fosfolípidos, la FE, y especialmente la FS, fueron las más resistentes a sufrir variaciones en su composición. También en nuestro estudio son estas dos clases lipídicas polares las que presentan menores modificaciones de su perfil de ácidos grasos por la deficiencia dietaria de HUFA.

En ambos **segmentos intestinales**, la FC fue el fosfolípido más afectado por los ácidos grasos dietarios. Si tenemos en cuenta que el porcentaje de FC rondó el 42% del total de los fosfolípidos en ambas secciones de intestino, parece lógico pensar que la alteración en el perfil de sus ácidos grasos puede afectar a la integridad funcional del intestino. Estudios previos realizados por nuestro grupo en enterocitos aislados del intestino anterior y posterior de dorada, han mostrado que el porcentaje de FC también representó aproximadamente el 42% del TLP (Dópido, 2006). Asimismo, Díaz-López y col. (2009) concluyeron que el perfil en ácidos grasos de enterocitos aislados de dorada, era profundamente afectado cuando los peces fueron alimentados durante 4 ó 7 meses con una dieta basada en el aceite de *Echium* como fuente lipídica, frente a peces alimentados con una dieta elaborada con AP. Los cambios en el perfil de ácidos grasos de las membranas intestinales inducidos por la dieta han sido bien documentados en salmónidos (Jobling y Bendiksen, 2003; Olsen y col., 2003; Björnsson y col., 2004). Los peces del grupo DD tienden a acumular en los TG del tracto intestinal altos niveles de 18:1(n-9), 18:2(n-6) y 18:3(n-3), reflejando la

composición en ácidos grasos de la dieta. A pesar de la mínima cantidad de EPA y DHA presente en la DD, se observa una marcada tendencia a la esterificación de ambos ácidos grasos, sobre todo del DHA, en los fosfolípidos de ambos segmentos intestinales, lo que parece reflejar una mayor afinidad por estos dos ácidos grasos de las acilasas y transacilasas que esterifican ácidos grasos en las moléculas de fosfoglicéridos (Caballero y col., 2003). Nuestros resultados señalan que los saturados de 16 y 18C, son preferentemente utilizados en la conservación de la estructura fosfolipídica de la membrana de las células intestinales, incluso en condiciones de deficiencia de AGE. Olsen y col. (2000) apuntan que ácidos grasos como el 16:0, principal componente de la FC, son requeridos para mantener la síntesis de FC en las células intestinales y por lo tanto, una alta síntesis de lipoproteínas, evitando la acumulación en los enterocitos de los lípidos absorbidos. Salvo el FI, cuya función parece estar más relacionada con la producción de eicosanoides y otras moléculas que intervienen en la señalización celular, el resto de clases lipídicas del intestino de peces DD, presentó una retención preferencial de los HUFA y la incorporación de elevadas cantidades de 18:2(n-6) y 18:1(n-9). De hecho, la relación insaturados/saturados fue notablemente más alta que en el grupo control, posiblemente alterando las propiedades físicas de las membranas de los enterocitos. En definitiva, la ingestión de una dieta deficiente en HUFA durante un periodo prolongado, ha podido deteriorar la síntesis de lipoproteínas en ambos segmentos intestinales dando lugar a la acumulación de gotas lipídicas en los enterocitos, que se traduce en un daño en el epitelio intestinal (Olsen y col., 1999, 2000), pudiendo repercutir negativamente sobre los procesos de absorción y transporte que tienen lugar a su través.

Los lípidos ingeridos en la dieta, deben ser hidrolizados y sus productos absorbidos. Una vez en el interior de la célula intestinal, los ácidos grasos se reesterifican para formar nuevas grasas neutras, nuevos ésteres de colesterol, fosfolípidos y otras moléculas lipídicas, que son ensambladas en quilomicrones. Los quilomicrones son liberados al sistema linfático y, finalmente, vía sanguínea, llegan a los diferentes tejidos y órganos para ser aprovechados. Caballero y col. (2003), observaron por microscopía electrónica, espacios intercelulares distendidos, ocupados por lípidos, en la zona basal del epitelio intestinal de doradas alimentadas

con una dieta en la que se había sustituido un 60% del AP con aceite de soja, reflejando una capacidad de tránsito dañada a través de la *lamina propia*, debido a una síntesis elevada de VLDL. La presencia de VLDL la relacionan estos autores con la posible mayor tasa de reacidación del 18:2(n-6) en comparación con otros ácidos grasos C18, interfiriendo en el correcto ensamblaje de las lipoproteínas y afectando al transporte lipídico y la correcta esterificación en TG y LP.

El tracto gastrointestinal de peces desempeña un papel esencial en el mantenimiento del balance iónico y de agua, así como en la provisión de nutrientes, mediante la digestión de los alimentos, absorción de nutrientes y eliminación de materias no digeribles. Las investigaciones llevadas a cabo en el epitelio intestinal de vertebrados, incluyendo peces, se han realizado tanto en enterocitos aislados (Pérez y col., 1999; Tocher y col., 2002; Fonseca-Madrigal y col., 2006; Mourente y col., 2005b; Dópido, 2006), como en vesículas de membrana (Storelli y col., 1986; Maffia y col., 1996; Sala-Rabanal y col., 2004) o en el tejido completo (Lorenzo y col., 1987b; Díaz y Lorenzo, 1992; Cozzi, 1993; Díaz y col., 1994; Jutfelt y col., 2007; Trischitta y col., 2007; Geurden y col., 2009). Una de las técnicas más ampliamente utilizadas en estas investigaciones con tejido intestinal intacto es la cámara de Ussing que permite mantener la polaridad del epitelio e imitar condiciones semejantes a las que tienen lugar *in vivo*.

En nuestro estudio, las variaciones anteriormente mencionadas en la composición lipídica de los segmentos proximal y distal del intestino de peces alimentados con la DC, parecen indicar posibles diferencias funcionales a lo largo del eje antero-posterior del intestino. La batería de ensayos desarrollada en la presente memoria de investigación, encaminada a evaluar las características eléctricas y de absorción de electrolitos y nutrientes a lo largo del eje antero-posterior del intestino, pretende corroborar si estas diferencias en el perfil lipídico tienen influencia sobre los procesos fisiológicos que se desarrollan en el tracto intestinal, además de conocer los posibles efectos que la composición en ácidos grasos de la dieta puede tener sobre estos procesos en juveniles de dorada.

Bajo nuestras condiciones experimentales, los parámetros eléctricos medidos en el tejido intestinal de los peces que fueron alimentados con la DC, no variaron

significativamente. Ambos segmentos intestinales presentaron una DP transepitelial, cercana a cero, y una Icc que osciló, como valores más habituales, en el rango de 10 a 12 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, siendo el lado serosal eléctricamente positivo respecto al mucosal. Tanto la positividad del lado serosal del epitelio, como los valores de DP e Icc obtenidos para el segmento anterior del intestino, coinciden con estudios realizados anteriormente en ejemplares de esta misma especie de entre 50 y 100 g de peso medio (Lorenzo y col., 1987b, 1989; Cozzi, 1993). Sin embargo, a diferencia de nuestro estudio, la DP e Icc observada por estos autores varió entre tramos intestinales, siendo menores en el intestino posterior que en el anterior. Aunque la explicación para estas diferencias está poco clara, puede que la elección de los tramos intestinales no coincida en ambos trabajos, o que la diferencia de peso, y por tanto de edad de los ejemplares, haya tenido cierta influencia.

En condiciones de cortocircuito, la conductancia iónica del epitelio puede ser parcialmente atribuida a la permeabilidad de las vías paracelulares a la difusión pasiva de electrolitos. Los bajos valores de resistencia tisular obtenidos en ambos segmentos del tracto intestinal de juveniles alimentados con la dieta control, indican que son epitelios altamente permeables o 'leaky', según la clasificación de Frömter y Diamond (1972). Esta alta permeabilidad epitelial ha sido descrita previamente para otros teleósteos marinos (Ando, 1975; Field y col., 1978; 1993; Evans, 1980; Marshall y Grosell, 2005). En concordancia a lo observado para esta misma especie por Lorenzo y col. (1987b), la conductividad tisular fue mayor en el tramo posterior del intestino que en el tramo anterior, lo que explica que ambos flujos unidireccionales de cloruro y de sodio alcanzaran valores más altos en la porción distal.

Los epitelios 'leaky', son incapaces de mantener altas DP transepitelial que actúen como fuerzas conductoras de los movimientos de nutrientes y electrolitos a su través, pero pueden absorber iones y agua mediante mecanismos específicos en los que prácticamente la totalidad de la absorción de agua está ligada a la absorción de electrolitos (Evans, 1980; Grosell y col., 1999, 2001, 2005; Grosell y Taylor, 2007). Teniendo en cuenta las condiciones en las que se realizaron las medidas de los parámetros bioeléctricos y de los flujos unidireccionales a lo largo del presente trabajo, sin gradientes eléctricos ni gradientes de concentración, al ser idénticas las soluciones a ambos lados del intestino, es obvio pensar que cualquier proceso de

transporte que tuviera lugar en ausencia de dichos gradientes electroquímicos sería necesariamente activo. La presencia de una DP ligeramente serosa positiva en ambos segmentos intestinales, nos revela la existencia de un transporte activo neto de cationes hacia la serosa o, por el contrario, una secreción neta de aniones que den cuenta de las diferencias de potencial observadas. Similarmente a lo descrito por Grosell (2006) en otros teleósteos marinos, nuestros resultados indican una absorción neta de cloruro mayor que la de sodio en ambos segmentos intestinales. Sin embargo, una absorción neta de cloruro superior a una absorción neta de sodio implicaría que el lado serosal fuera negativo respecto del lado mucosal. En varias especies de teleosteos marinos, la DP muestra valores próximos a cero o serosa negativa (Ando y col., 1975; Field y col., 1978; Frizzell y col., 1979; Badía y Lorenzo, 1982; Bolaños y Lorenzo, 1984; Trischita y col., 1992, 2007). Según el modelo de transporte iónico en el epitelio intestinal de teleósteos marinos propuesto por Grosell (2006) y por Grosell y Genz (2006), la concentración de protones a ambos lados del tejido, la absorción de otros electrolitos como el potasio, así como la secreción de bicarbonato, no medidos en el presente estudio, podrían dar lugar a la positividad observada de la DP. Por otro lado, si tenemos en cuenta que en nuestros ensayos, la solución Ringer que bañaba ambos lados del intestino contenía 1 mM de glucosa, no siempre presente en el lado mucosal de esos trabajos citados, el transporte activo de la misma ligada al sodio, también pudo contribuir a la positividad del lado serosal.

Efectos de la dieta deficiente en HUFA sobre los parámetros bioeléctricos y flujos iónicos y de nutrientes, a través del tracto intestinal

Las membranas de los enterocitos están constituidas principalmente por fosfolípidos ricos en determinados ácidos grasos, por lo que su composición, estructura y estado físico-químico son de vital importancia en los procesos absorptivos. Los mecanismos que intervienen en el transporte transcelular de sustancias implican diversas enzimas de membrana. La fluidez y el grado de ordenación de la membrana y, por tanto, la función de las enzimas ligadas a la misma, puede resultar afectada por las modificaciones en el perfil de ácidos grasos de los fosfolípidos, inducidas por la alimentación con una dieta vegetal (Bell y col., 1986; Montero y col., 2003; Mourente y col., 2005b), cuyo perfil de ácidos grasos difiere sustancialmente del de las dietas

formuladas con aceites de origen marino. Jutfelt y col. (2007) apuntan un efecto adverso de la dieta compuesta por AVs en las funciones de transporte transepitelial de nutrientes en el salmón Atlántico, probablemente debido a una disminución de la relación EPA/ARA de los lípidos polares de la membrana, que pudieron alterar la fluidez de la misma, y, por tanto, la función de barrera del epitelio.

Aunque no conocemos estudios que relacionen la influencia de la composición en ácidos grasos de la dieta sobre el transporte de electrolitos a través del tracto intestinal de peces, si existen ciertas observaciones experimentales que han puesto de manifiesto que los ácidos grasos insaturados de cadena larga, entre ellos el ARA, pueden inhibir la absorción neta de Cl^- a través de membranas epiteliales de origen diverso (Anderson y Welsh, 1990; Hwang y col., 1990; De Giorgi y col., 1992) y que el DHA, y en menor medida el EPA, disminuyen la absorción neta de sodio y agua, potenciando la secreción de potasio en el colon de rata (Loeschke y col., 1991). Igualmente tenemos constancia de ciertas investigaciones que han abordado el efecto de los ácidos grasos de la dieta sobre el transporte de nutrientes, entre ellos, los ácidos grasos. En mamíferos, cambios en la absorción de éstos compuestos lipídicos han sido atribuidos a alteraciones en el perfil de ácidos grasos de la membrana apical del enterocito, que es altamente influenciada por los ácidos grasos dietarios (Thomson y col., 1987, 1989). Estudios recientes llevados a cabo en el intestino de trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*, mostraron que cuando los peces fueron alimentados con una dieta en la que la fuente de lípido consistió exclusivamente en aceite de linaza, se incrementaba la digestibilidad de las grasas y la absorción de 16:0 y 18:3(n-3) (Geurden y col., 2009). Según estos autores, la presencia de altas cantidades de C18 (n-3) PUFA en esa dieta, pudo modificar la fluidez u otras propiedades físico-químicas de la membrana apical del enterocito, en comparación con la dieta basada en AP, o la más rica en MUFA, formulada con aceite de colza. Estas modificaciones podrían facilitar la difusión pasiva de los ácidos grasos o incrementar la funcionalidad de los transportadores de membrana.

Bajo nuestras condiciones experimentales, la composición lipídica de la dieta ingerida por los peces no pareció alterar significativamente los parámetros bioeléctricos registrados a través del segmento anterior del intestino. Como se mencionó anteriormente, la conductancia iónica epitelial depende, al menos en parte,

de la permeabilidad existente a través de los espacios intercelulares. Nuestros resultados parecen indicar que la deficiencia en AGE de la dieta, no afecta a la permeabilidad paracelular de la sección proximal del intestino, pero sí a los flujos netos de cloruro y sodio, que se anulan, debido exclusivamente a una disminución significativa de los flujos unidireccionales en sentido mucosa-serosa de ambos iones. Si tenemos en cuenta que la única diferencia entre las dietas experimentales fue su composición en ácidos grasos, se sugiere que éstos actuaron de forma directa o indirecta sobre la membrana apical del enterocito, reduciendo la entrada de cloruro y sodio al interior celular. El hecho de que ni la conductancia tisular, ni los flujos unidireccionales hacia la luz intestinal se vieran afectados, corrobora la hipótesis de que la permeabilidad paracelular no sufriera cambios en este segmento intestinal debido a los ácidos grasos dietarios.

Al analizar los parámetros bioeléctricos y flujos unidireccionales y netos en el intestino posterior de los peces que ingirieron la DD, se observa que tanto la I_{cc} , como la G_t resultaron incrementados con respecto a los que tomaron la DC. El incremento en la G_t se refleja en una tendencia, no siempre significativa, a aumentar los flujos unidireccionales de cloruro y de sodio en ambos sentidos, dando lugar a la anulación de la absorción neta de ambos electrolitos. Estos resultados indican claramente que en la porción distal del intestino, y a diferencia de la porción proximal, la deficiencia dietaria de AGE, incrementó la permeabilidad paracelular del epitelio. Un incremento de la permeabilidad transepitelial también fue observado en el intestino de truchas alimentadas con una dieta elaborada con aceites vegetales (Geurden y col., 2009) y en el de Salmón atlántico (Björnsson y col., 2004; Jutfelt y col., 2007), sugiriendo que las dietas que contienen AVs pueden dañar la barrera intestinal. De manera similar a lo establecido en nuestro estudio, Jutfelt y col. (2007), señalan una mayor sensibilidad del intestino posterior del salmón Atlántico, a los cambios en el perfil de ácidos grasos de una dieta elaborada exclusivamente con aceite de girasol.

Teniendo en cuenta las diversas funciones que pueden ejercer los ácidos grasos, se podrían proponer varias hipótesis para explicar cómo su presencia en el alimento modula el transporte de electrolitos y la G_t en el epitelio intestinal de dorada. Una de estas hipótesis podría estar relacionada con la incorporación de los ácidos grasos dietarios a los fosfolípidos de las membranas de los enterocitos, modificando el perfil

lipídico de las mismas. Es bien conocido que la mucosa intestinal tiene un rápido 'turnover' celular, de manera que los cambios dietarios de ácidos grasos se manifiestan rápidamente en el tejido (Pérez y col., 1999; Olsen y col., 2003). Los ácidos grasos que se unen a los fosfolípidos de la membrana apical o basolateral del enterocito, pueden alterar las propiedades físico-químicas de dichas membranas, dando lugar a una disminución en la funcionalidad de los transportadores situados en la membrana apical, como por ejemplo el $\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$ y el $\text{CO}_3\text{H}^-/\text{Cl}^-$, o del transportador Na^+/H^+ situado en la membrana basolateral. Asimismo, la actividad de ciertas enzimas asociadas al transporte de electrolitos, como la ATPasa Na^+/K^+ también puede verse afectada (Almansa y col., 2003).

Otra teoría se basaría en que el incremento en la permeabilidad tisular pudiera ser causado por el daño producido en el tejido debido a una acumulación lipídica. Estudios realizados en dorada (Caballero y col., 2003) y en otros teleósteos (Olsen y col., 1999, 2000; Caballero y col., 2002) han mostrado acumulación de vesículas lipídicas en los enterocitos y de VLDL en los espacios intercelulares del epitelio intestinal de los peces alimentados con dietas vegetales. Esta acumulación de grasa puede causar rotura celular o distender el epitelio, comprometiendo su integridad funcional (Deplano y col., 1989, 1991; Olsen y col., 1999; Caballero y col., 2003; Björnsson y col., 2004; Jutfelt, 2006).

Finalmente, los ácidos grasos podrían incrementar la permeabilidad paracelular directamente a través de la regulación de la expresión génica, interaccionando con receptores nucleares proliferadores de peroxisomas (PPARs), que intervienen en el transporte, biosíntesis, deposición y almacenaje, así como en la oxidación y metabolismo de los ácidos grasos (Smith, 2002), o indirectamente, a través de eicosanoides, sustancias biológicamente activas capaces de regular la producción de AMPc.

Sustancias como la teofilina o la forskolina son particularmente útiles para el estudio del transporte de electrolitos a través del epitelio intestinal de vertebrados (Reymann y col., 1985; Donowitz y Welsh, 1986; Lorenzo y col., 1987a), incluyendo peces (Porthé-Nibelle y Lahlou, 1978; Field y col., 1978, 1980; Rao y col., 1984; Kiliaan y col., 1996; Trischitta y col., 1996). Ambos productos incrementan los niveles

de AMPc intracelular, la teofilina, inhibiendo la fosfodiesterasa, que degrada el AMPc a 5'-AMPc, y la forskolina, activando la adenilatociclase, enzima localizada en la membrana celular, que se encarga de su producción a partir de ATP. El AMPc actúa sobre el transporte transepitelial de iones en el intestino, generando un efecto antiabsortivo sobre el NaCl (Field y col., 1980; Smith, 1983), bien debido a la reducción de la actividad de los transportadores localizados en la membrana apical del enterocito, bien por un aumento de la conductancia tisular al Cl⁻.

En nuestro estudio, la adición de teofilina o forskolina al medio de incubación, mostró efectos similares sobre los parámetros eléctricos y flujos unidireccionales de cloruro y sodio a través del epitelio gastrointestinal de los juveniles de dorada, por lo que los resultados obtenidos se discutirán de manera unificada para ambas sustancias.

En el intestino anterior de peces que fueron alimentados con la DC, la anulación de la absorción neta observada tras adicionar una de las sustancias, parece deberse a una actuación tanto a nivel de transportadores de membrana, dando lugar a una reducción significativa del flujo hacia el lado serosal del tejido, como sobre la permeabilidad paracelular, incrementando el flujo de serosa a mucosa, aunque ésta última modificación no se vio reflejada en un incremento de la Gt, posiblemente debido a la disminución simultánea del flujo transcelular en sentido mucosa a serosa. Sin embargo, en el intestino posterior de estos mismos peces, el mecanismo de actuación parece centrarse mayoritariamente sobre las uniones paracelulares, incrementando la conductancia total del epitelio, lo que conlleva un incremento significativo de los flujos iónicos en ambas direcciones y la anulación de la absorción neta. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores en el pez plano, *Pseudopleuronectes americanus*, (Field y col., 1980; Rao y col., 1984), y a diferencia de lo que ocurre en el intestino de mamíferos, no se produce secreción neta de Cl⁻ debido, probablemente, a la ausencia de células cripta en el epitelio de peces (Field y col., 1980).

Cuando los ejemplares fueron alimentados con la dieta que carecía de AP, los efectos causados por la adición de las sustancias variaron con respecto a los observados en los que ingirieron la DC. Así, en el segmento anterior se produjo un

incremento de la G_t que refleja un aumento en la permeabilidad iónica del tejido, lo que se vio reflejado en flujos unidireccionales más altos en ambas direcciones, aunque el flujo neto nulo existente antes de la adición no resultara modificado. La ausencia de efecto sobre los transportadores de membrana en los peces que recibieron este tratamiento dietario, sugiere la posible afección previa de los mismos por la ingestión prolongada de una dieta deficiente en AGE, lo que parece confirmarse en la ausencia de absorción neta del ión cloruro cuando el tejido era incubado en condiciones estándar. La alta conductancia tisular y los elevados flujos unidireccionales generados en la sección posterior del intestino por la deficiencia dietaria de HUFA, dejó sin efecto evidente la adición de teofilina o forskolina al medio de incubación.

Señales extracelulares como hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento, controlan sus efectos fisiológicos en las células mediante la unión a receptores específicos de membrana que activan una cascada de señales en el interior celular. Las respuestas a estas señales extracelulares son mediadas a través de segundos mensajeros, capaces de transmitir intracelularmente los efectos biológicos de compuestos que no pueden entrar en la célula. El AMPc es uno de los segundos mensajeros más utilizados en el estudio de los sistemas de transmisión transmembranal. Las medidas del AMPc intracelular en los tejidos pueden ayudar a comprender la fisiología de múltiples estados patológicos.

El incremento de la producción de AMPc intracelular registrado tras la incubación con teofilina o forskolina, sugiere que la mayor permeabilidad paracelular y la anulación del flujo neto de cloruro debido al incremento del flujo en sentido serosa-mucosa, observado en ambos segmentos intestinales de peces alimentados con la DC, fue mediado por este segundo mensajero (Field y col., 1980; Smith, 1983). Similarmente, también parece ser mediado por el AMPc, el aumento de la conductancia paracelular en el intestino anterior de los juveniles que tomaron la DD tras la adición de las sustancias. Sin embargo, en el intestino posterior de estos mismos peces, los compuestos no elevaron la conductancia tisular, probablemente debido a la alta permeabilidad ya existente en el tejido. Teniendo en cuenta que en este segmento intestinal, la adición de teofilina y forskolina dio lugar a un incremento en la producción del AMPc intracelular del mismo orden que en el resto de ensayos,

podemos sugerir que la acción de la teofilina o de la forskolina no es sinérgica con el efecto previo producido por los ácidos grasos de la dieta.

El intestino de peces carnívoros como la dorada presenta limitada capacidad para digerir carbohidratos de elevado peso molecular. En teleósteos, de manera similar a lo descrito para mamíferos hace décadas (Schultz y Zalusky, 1964b; Crane, 1965, 1967), la absorción intestinal de azúcares es mediada por un cotransportador dependiente de sodio, situado en la membrana apical del enterocito. Este proceso de simporte, utiliza el gradiente electroquímico transepitelial para el sodio, generado por la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ de la membrana basolateral, para energizar la transferencia de la hexosa en contra de un gradiente considerable de concentración. El paso desde el interior celular hacia el torrente sanguíneo tiene lugar por difusión facilitada a través de la membrana basolateral.

Diversos autores han demostrado la existencia de un gradiente absortivo decreciente a lo largo del eje antero-posterior del intestino de peces para diversos nutrientes, como por ejemplo lípidos (Lie y col., 1987; Denstadli y col., 2004; Jutfelt y col., 2007), aminoácidos (Bakke-McKellep y col., 2000; Jutfelt y col., 2007) y carbohidratos (Ahearn y col., 1992; Bakke-McKellep y col., 2000; Sala-Rabanal y col., 2004). La escasa bibliografía disponible aporta resultados contradictorios sobre la diferenciación por segmentos de las tasas de absorción intestinal de glucosa en la dorada (Lorenzo y col., 1987b; Sala-Rabanal y col., 2004).

Nuestros resultados indican que la fracción distal del tracto intestinal de la dorada mostró una tasa de absorción neta de glucosa, mientras que en la fracción proximal fue nula. Esta diferenciación zonal coincide con la observada por Lorenzo y col. (1987b), aunque difiere de la postulada por Sala-Rabanal y col. (2004). Las diferencias encontradas podrían ser debidas a las distintas técnicas experimentales utilizadas, ya que estos autores trabajan con vesículas de membrana en borde de cepillo, en lugar de con el tejido intacto como es nuestro caso. El uso de vesículas de membrana permite eliminar la capa de mucopolisacárido adherida al lado mucosal del epitelio ('unstirred layer') y próxima a la membrana transportadora, dando lugar a diferencias con otros métodos de trabajo como sacos intestinales o segmentos de tejido montados en cámaras de determinación de flujos (Ferraris y Ahearn, 1984). Por

otro lado, el criterio de elección de los segmentos ha sido diferente en ambos trabajos, ya que en nuestro estudio, el segmento anterior de intestino se seleccionó justo a partir de los ciegos pilóricos. Pudiera ser que *in vivo*, la digestión de los carbohidratos no se hubiera completado aún en esta primera sección del intestino proximal, por lo que la disponibilidad de glucosa sería baja, no siendo necesaria una relevante absorción activa del azúcar.

Como cabía esperar, la floricina no mostró efecto alguno sobre la sección proximal del intestino, donde no se había detectado transporte neto de glucosa. Sin embargo, redujo la absorción neta de glucosa observada en el segmento posterior del intestino de los peces que fueron alimentados con la DC, al disminuir significativamente el flujo en dirección mucosa-serosa, no afectando al movimiento en sentido contrario. Se puede concluir por tanto, que la absorción neta de glucosa en la sección distal del intestino de juveniles de dorada es activa, y tiene lugar a través del transportador dependiente de Na^+ localizado en la membrana apical del enterocito.

En el intestino posterior de los peces que fueron alimentados con la DD no se observó absorción neta del azúcar, ni acción alguna de la floricina sobre el movimiento unidireccional hacia el lado serosal del tejido, lo que demuestra la afección de la deficiencia dietaria de AGE sobre la absorción de glucosa en el tracto intestinal de teleósteos marinos.

En resumen, los resultados obtenidos del análisis de la composición lipídica y de los ensayos sobre características eléctricas y de transporte de diversos electrolitos y nutrientes en el intestino de juveniles de dorada, indican que la alimentación de los ejemplares durante 4 meses con una dieta formulada sin AP (DD) parece comprometer seriamente la integridad funcional del epitelio intestinal.

No resulta extraño pensar que el conjunto de alteraciones atribuidas a la deficiencia dietaria de AGE que han sido descritas a lo largo de la presente memoria, pudieran generar a su vez, modificaciones en la composición bioquímica del medio interno de los peces. La evaluación de los parámetros plasmáticos es una herramienta comunmente utilizada para monitorizar la condición fisiológica y el estado de salud de los animales. En peces, la bioquímica sanguínea puede verse afectada

no sólo por la metodología empleada en la obtención y procesado de las muestras, sino también por otros diversos factores, entre los que cabe destacar los ambientales (temperatura, fotoperiodo, salinidad, densidad de cultivo), fisiológicos (edad de los ejemplares, estado reproductivo, nutrición), sociales (jerarquía social) o, incluso, la estacionalidad de los muestreos (Hrubec y col., 2001; Chen y col., 2003; De Pedro y col., 2005; Polakof y col., 2007; Coz-Rakovac y col., 2008). No obstante lo anterior, los resultados obtenidos en nuestro estudio para ambos grupos experimentales son similares a los citados previamente para dorada en concentración plasmática de proteína total (Montero y col., 1998; Laiz-Carrión y col., 2002, 2005; Coz-Rakovac y col., 2008, 2009; Díaz López y col., 2009) y electrolitos (Laiz-Carrión y col., 2002; Yildiz, 2009), y están dentro de los rangos más habituales citados para otras especies (Tocher y col., 2000; Martínez-Álvarez y col., 2002; Chen y col., 2003; Coz-Rakovac y col., 2005, 2008; Lee y Cho, 2009; Yildiz, 2009).

Por el contrario, tanto el colesterol como los triglicéridos plasmáticos mostraron niveles significativamente más altos en los juveniles a los que se suministró la DC, ajustándose mejor los valores obtenidos en los peces que fueron alimentados con la dieta que contenía AVs (DD) a los referidos en la bibliografía para esta especie (Laiz-Carrión y col., 2002, 2005; Coz-Rakovac y col., 2008, 2009; Díaz-López y col., 2009). La elevada concentración de 16:0 en la DC debida a la inclusión de AOA y AP, podría haber potenciado la exportación de lípido desde el hepatocito, promoviendo por tanto la síntesis y el transporte sanguíneo de TG hacia los tejidos (Stubhaug y col., 2005b). De igual forma, la mayor proporción de colesterol en la DC, aunque sin llegar a ser significativa, así como la presencia de ésteres de colesterol en el AP incluido su formulación, podrían haber contribuido a incrementar el nivel plasmático de colesterol en los peces de este grupo experimental.

El efecto reductor que la ingestión de dietas formuladas con AVs tiene sobre el nivel de lípidos plasmáticos en peces ha sido señalado anteriormente en diversas especies tanto para el colesterol (Parpoura y Alexis, 2001; Richard y col., 2006a,b; Peng y col., 2008; Babalola y col., 2009; Ferreira y col., 2011), como para los TG (Torstenesen y col., 2000; Menoyo y col., 2006). Sin embargo, sustituciones moderadas del AP o la utilización de AVs con perfil de ácidos grasos equilibrados, mantienen los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos estables con respecto a

los valores obtenidos en dietas formuladas exclusivamente con AP (Lee y col., 2003; Figueiredo-Silva y col., 2005; Díaz-López y col., 2009). La reducción de los contenidos grasos plasmáticos ante la supresión del aporte dietario de AP observada en nuestro estudio podría ser debida a la deficiencia de HUFA generada por la alimentación con la DD. Por un lado, el hígado, principal órgano encargado de la lipogénesis y oxidación de los lípidos, parece haber sido afectado por la inclusión en la dieta de niveles insuficientes de AGE, por lo que los procesos metabólicos involucrados en la producción de lipoproteínas encargadas de movilizar vía sanguínea los lípidos desde el hígado, se ven dificultados (Fukuzawa y col., 1970, 1971; Castell y col., 1972a,b). Igualmente, la afección ocasionada por la deficiencia dietaria de AGE en el tracto intestinal de los peces DD, especialmente en el tramo distal, puede haber dado lugar a una menor tasa de absorción lipídica o a una dificultad en su movilización desde los enterocitos (Stubhaug y col., 2005b).

Debemos destacar también la disminución de los niveles de cloruro en los peces que ingirieron la DD con respecto al grupo control. El incremento en la permeabilidad tisular encontrada en el segmento posterior del intestino de estos peces, pudiera haber habilitado al cloruro a retornar al lumen intestinal en mayor proporción de lo habitual, reduciendo su entrada neta al medio interno.

En definitiva, nuestros resultados indican que la deficiencia dietaria de HUFA afectó a diversos parámetros plasmáticos relacionados con el metabolismo general de la dorada, sugiriendo que el estado de salud del pez probablemente no sea óptimo.

Finalmente, dentro del contexto de la búsqueda de fuentes lipídicas alternativas al AP en dietas para acuicultura, es importante tener en cuenta que, independientemente del origen del lípido, la aparición de deficiencias de AGE es improbable, si se mantiene en la formulación una cantidad mínima de harina de pescado. La harina de pescado contiene entre un 8 y un 15% de grasa residual, que habitualmente presenta entre un 20 y un 35% de (n-3) HUFA (Bimbo, 2000). Por tanto, la inclusión de 300 g/kg de harina de pescado en la formulación dietaria, provee entre un 0,5 y un 1% de (n-3) HUFA, con lo que los requerimientos para éstos AGE de la mayoría de las especies marinas que se cultivan quedarían cubiertos. No obstante, si la fuente lipídica sustitutiva del AP aporta cantidades bajas de AGE a la dieta, a la

vez que se elimina o se reduce de forma sustancial la presencia de harina de pescado, el riesgo de deficiencia en AGE es evidente, y sería necesaria la inclusión en la formulación de alguna fuente extra de HUFA.

6. CONCLUSIONES

1. La DC, de bajo contenido lipídico, formulada con una mezcla de aceite de pescado y aceite de origen animal en proporciones 35 y 65%, respectivamente, y 530 g/kg de harina de pescado como fuente proteica, es bien aceptada por los juveniles de dorada, satisface sus necesidades en ácidos grasos esenciales, y proporciona tasas de crecimiento y supervivencia elevadas, equiparables a dietas de mayor contenido graso y donde el aceite de pescado constituye la única fuente lipídica.

2. Frente a otras dietas experimentales y comerciales, la DC contribuye a mantener niveles saludables de grasa corporal, equilibrada en sus proporciones de clases lipídicas y ácidos grasos, a pesar de haberse sustituido buena parte de los AGE del AP, por ácidos grasos saturados y monoinsaturados.

3. Una ración de 200 g de peso, libre de espinas y piel, de dorada alimentada con la DC, aporta aproximadamente 400 mg de DHA y 200 mg de EPA, cubriendo holgadamente las recomendaciones de ingesta diaria de EPA+DHA de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, de cara a mantener una buena salud cardiovascular.

4. La DC, parece no afectar a la actividad eléctrica ni al transporte de electrolitos y nutrientes a través del intestino ya que los valores obtenidos son similares a aquellos observados en estudios previos donde los peces fueron alimentados con una dieta formulada únicamente con AP.

5. La administración de una dieta deficiente en HUFA afecta de diferente manera a la composición lipídica y de ácidos grasos de los diferentes órganos del pez, siendo el cerebro el órgano que menos alteró su composición, mientras que el intestino y el hígado resultaron los más afectados. Se observa una conservación preferencial del perfil de ácidos grasos de los lípidos polares sobre los neutros en todos los órganos estudiados, lo que sugiere la existencia de mecanismos homeostáticos que intervienen sobre los fosfolípidos de las membranas celulares, destinados a preservar su funcionalidad.

6. La deficiencia dietaria de ácidos grasos esenciales produce la anulación de los flujos netos de cloruro y sodio en ambos segmentos intestinales, afectando de forma

diferente las propiedades eléctricas y de transporte a través del intestino. Mientras que en el tramo anterior parece incidir principalmente sobre los transportadores de membrana de borde en cepillo, en el posterior se afecta en mayor medida la conductancia tisular.

7. La absorción de glucosa ligada al Na^+ evidencia la heterogeneidad próximo-distal del intestino de la dorada, presentando un componente activo en el segmento posterior que no se observa en el segmento anterior. En condiciones de deficiencia dietaria de AGE la absorción neta de glucosa se vio anulada posiblemente por el incremento de la conductancia tisular.

8. La ingestión prolongada de una dieta deficiente en HUFA altera la composición bioquímica del medio interno de manera concordante con las afecciones observadas en intestino e hígado, principales órganos implicados en la absorción, metabolismo y transporte de los nutrientes, lo que sugiere que el estado general de salud y bienestar de los peces no es el adecuado.

9. El mantenimiento de las propiedades físicas e integridad estructural y funcional de las membranas depende de la compleja interacción de un conjunto de factores, entre los que cabe destacar la relación colesterol/fosfolípido, la proporción relativa de cada fosfolípido y de sus ácidos grasos, en particular 16:0, 18:1(n-9), EPA, DHA y ARA, así como las relaciones que existen entre el conjunto de ácidos grasos (n-3)/(n-6), o insaturados/saturados.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ahearn, G.A., Behnke, R.D., Zonno, V. and Storelli, C. 1992. Kinetic heterogeneity of Na-D-glucose cotransport in teleost gastrointestinal tract. *Am. J. Physiol.* 263: R1018-R1023.
- Almaida-Pagán, P.F., Hernández, M.D., García García, B., Madrid, J.A., De Costa, J. and Mendiola, P. 2007. Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils on n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid desaturation and elongation in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) hepatocytes and enterocytes. *Aquaculture* 272: 589-598.
- Almansa, E., Martín, M.V., Cejas, J.R., Badía, P., Jerez, S. and Lorenzo, A. 2001a. Lipid and fatty acid composition of female gilthead seabream during their reproductive cycle: effects of a diet lacking n-3 HUFA. *J. Fish Biol.* 59: 267-286.
- Almansa, E., Sánchez, J.J., Cozzi, S., Casariego, M., Cejas, J. and Díaz, M. 2001b. Segmental heterogeneity in the biochemical properties of the Na⁺-K⁺-ATPase along the intestine of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *J. Comp. Physiol. B* 171: 557-567.
- Almansa, E., Sánchez, J.J., Cozzi, S., Rodríguez, C. and Díaz, M. 2003. Temperature-activity relationship for the intestinal Na⁺-K⁺-ATPase of *Sparus aurata*. A role for the phospholipid microenvironment?. *J. Comp. Physiol. B* 173: 231-237.
- Anderson, M.P. and Welsh, M.J. 1990. Fatty acids inhibit apical membrane chloride channels in airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7334-7338.
- Ando, M. 1975. Intestinal water transport and chloride pump in relation to sea-water adaptation of the eel, *Anguilla japonica*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 52: 229-233.
- Ando, M. and Subramanyam, M.V.V. 1990. Bicarbonate transport systems in the intestine of the seawater eel. *J. Exp. Biol.* 150: 381-394.
- Ando, M., Utida, S. and Nagahama, H. 1975. Active transport of chloride in eel intestine with special reference to sea water adaptation. *Comp. Biochem. Physiol. A* 51: 27-32.
- A.O.A.C. 1990. Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.). En: *Official Methods of Analysis*. Editor K. Helrich. Arlington (VA). 1400 pp.
- Aoki, M., Kanko, T., Katho, F., Hasegawa, S., Tsutsui, N. and Aida, K. 2003. Intestinal water absorption through aquaporin 1 expressed in the apical membrane of mucosal epithelial cells in seawater-adapted Japanese eel. *J. Exp. Biol.* 206: 3495-3505.
- APROMAR, Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos. 2010. *La Acuicultura Marina de Peces en España*. Apromar (Cádiz). 70 pp.
- Ashton, H.J., Farkvam, D.O. and March, B.E. 1993. The fatty acid composition of lipids in the eggs and alevins from wild and cultured chinook salmon. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 648-655.
- Ashton, I., Clements, K., Barrow, S.E., Secombes, C.J. and Rowley, A.F. 1994. Effects of dietary fatty acids on eicosanoid-generating capacity, fatty acid composition and

- chemotactic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1214: 253-262.
- Asturiano, J.F., Sorbera, L.A., Zanuy, S. and Carrillo, M. 2000. Effects of polyunsaturated fatty acids and gonadotropin on prostaglandins series E production in a primary testis cell culture system for the European sea bass. *J. Fish Biol.* 57: 1563-1574.
- Asturiano, J.F., Sorbera, L.A., Carrillo, M., Zanuy, S., Ramos, J., Navarro, J.C. and Bromage, N. 2001. Reproductive performance in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) fed two PUFA-enriched experimental diets: a comparison with males fed a wet diet. *Aquaculture* 194: 173-190.
- Avramoglu, R.K., Basciano, H. and Adeli, K. 2006. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant status. *Clin. Chim. Acta* 368: 1-19.
- Awad, W.A., Ghareeb, K. and Böhm, J. 2009. Animal feed additive and the effect of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol on the electrophysiological measurement of transepithelial ion transport of young chickens with Ussing chamber technique. *Int. J. Poult. Sci.* 8: 25-27.
- Ayala, S., Castuma, C.E. and Brenner, R.R. 1991. Fatty acid composition and dynamics of phospholipids from hake (*Merluccius hubbsi*) spinal cord and brain and sea bass (*Acanthustius brasiliensis*) brain. *Biochem. Int.* 23: 163-174.
- Ayala, S., Castuma, C.E., Brenner R.R. and Rodolfo, R. 1993. Fatty acid composition and dynamics of phospholipids from fresh water fish *Prochilodus lineatus* brain and spinal cord. *Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.* 43: 28-34.
- Babalola, T.O.O., Adebayo, M.A., Apata, D.F. and Omotosho, J.S. 2009. Effect of dietary alternative lipid sources on hematological parameters and serum constituents of *Heterobranchun longifilis* fingerlings. *Trop. Anim. Health. Prod.* 41: 371-377.
- Badía, P. and Lorenzo, A. 1982. Preliminary studies on transmural potential and intensity of the short-circuit current in intestine of *Gobius maderensis*. *Rev. Esp. Fisiol.* 38: 221-226.
- Bakke-McKellep, A.M., Nordrum, S., Krogdahl, Å and Buddington, R.K. 2000. Absorption of glucose, amino acids, and dipeptides by the intestines of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol. Biochem* 22: 33-44.
- Barriviera, M.L. and Hasson-Voloch, A. 1996. Lipids associated with the (Na⁺-K⁺) ATPase activity of normal and denervated electric organs of *Electrophorus electricus* (L.). *Z. Naturforsch. C.* 51: 883-892.
- Bell, J.G. and Waagbø, R. 2008. Safe and nutritious aquaculture produce: benefits and risks of alternative sustainable aquafeeds. En: *Aquaculture in the Ecosystem*, pp.185-225. Editores M. Holmer, K.D. Black, C.M. Duarte, N. Marba e I. Karakassis. Springer-Verlag (Berlin).

- Bell, J.G., Raynard, R.S. and Sargent, J.R. 1991a. The effect of dietary linoleic acid on the fatty acid composition of individual phospholipids and lipoxygenase products from gills and leucocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Lipids* 26: 445-450.
- Bell, J.G., McVicar, A.H., Park, M. and Sargent, J.R. 1991b. High dietary linoleic acid affects fatty acid compositions of individual phospholipids from tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar*): association with stress susceptibility and cardiac lesion. *J. Nutr.* 121: 1163-1172.
- Bell, J.G., Sargent, J.R. and Raynard, R.S. 1992. Effects of increasing dietary linoleic acid on phospholipid fatty acid composition and eicosanoid production in leucocytes and gill cells of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 45: 197-206.
- Bell, J.G., Dick, J.R., McVicar, A.H., Sargent, J.R. and Thompson, K.D. 1993. Dietary sunflower, linseed and fish oils affect phospholipid fatty acid composition, development of cardiac lesions, phospholipase activity and eicosanoid production in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 49: 665-673.
- Bell, J.G., Tocher, D.R., McDonald, F.M. and Sargent, J.R. 1994. Effects of a diet rich in linoleic (18:2n-6) and linolenic (18:3n-3) acids on the growth, lipid class and fatty acid composition and eicosanoid production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 13: 105-118.
- Bell, J.G., Tocher, D.R., MacDonald, F.M. and Sargent, J.R. 1995a. Effects of dietary borage oil [enriched in γ -linolenic acid, 18:3(n-6)] or marine fish oil [enriched in eicosapentaenoic acid, 20:5(n-3)] on growth, mortalities, liver histopathology and lipid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Physiol. Biochem.* 14: 373-383.
- Bell, J.G., McEvoy, J., Webster, J.L., McGhee, F., Millar, R.M. and Sargent, J.R. 1998. Flesh lipid and carotenoid of scottish farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Agr. Food Chem.* 46: 119-127.
- 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.
- Bell, J.G., Henderson, R.J., Tocher, D.R., McGhee, F., Dick, J.R., Porter, A., 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.
- Bell, J.G., Tocher, D.R., Henderson, R.J., Dick, J.R. and Crampton, V.O. 2003a. Altered fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing linseed and rapeseed oils can be partially restored by a subsequent fish oil finishing diet. *J. Nutr.* 133: 2793-2801.

- Bell, J.G., McGhee, F., Dick, J.R. and Tocher, D.R. 2005. Dioxin and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in Scottish farmed salmon (*Salmo salar*): effects of replacement of dietary marine fish oil with vegetable oils. *Aquaculture* 243: 305-314.
- Bell, J.G., Strachan, F., Good, J.E. and Tocher, D.R. 2006. Effect of dietary echium oil on growth, fatty acid composition and metabolism, gill prostaglandin production and macrophage activity in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquacult. Res.* 37: 606-617.
- Bell, M.V. and Sargent, J.R. 1987. Effects of the fatty acid composition of phosphatidylserine and diacylglycerol on the *in vitro* activity of protein kinase C from rat spleen: influences of (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acids. *Comp. Biochem. Physiol. B* 86: 227-232.
- Bell, M.V., Henderson, R.J. and Sargent, J.R. 1986. The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B* 83: 711-719.
- Bell, M.V., Batty, R.S., Dick, J.R., Fretwell, K., Navarro, J.C. and Sargent, J.R. 1995b. Dietary deficiency of docosahexaenoic acid impairs vision at low light intensities in juvenile herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids* 30: 443-449.
- Bell, M.V., Dick, J.R. and Porter, A.E.A. 2003b. Pyloric ceca are major site of newly synthesized 22:6n-3 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Lipids* 38: 39-44.
- Bendiksen, E.Å. and Jobling, M. 2003. Effects of temperature and feed composition on essential fatty acid (n-3 and n-6) retention in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. *Fish Physiol. Biochem.* 29: 133-140.
- Bendiksen, E.Å., Berg, O.K., Jobling, M., Arnesen, A.M. and Masoval, K. 2003. Digestibility, growth and nutrient utilisation of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.) in relation to temperature, feed fat content and oil source. *Aquaculture* 224: 283-299.
- Benedito-Palos, L. 2010. Sustitución de aceites de pescado en dietas de engorde de dorada (*Sparus aurata*) ricas en proteínas vegetales. Efectos sobre el crecimiento y los perfiles de ácidos grasos. Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia. 208 pp.
- Benedito-Palos, L., Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.A., 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.
- Benedito-Palos, L., Navarro, J.C., Sitjà-Bobadilla, A., Bell, J.G., Kaushik, S. and Pérez-Sánchez, J. 2008. High levels of vegetable oils in plant protein-rich diets fed to gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): growth performance, muscle fatty acid profiles and histological alterations of target tissues. *Br. J. Nutr.* 100: 992-1003.
- Benedito-Palos, L., Navarro, J.C., Bermejo-Nogales, A., Saera-Vila, A., Kaushik, S. and Pérez-Sánchez, J. 2009. The time course of fish oil wash-out follows a simple dilution model in

- gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed graded levels of vegetable oils. *Aquaculture* 288: 98-105.
- Benedito-Palos, L., Navarro, J.C., Kaushik, S. and Pérez-Sánchez, J. 2010. Tissue-specific robustness of fatty acid signatures in cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed practical diets with a combined high replacement of fish meal and oil. *J. Animal Sci.* 88: 1759-1770.
- Berntssen, M.H.G., Lundebye, A.K. and Torstensen, B.E. 2005. Reducing the levels of dioxins and dioxin-like PCBs in farmed Atlantic salmon by substitution of fish oil with vegetable oil in the feed. *Aquacult. Nutr.* 11: 219-231.
- Berquin, I.M., Edwards, I.J. and Chen, Y.Q. 2008. Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. *Cancer Lett.* 269: 363-377.
- Bhat, S.V. 1977. Structures and stereochemistry of new labdane diterpenoids *Coleus forskohlii* Briq. *Tetrahedron Lett.* 19: 1669-1672.
- Bimbo, A. 2000. Fish meal and oil. En: *Marine and Freshwater Products Handbook*, pp. 541-581. Editores R. Martin, E. Carter, G. Flickand y L. Davis. Technomic Publishing, Lancaster (UK).
- Binder, H. 1981. Colonic secretion. En: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, pp. 1003-1019. Editor L.R. Johnson. Raven Press (New York).
- Björnsson, B.T., Sundell, K., Jönsson, E., Jutfelt, F., Geurden, I., Ruohonen, K., Forsman, A., Olsen, R.E. and Ringø, R.E. 2004. Gut integrity – Gastrointestinal Functions and Food Intake Regulation in Salmonids: Impact of Dietary Vegetable Lipids. Göteborgs University, Goteborg (Sweden).
- Boggio, S.M., Hardy, R.W., Babbit, J.K. and Brannon, E.L. 1985. The influence of dietary lipid source and alpha-tocopheryl acetate level on product quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 51: 13-24.
- Bolaños, A. and Lorenzo, A. 1984. Transmural potential differences and short-circuit current intensity in the posterior intestine of *Blennius parvicornis*. *Rev. Esp. Fisiol.* 40: 117-122.
- Bouef, G. and Payan, P. 2001. How should salinity influence fish growth?. *Comp. Biochem. Physiol. C* 130: 411-423.
- Bougnoux, P., Hajjaji, N., Maheo, K., Couet, Ch. and Chevalier, S. 2010. Fatty acids and breast cancer: Sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth. *Prog. Lipid Res.* 49: 76-86.
- Bouraoui, L., Sánchez-Gurmaches, J., Cruz-García, L., Gutiérrez, J., Benedito-Palos, L., Pérez-Sánchez, J. and Navarro, I. 2011. Effect of dietary fish meal and fish oil replacement on lipogenic and lipoprotein lipase activities and plasma insulin in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquacult. Nutr.* 17: 54-63.

- Brandsen, M.P., Carter, C.G. and Nichols, P.D. 2003. Replacement of fish oil with sunflower oil in feeds for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): effect on growth performance, tissue fatty acid composition and disease resistance. *Comp. Biochem. Physiol. B* 135: 611-625.
- Brasitus, T.A. and Schachter, D. 1982. Cholesterol biosynthesis and modulation of membrane cholesterol and lipid dynamics in rat intestinal microvillus membranes. *Biochemistry* 21: 2241-2246.
- Brasitus, T.A., Davidson, N.O. and Schachter, D. 1985. Variations in dietary triacylglycerol saturation alter the lipid composition and fluidity of rat intestinal plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 812: 460-472.
- Brett, J.R. 1979. Environmental factors and growth. En: *Fish Physiology, vol. III*, pp. 599-675. Editores W.S. Hoar, D.J. Randall y J.R. Brett. Academic Press (New York).
- Breves, G., Kock, J. and Schröder, B. 2007. Transport of nutrients and electrolytes across the intestinal wall in pigs. *Livestock Sci.* 109: 4-13.
- Bridges, R.J. and Rummel, W. 1986. Mechanistic basis of alterations in mucosal water and electrolyte transport. *Clin. Gastroenterol.* 15: 491-506.
- Bridges, R.J., Rummel, W. and Simon, B. 1983. Forskolin induced chloride secretion across the isolated mucosa of rat colon descendens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 323: 355-360.
- Brites, P., Waterham, H.R. and Wanders, R.J. 2004. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1636(2-3): 219-231.
- Brodtkorb, T., Rosenlund, G. and Lie, Ø. 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.
- Browning, J.D. and Horton, J.D. 2004. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* 114: 147-152.
- Bureau, D. and Gibson, J. 2004. Animal fats as aquaculture feed ingredients: nutritive value, product quality and safety. *Aquafeed Int.* 7: 32-37.
- Buzzi, M., Henderson, R.J. and Sargent, J.R. 1996. The desaturation and elongation of linolenic acid and eicosapentaenoic acid by hepatocytes and liver microsomes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing fish oil or olive oil. *Biochim. Biophys. Acta* 1299: 235-244.
- 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.

- Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., Kjørsvik, 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.
- 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.
- Cahu, C.L., Infante, J.L.Z., Corraze, G. and Coves, D. 2000. Dietary lipid level affects fatty acid composition and hydrolase activities of intestinal brush border membrane in seabass. *Fish Physiol. Biochem.* 23: 165-172.
- Calder, P.C. 2008. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 79: 101-108.
- Calder, P.C., Yaqoob, P., Harvey, D.J., Watts, A. and Newsholme, E.A. 1994. Incorporation of fatty acids by concanavalin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity. *Biochem. J.* 300: 509-518.
- Carlson, D., Poulsen, H.D. and Sehested, J. 2004. Influence of weaning and effect of post weaning dietary zinc and copper on electrophysiological response to glucose, teophylline and 5-HT in piglet small intestinal mucosa. *Comp. Biochem. Physiol. A* 137: 757-765.
- Castell, J.D., Sinnhuber, R.O., Wales, J.H. and Lee, D.J. 1972a. Essential fatty acids in the diet of rainbow trout (*Salmo gairdneri*): growth, feed conversion and some gross deficiency symptoms. *J. Nutr.* 102: 77-86.
- Castell, J.D., Sinnhuber, R.O., Lee, D.J. and Wales, J.H. 1972b. Essential fatty acids in the diet of rainbow trout (*Salmo gairdneri*): physiological symptoms of EFA deficiency. *J. Nutr.* 102: 87-92.
- Cequier-Sánchez, E., Rodríguez, C., Ravelo, A.G. and Zárata, R. 2008. Dichloromethane as a solvent for lipid extraction and assessment of lipid classes and fatty acids from samples of different natures. *J. Agric. Food Chem.* 56: 4297-4303.
- Charney, A.N., Giannella, R.A. and Egnor, R.W. 1999. Effect of short-chain fatty acids on cyclic 3',5'-guanosine monophosphate-mediated colonic secretion. *Comp. Biochem. Physiol. A* 124: 169-178.
- Chen, C.-Y., Wooster, G.A., Getchell, R.G., Bowser, P.R. and Timmons, M.B. 2003. Blood chemistry of healthy, nephrocalcinosis-affected and ozoned-treated tilapia in a recirculation system, with application of discriminant analysis. *Aquaculture* 218: 89-102.
- Christie, W.W. 1982. Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids. En: *Lipid Analysis (2nd Edition)*. Pergamon Press, Oxford (UK). 207 pp.

- Clark, J.A. and Levitt, J. 1956. The basis of drought resistance in the soybean plant. *Physiol. Plant.* 9: 598-606.
- Clarke, L.L. 2009. A guide to Ussing chambers studies of mouse intestine. *Am. J. Physiol.* 296: G1151-G1166.
- Collie, N.L. 1985. Intestinal nutrient transport in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and the effects of development, starvation, and seawater adaptation. *J. Comp. Physiol B* 156: 163-174.
- Connor, W.E., Neuringer, M. and Lin, D.S. 1990. Dietary effects on brain fatty acid composition: the reversibility of n-3 fatty acid deficiency and turnover of docosahexaenoic acid in the brain, erythrocytes and plasma of rhesus monkeys. *J. Lipid Res.* 31: 237-247.
- Connor, W.E., Neuringer, M. and Reisbick, S. 1992. Essential fatty acids: the importance of n-3 fatty acids in the retina and brain. *Nutr. Rev.* 50: 21-29.
- Corsolini, S., Ademollo, N., Romeo, T., Greco, S. and Focardi, S. 2005. Persistent organic pollutants in edible fish: a human and environmental health problem. *Microchem. J.* 79: 115-123.
- Coz-Rakovac, R., Strunjak-Perovic, I., Hacmanjek, M., Popovic, N.T., Lipej, Z. and Sostaric, B. 2005. Blood chemistry and histological properties of wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the North Adriatic Sea. *Vet. Res. Commun.* 29: 677-687.
- Coz-Rakovac, R., Smuc, T., Popovic, N.T., Strunjak-Perovic, I., Hacmanjek, M. and Jadan, M. 2008. Novel methods for assesing fish blood biochemical data. *J. Appl. Ichthyol.* 24: 77-80.
- Coz-Rakovac, R., Popovic, N.T., Smuc, T., Strunjak-Perovic, I. and Jadan, M. 2009. Classification accuracy of algorithms for blood chemistry data for three aquaculture-affected marine fish species. *Fish Physiol. Biochem.* 35: 641-647.
- Cozzi, S. 1993. Características cinéticas del transporte de aminoácidos a lo largo del intestino de *Sparus aurata*. Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna. 156 pp.
- Crane, R.K. 1965. Na⁺-dependent transport in the intestine and other animal tissues. *Fed. Proc.* 24: 1000-1005.
- Crane, R.K. 1967. The gradient hypothesis and other models of carrier-mediated active transport. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 78: 99-159.
- Crawford, M.A. 1993. The role of essential fatty acids in neural development: implications for perinatal nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 57: 703S-710S.
- Crockett, E.L. 1998. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. *Am. Zool.* 38: 291-304.

- Crockett, E.L. and Hazel, J.R. 1995. Cholesterol levels explain inverse compensation of membrane order in brush border but not homeoviscous adaptation in basolateral membranes from the intestinal epithelia of rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 198: 1105-1113.
- Cutler, C.P., Brezillon, S., Bekir, S., Sanders, I.L., Hazon, N. and Cramb, G. 2000. Expression of a duplicate Na,K-ATPase beta(1)-isoform in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Am. J. Physiol.* 279: R222-R229.
- Dawczynski, Ch., Martin, L., Wagner, A. and Jahreis, G. 2010. n-3 LC-PUFA-enriched dairy products are able to reduce cardiovascular risk factors: A double-blind, cross-over study. *Clin. Nutr.* 29: 592-599.
- De Giorgi, A., Carnimeo, L. and Corcelli, A. 1992. Mechanism of Cl⁻ transport in eel intestinal brush-border membrane vesicles. *Pflügers Arch.* 420: 551-558.
- De Pedro, N., Guijarro, A.I., López-Patiño, M.A., Martínez-Álvarez, R. and Delgado, M.J. 2005. Daily and seasonal variations in haematological and blood biochemical parameters in the tench, *Tinca tinca* Linnaeus, 1758. *Aquacult. Res.* 36: 1185-1196.
- Deng, D., Jiang, N., Hao, S.-J., Sun, H. and Zhang, G.-J. 2009. Loss of membrane cholesterol influences lysosomal permeability to potassium ions and protons. *Biochim. Biophys. Acta* 1788: 470-476.
- Denstadli, V., Vegusdal, A., Krogdahl, Å., Bakke-McKellep, A.M., Berge, G.M., Holm, H., Hillestad, M. and Ruyter, B. 2004. Lipid absorption in different segments of the gastrointestinal tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 240: 385-398.
- Deplano, M., Connes, R., Diaz, J.P. and Paris, J. 1989. Intestinal steatosis in the farm-reared sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Dis. Aquat. Org.* 6: 121-130.
- Deplano, M., Connes, R. and Diaz, J.P. 1991. Postvalvular enterocytes in feral and farm-reared sea bass *Dicentrarchus labrax*; hypervacuolization related to artificial feed. *Dis. Aquat. Org.* 11: 9-18.
- Detorrego, M.P. and Brenner, R.R. 1976. Influence of environmental-temperature on fatty-acid desaturation and elongation activity of fish (*Pimelodus-maculatus*) liver-microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* 424: 36-44.
- Di Constanzo, G., Duportail, G., Florentz, A. and Leray, C. 1983. The brush border membrane of trout *Salmo gairdneri* intestine: influence of its lipid composition on ion permeability, enzyme activity and membrane fluidity. *Mol. Physiol.* 4: 279-290.
- Díaz, M.L. 2010. Membrane physiology and biophysics in the next decade: an open balcony to multiple scenarios. *Front. Physiol.* 1: 1-2.
- Díaz, M. and Cozzi, S. 1991. Fluxplus, a microcomputer program for interactive calculation of "in vitro" solute fluxes, uptakes and accumulations in studies of intestinal transport. *Comp. Meth. Prog. Biomed.* 34: 263-271.

- Díaz, M. and Lorenzo, A. 1992. Aldosterone regulation of active sodium chloride transport in the lizard colon (*Gallotia galloti*). J. Comp. Physiol. B 162: 189-196.
- Díaz, M., Lorenzo, A., Gómez, T., Badía, P. and Bolaños, A. 1994. Effects of barium chloride on electrolyte transport across isolated colons from normal and aldosterone-treated lizards (*Gallotia galloti*). J. Exp. Biol. 186: 9-22.
- Díaz-López, M., Pérez, M.J., Acosta, N.G., Tocher, D.R., Jerez, S., Lorenzo, A. and Rodríguez, C. 2009. Effect of dietary substitution of fish oil by *Echium* oil on growth, plasma parameters and body lipid composition in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Aquacult. Nutr. 15: 500-512.
- Díaz-López, M., Pérez, M.J., Acosta, N.G., Jerez, S., Dorta-Guerra, R., Tocher, D.R., Lorenzo, A. and Rodríguez, C. 2010. Effects of dietary fish oil substitution by *Echium* oil on enterocyte and hepatocyte lipid metabolism of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Comp. Biochem. Physiol. B 155: 371-379.
- Din, J.N., Newby, D.E. and Flapan, A.D. 2004. Science, medicine, and the future – Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease – fishing for a natural treatment. B.M.J. 328: 30-35.
- Donowitz, M. and Welsh, M.J. 1986. Ca²⁺ and cyclic AMP in regulation of intestinal Na, K, and Cl transport. Ann. Rev. Physiol. 48: 135-150.
- Dópido, R. 2006. Caracterización morfológica, bioquímica y fisiológica de enterocitos aislados a lo largo del tracto intestinal de la dorada (*Sparus aurata*). Efectos de la deficiencia en n-3 y n-6 PUFA. Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna. 188 pp.
- Dópido R., Rodríguez, C., Gómez, T., Acosta, N.G. and Díaz, M. 2004. Isolation and characterization of enterocytes along the intestinal tract of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Comp. Biochem. Physiol. A 139: 21-31.
- Dórea, J.G. 2008. Persistent, bioaccumulative and toxic substances in fish: Human health considerations. Sci. Total Environ. 400: 93-114.
- Dosanjh, B.S., Higgs, D.A., McKenzie, D.J., Randall, D.J., Eales, J.G., Rowshandeli, N., Rowshandeli, M. and Deacon, G. 1998. Influence of dietary blends of menhaden oil and canola oil on growth, muscle lipid composition, and thyroidal status of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in sea water. Fish Physiol. Biochem. 19: 123-134.
- Drai, P., Albertini-Berhaut, J., Lafaurie, M., Sudaka, P. and Giudicelli, J. 1990. Simultaneous preparation of basolateral and brush-border membrane vesicles from sea bass intestinal epithelium. Biochim. Biophys. Acta 1022: 251-259.
- El Babili, M., Brichon G. and Zwingelstein, G. 1996. Sphingomyelin metabolism is linked to salt transport in the gills of euryhaline fish. Lipids 31: 385-392.

- Erdal, J.I., Evensen, O., Kaurstad, O.K., Lillehaug, A., Solbakken, R. and Throud, 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.
- Evans, D.H. 1980. Osmotic and ionic regulation by freshwater and marine fishes: a status report. En: *Environmental Physiology of Fishes*, pp. 93-122. Editor M.A. Ali. Plenum Press (New York).
- Eveloff, J., Field, M., Kinne, R. and Murer, H. 1980. Sodium-cotransport systems in intestine and kidney of the winter flounder. *J. Comp. Physiol.* 135: 175-182.
- FAO, Food and Agricultural Organisation. 2008. Anuarios de Estadísticas de Pesca. Cuadros resumidos. Apéndice I, Pescado y Productos de la Pesca-Consumo aparente, pp. 215-219. FAO, Roma (Italia).
- Farooqui, A.A., Farooqui, T. and Horrocks, L.A. 2008. *Metabolism and Functions of Bioactive Ether Lipids in the Brain*. Springer (New York). 260 pp.
- Fauconneau, B., Andre, S., Chmaitilly, J., Le Bail, P.-Y., Krieg, F. and Kaushik, S.J. 1997. Control of skeletal muscle fibres and adipose cells size in the flesh of rainbow trout. *J. Fish Biol.* 50: 296-314.
- Fernández Borrás, J. 1993. Los lípidos en la nutrición de los peces. En: *Acuicultura Marina: Fundamentos Biológicos y Tecnología de la Producción*, pp. 245-252. Universidad de Barcelona. Publicacions Universitat de Barcelona.
- Ferraris, R.P. and Ahearn, G.A. 1984. Sugar and aminoacid transport in fish intestine. *Comp. Biochem. Physiol. A* 77: 397-413.
- Ferreira, M.W., De Araujo, F.G., Costa, D.V., Rosa, P.V., Figueiredo, H.C.P. and Murgas, L.D.S. 2011. Influence of dietary oil sources on muscle composition and plasma lipoproteins concentrations in Nile Tilapia, *Oreochromis Niloticus*. *J. World Aquac. Soc.* 42: 24-33.
- Field, M. 1981. Secretion of electrolytes and water by mammalian small intestine. En: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, pp. 963-982. Editor L.R. Johnson. Raven Press (New York).
- Field, M., Karnaky, K.J., Smith, P.L., Bolton, J.E. and Kinter, W.B. 1978. Ion transport across the isolated intestinal mucosa of the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*: I. Functional and structural properties of cellular and paracellular pathways for Na and Cl. *J. Membr. Biol.* 41: 265-293.
- Field, M., Smith, P.L. and Bolton, J.E. 1980. Ion transport across the isolated intestinal mucosa of the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*: II. Effects of cyclic AMP. *J. Membr. Biol.* 55: 157-163.

- Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Fonseca-Madrugal, J., Bell, J.G. and Tocher, D.R. 2006. Nutritional and environmental regulation of the synthesis of highly unsaturated fatty acids and of fatty-acid oxidation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) enterocytes and hepatocytes. *Fish Physiol. Biochem.* 32: 317-328.
- Forte, L.R., Thorne, P.K., Eber, S.L., Krause, W.J., Freeman, R.H., Francis, S.H. and Corbin, J.D. 1992. Stimulation of intestinal Cl⁻ transport by heat-stable enterotoxin: activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am. J. Physiol.* 263: C607-C615.
- Fountoulaki, E., Vasilaki, A., Hurtado, R., Grigorakis, K., Karacostas, I., Nengas, I., Rigos, G., Kotzamanis, Y., Venou, B. and Alexis, M.N. 2009. 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.
- Francis, D.S., Turchini, G.M., Jones, P.L. and De Silva, S.S. 2007. Effects of fish oil substitution with a mix blend vegetable oil on nutrient digestibility in Murray cod, *Maccullochella peelii peelii*. *Aquaculture* 269: 447-455.
- Friedlander, G. and Amiel, C. 1989. Protein kinase C activation has dissimilar effects on sodium-coupled uptakes in renal proximal tubular cells in primary culture. *J. Biol. Chem.* 264: 3935-3941.
- Friedlander, G., Shahedi, M., Le Grimellec, C. and Amiel, C. 1988. Increase in membrane fluidity and opening of tight junction have similar effects on sodium-coupled uptakes in renal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 263: 11183-11188.
- Frizzell, R.A., Smith, P.L., Vosburgh, E. and Field, M. 1979. Coupled sodium-chloride influx across brush border of flounder intestine. *J. Membr. Biol.* 46: 27-39.
- Frömter, E. and Diamond, J.M. 1972. Route of passive ion permeation in epithelia. *Nature* 235: 9-13.
- Fuentes, J., Soengas, J.L., Rey, P. and Rebolledo, E. 1997. Progressive transfer to seawater enhances intestinal and branchial Na⁺-K⁺ ATPase activity in non-anadromous rainbow trout. *Aquacult. Int.* 5: 217-227.
- Fukuzawa, T., Privett, O.S. and Takahashi, Y. 1970. Effect of essential fatty acid deficiency on release of triglycerides by the perfused rat liver. *J. Lipid Res.* 11: 522-527.
- Fukuzawa, T., Privett, O.S. and Takahashi, Y. 1971. Effect of essential fatty acid deficiency on lipid transport from liver. *Lipids* 6: 388-393.

- García-Amado, M.A., Del Castillo, J.R., Pérez, M.E. and Domínguez-Bello, M.G. 2005. Intestinal D-glucose and L-alanine transport in Japanese quail (*Coturnix coturnix*). *Poult. Sci.* 84: 947-950.
- Gazitúa, S. and Robinson, J.W.L. 1982. Ion fluxes and electrical characteristics of the short-circuited rat colon in vitro. *Pflügers Arch.* 394: 32-37
- Gerbino, A., Debellis, L., Caroppo, R., Curci, S. and Colella, M. 2010. Cadmium inhibits acid secretion in stimulated frog gastric mucosa. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245: 264-271.
- Geurden, I., Cuvier, A., Gondouin, E., Olsen, R.E., Ruohonen, K., Kaushik, S. and Boujard, T. 2005. Rainbow trout can discriminate between feeds with different oil sources. *Physiol. Behav.* 85: 107-114.
- Geurden, I., Corraze, G. and Boujard, T. 2007. Self-feeding behavior of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, offered diets with distinct feed oils. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 108: 313-326.
- Geurden, I., Jutfelt, F., Olsen, R.E. 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. A* 152: 552-559.
- Ghioni, C., Bell, J.G., Bell, M.V. and Sargent, J.R. 1997. Fatty acid composition, eicosanoid production and permeability in skin tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a control or an essential fatty acid deficient diet. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 56: 479-489.
- Ghioni, C., Tocher, D.R., Bell, M.V., Dick, J.R. and Sargent, J.R. 1999. Low C18 to C20 fatty acid elongase activity and limited conversion of stearidonic acid, 18:4n-3, to eicosapentaenoic acid, 20:5n-3, in a cell line from turbot, *Scophthalmus maximus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1437: 170-181.
- Ghioni, C., Porter, A.E.A., Taylor, G.W. and Tocher, D.R. 2002. Metabolism of 18:4n-3 (stearidonic acid) and 20:4n-3 in salmonid cells and inhibition of the production of prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) from 20:4n-6 (arachidonic acid). *Fish Physiol. Biochem.* 27: 81-96.
- Givens, D.I. and Gibbs, R.A. 2006. Very long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in the food chain in the UK and the potential of animal-derived foods to increase intake. *Br. Nutr. Found. Bull.* 31: 104-110.
- Glaser, P.E. and Gross, R.W. 1994. Plasmylethanolamine facilitates rapid membrane fusion: a stopped-flow kinetic investigation correlating the propensity of a major plasma membrane constituent to adopt an H_{II} phase with its ability to promote membrane fusion. *Biochemistry* 33: 5805-5812.

- Glencross, B., Hawkins, W. and Curnow, J. 2003. Evaluation of canola oils as alternative lipid resources in diets for juvenile red seabream, *Pagrus auratus*. *Aquacult. Nutr.* 9: 305-315.
- Gottlicher, M., Widmark, E., Li, Q. and Gustafsson, J.A. 1992. Fatty acids activate a chimera of the clofibric acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4653-4657.
- Grisdale-Helland, B., Ruyter, B., Rosenlund, G., Obach, A., Helland, S.J., Sandberg, M.G., Standal, H. and Røsjø, C. 2002. Influence of high contents of dietary soybean oil on growth, feed utilization, tissue fatty acid composition, heart histology and standard oxygen consumption of Atlantic salmon (*Salmo salar*) raised at two temperatures. *Aquaculture* 207: 311-329.
- Grosell, M. 2006. Intestinal anion exchange in marine fish osmoregulation. *J. Exp. Biol.* 209: 2813-2827.
- Grosell, M. 2011. The role of the gastrointestinal tract in salt and water balance. En: *The Multifunctional Gut of Fish*, pp. 135-164. Editores M. Grosell, A.P. Farrell y C.J. Brauner. Academic Press, San Diego (CA).
- Grosell, M. and Genz, J. 2006. Ouabain sensitive bicarbonate secretion and acid absorption by the marine fish intestine play a role in osmoregulation. *Am. J. Physiol.* 291: R1145–R1156.
- Grosell, M. and Taylor, J.R. 2007. Intestinal anion exchange in teleost water balance. *Comp. Biochem. Physiol. A* 148: 14-22.
- Grosell, M., De Boeck, G., Johannsson, O. and Wood, C.M. 1999. The effects of silver on intestinal ion and acid-base regulation in the marine teleost, *Parophrys vetulus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 124: 259-270.
- Grosell, M., Laliberte, C.N., Wood, S., Jensen, F.B. and Wood, C.M. 2001. Intestinal HCO_3^- secretion in marine teleost fish: evidence for an apical rather than a basolateral $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger. *Fish Physiol. Biochem.* 24: 81-95.
- Grosell, M., Wood, C.M., Wilson, R.W., Bury, N.R., Hogstrand, C., Rankin, J.C. and Jensen, F.B. 2005. Bicarbonate secretion plays a role in chloride and water absorption of the European flounder intestine. *Am. J. Physiol.* 288: R936–R946.
- Grosell, M., Genz, J., Taylor, J.R., Perry, S.F. and Gilmour, K.M. 2009. The involvement of H^+ -ATPase and carbonic anhydrase in intestinal HCO_3^- secretion in seawater acclimated rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 212: 1940-1948.
- Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P. and Métailler, R. 2002. *Nutrición y alimentación de peces y crustáceos*. Mundi-Prensa Libros S.A. (Madrid). 476 pp.
- Hagar, A.F. and Hazel, J.R. 1985. Changes in desaturase activity and the fatty acid composition of microsomal membranes from liver tissue of thermally-acclimating rainbow trout. *J. Comp. Physiol. B* 156: 35-42.

- Hagave, T.A., Johansen, Y. and Christophersen, B. 1991. The effect of n-3 fatty acids on osmotic fragility of rat erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1084: 251-254.
- Halm, D.R., Krasny, E.J. and Frizzell, R.A. 1985. Electrophysiology of flounder intestinal mucosa. II. Relation of the electrical potential profile to coupled NaCl absorption. *J. Gen. Physiol.* 85: 865-883.
- Hardy, R.W., Scott, T.M. and Harrell, L.W. 1987. Replacement of herring oil with menhaden oil, soybean oil, or tallow in the diets of Atlantic salmon raised in marine net-pens. *Aquaculture* 65: 267-277.
- Hashimoto, M., Hossain, S., Shimada, T., Sugioka, K., Yamasaki, H., Fujii, Y., Ishibashi, Y., Oka, J.I. and Shido, O. 2002. Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. *J. Neurochem.* 81: 1084-1091.
- Hatch, M. and Freel, R.W. 1988. Electrolyte transport across rabbit caecum in vitro. *Eur. J. Physiol.* 411: 333-338.
- Hazel, J.R. 1995. Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation?. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 19-42.
- He, K. 2009. Fish, long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and prevention of cardiovascular disease –eat fish or take fish oil supplement?. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 52: 95-114.
- Henderson, R.J. 1996. Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids. *Arch. Tierernahr.* 49: 5-22.
- Henderson, R.J. and Tocher, D.R. 1987. The lipid composition and biochemistry of fresh water fish. *Prog. Lipid Res.* 26: 281-347.
- Hernández, J.M., Gasca-Leyvab, E., León, C.J. and Vergara, J.M. 2003. A growth model for gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Ecol. Model.* 165: 265-283.
- Herrmann, J., Hermes, R. and Breves, G. 2010. Transepithelial transport and intraepithelial metabolism of short-chain fatty acids (SCFA) in the porcine proximal colon are influenced by SCFA concentration and luminal pH. *Comp. Biochem. Physiol. A* 158: 169-176.
- Higgs, D.A., Balfry, S.K., Oakes, J., Rowshandeli, M., Skura, B.J. and Deacon, G., 2006. Efficacy of an equal blend of canola oil and poultry fat as an alternate dietary lipid source for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater. I: Effects on growth performance, and whole body and fillet proximate and lipid composition. *Aquacult. Res.* 37: 180–191.
- Hill, R.W., Wyse, G.A. and Anderson, M. 2006. *Fisiología Animal*. Editorial Médica Panamericana (Madrid). 916 pp.
- Hites, R.A., Foran, J.A., Carpenter, D.O., Hamilton, M.C., Knuth, B.A. and Schwager, S.J. 2004. Global assessment of organic contaminants in farmed salmon. *Science* 303: 226-229.

- Holub, B.J. 2009. Docosahexaenoic acid (DHA) and cardiovascular disease factors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 81: 199-204.
- Hong, S., Tjonahen, E., Morgan, E.L., Lu, Y., Serhan, C.N. and Rowley, A.F. 2005. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) brain cells biosynthesize novel docosahexaenoic acid-derived resolvins and protectins-Mediator lipidomic analysis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 78: 107-116.
- Hosfeld, C.D., Hammer, J., Handeland, S.O., Fivelstad, S. and Stefansson, S.O. 2009. Effects of fish density on growth and smoltification in intensive production of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 294: 236-241.
- Hrubec, T.C., Smith, S.A. and Robertson, J.L. 2001. Age-related changes in haematology and plasma chemistry values of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *Vet. Clin.Pathol.* 30: 8-15.
- Huang, S.S.Y., Oo A.N., Higgs, D.A., Brauner, C.J. and Satoh, S. 2007. Effect of dietary canola oil level on the growth performance and fatty acid composition of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 271: 420-431.
- Hunter, B.J. and Roberts, D.C.K. 2000. Potential impact of the fat composition of farmed fish on human health. *Nutr. Res.* 20: 1047-1058.
- Hwang, T.C., Guggino, S.E. and Guggino, W.B. 1990. Direct modulation of secretory chloride channels by arachidonic and other *cis*-unsaturated fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5706-5709.
- Ibeas, C., Izquierdo, M.S. and Lorenzo, A. 1994. Effect of different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids on growth and fatty acid composition of juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 127: 177-188.
- Ibeas, C., Cejas, J., Gómez, T., Jerez, S. and Lorenzo, A. 1996. Influence of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids levels on juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth and tissue fatty acid composition. *Aquaculture* 142: 221-235.
- Ibeas, C., Cejas, J.R., Forés, R., Badía, P., Gómez, T. and Lorenzo Hernández, A. 1997. Influence of eicosapentaenoic to docosahexaenoic acid ratio (EPA/DHA) of dietary lipids on growth and fatty acid composition of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture* 150: 91-102.
- Ilundain, A. and Naftalin, R.J. 1982. La secreción intestinal. *Investigación y Ciencia* 72: 71-82.
- Ingemansson, T., Olsson, N.U. and Kaufmann, P. 1993. Lipid composition of light and dark muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after thermal acclimation: a multivariate approach. *Aquaculture* 113: 153-165.
- Innis, S.M. 1991. Essential fatty acids in growth and development. *Prog. Lipid Res.* 30: 39-103.

- Issemann, I. and Green, S. 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347: 645-650.
- Izquierdo, M.S., Obach, A., Arantzamendi, L., Montero, D., Robaina, L. and Rosenlund, G. 2003. Dietary lipid sources for seabream and seabass: growth performance, tissue composition and flesh quality. *Aquacult. Nutr.* 9: 397-407.
- Izquierdo, M.S., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M.J., Rosenlund, G. and Ginés, R. 2005. Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. *Aquaculture* 250: 431-444.
- Jensen, M.K., Madsen, S.S. and Kristiansen, K. 1998. Osmoregulation and salinity effects on the expression and activity of Na⁺,K⁺-ATPase in the gills of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *J. Exp. Zool.* 282: 290-300.
- Jobling, M. and Bendiksen, E.Å. 2003. Dietary lipids and temperature interact to influence tissue fatty acid compositions of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr. *Aquacult. Res.* 34: 1423-1441.
- Jobling, M., Johansen, S.J.S., Foshaug, H., Burkow, I.C. and Jorgensen, E.H. 1998. Lipid dynamics in anadromous Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L): seasonal variations in lipid storage depots and lipid class composition. *Fish Physiol. Biochem.* 18: 225-240.
- Jump, D.B. 2002. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr. Opin. Lipidol.* 13: 155-164.
- Jump, D.B. and Clarke, S.D. 1999. Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu. Rev. Nutr.* 19: 63-90.
- Jutfelt, F. 2006. The intestinal epithelium of salmonids. Transepithelial transport, barrier function and bacterial interactions. Doctoral Theses, Göteborg University (Sweden). 73 pp.
- Jutfelt, F., Olsen, R.E., Björnsson, B.T. and Sundell, K. 2007. Parr-smolt transformation and dietary vegetable lipids affect intestinal nutrient uptake, barrier function and plasma cortisol levels in Atlantic salmon. *Aquaculture* 273: 298-311.
- Kalogeropoulos, N., Alexis, M.N. and Henderson, R.J. 1992. Effects of dietary soybean and cod-liver oil levels on growth and body composition of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 104: 293-308.
- Karasov, W.H. and Hume, I.D. 1997. Vertebrate gastrointestinal system. *Handb. Physiol.* 13: 409-480.
- Kaushik, S.J. 1997. Recent developments in the nutrition and feeding of marine finfish of interest to the Mediterranean. INVE Conference, ALIIA Tradeshow, Thessaloniki, September 27, 1997.

- Kennedy, S.R., Bickerdike, R., Berge, R.K., Porter, A.R. and Tocher, D.R. 2007. Influence of dietary conjugated linolenic 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.
- Kiliaan, A.J., Scholten, G., Bijlsma, P.B., Dekker, K. and Groot, J.A. 1996. Influence of forskolin and carbachol on intestinal absorption of horseradish peroxidase in the goldfish (*Carassius auratus*). *Cell Tissue Res.* 285: 51-56.
- Kimmich, G.A., Carter-Su, C. and Randles, J. 1977. Energetics of Na⁺-dependent sugar transport by isolated intestinal cells: evidence for a major role for membrane potentials. *Am. J. Physiol.* 233: E357-E362.
- Kiron, V., Takeuchi, T. and Watanabe, T. 1994. The osmotic fragility of erythrocytes in rainbow trout under different dietary fatty acid status. *Fish. Sci.* 60: 93-95.
- Kline, M.A. 2008. Membrane cholesterol regulates vascular endothelial cell viability, function and lipid signaling. Doctoral Theses, The Ohio State University. 54 pp.
- Klinger, R.C., Blazer, V.S. and Echevarría, C. 1996. Effects of dietary lipid on the hematology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 147: 225-233.
- Kongsuphol, P., Hieke, B., Ousingawat, J., Almaca, J., Viollet, B., Schreiber, R. and Kunzelmann, K. 2009. Regulation of Cl⁻ secretion by AMPK in vivo. *Pflügers Arch.* 457: 1071-1078.
- Koven, W.M., Kissil, G.Wm. and Tandler, A. 1989. Lipid and n-3 requirement of *Sparus aurata* larvae during starvation and feeding. *Aquaculture* 79: 185-191.
- Koven, W.M., Tandler, A., Kissil, G.Wm., Sklan, D., Friezlander, O. and Harel, M. 1990. The effect of dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids on growth, survival and swim bladder development in *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture* 91: 131-141.
- Koven, W.M., Tandler, A., Kissil, G.Wm. and Sklan, D. 1992. The importance of n-3 highly unsaturated fatty acids for growth in larval *Sparus aurata* and their effect on survival, lipid composition and size distribution. *Aquaculture* 104: 91-104.
- Kunttu, H.M.T., Valtonen, E.T., Suomalainen, L.R., Vielma, J. and Jokinen, I.E. 2009. The efficacy of two immunostimulants against *Flavobacterium columnare* infection in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 26: 850-857.
- Kurita, Y., Nakada, T., Kato, A., Doi, H., Mistry, A.C., Chang, M.H., Romero, M.F. and Hirose, S. 2008. Identification of intestinal bicarbonate transporters involved in formation of carbonate precipitates to stimulate water absorption in marine teleost fish. *Am. J. Physiol.* 294: R1402-R1412.
- Lahlou, B. 1983. Intestinal transport and osmoregulation in fishes. En: *Intestinal Transport*, pp. 341-353. Editores M. Gilles-Baillien y R. Gilles. Springer-Verlag (Berlin).

- Laiz-Carrión, R., Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán, J.M., Martín del Río, M.P., Mínguez, J.M., Soengas, J.L. and Mancera, J.M. 2002. Energy metabolism in fish tissues related to osmoregulation and cortisol action. *Fish Physiol. Biochem.* 27: 179-188.
- 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.
- Lall, S.P. and Tibbetts, S.M. 2009. Nutrition, feeding, and behavior of fish. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 12: 361-372.
- Lands, W.E.M. 1993. Eicosanoids and health. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 676: 46-59.
- Lane, R.L., Trushenski, J.T. and Kohler, C.C. 2006. Modification of fillet composition and evidence of differential fatty acid turnover in sunshine bass *Morone chrysops* X *M. saxatilis* following change in dietary lipid source. *Lipids* 41: 1029-1038.
- Lauridsen, Ch., Stagsted, J. and Jensen, S.K. 2007. n-6 and n-3 fatty acids ratio and vitamin E in porcine maternal diet influence the antioxidant status and immune cell eicosanoid response in the progeny. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 84: 66-78.
- Lee, K.K., Raynard, R.S. and Ellis, A.E. 1989. The phospholipid composition of Atlantic salmon *Salmo salar* L. erythrocyte membranes. *J. Fish. Biol.* 35: 313-314.
- Lee, S.-M. and Cho, S.H. 2009. Influences of dietary fatty acid profile on growth, body composition and blood chemistry in juvenile fat cod (*Hexagrammos otakii* Jordan et Starks). *Aquacult. Nutr.* 15: 19-28.
- Lee, S.-M., Lee, J.H. and Kim, K.D. 2003. Effect of dietary essential fatty acids on growth, body composition and blood chemistry of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*). *Aquaculture* 225: 269-281.
- Leger, C. 1985. Digestion, absorption and transport of lipids. En: *Nutrition and Feeding in Fish*, pp. 299-331. Editores C.B. Cowey, A.M. Mackie y J.G. Bell. Academic Press (London).
- Leray, C. and Florentz, 1983. Biochemical adaptation of trout intestine related to its ion transport properties. Influence of dietary salt and fatty acids, and environmental salinity. En: *Intestinal Transport: Fundamental and Comparative Aspects*, pp. 354-368. Editores M. Gilles-Baillien y R. Gilles. Springer-Verlag (Berlin).
- Leray, C., Chapelle, S., Duportail, G. and Florentz, A. 1984. Changes in fluidity and 22:6n-3 content in phospholipids of trout intestinal brush-border membrane as related to environmental salinity. *Biochim. Biophys. Acta* 778: 233-238.
- Leray, C., Nonnote, G. and Nonnote, L. 1986. The effect of dietary lipids on the trout erythrocyte membrane. *Fish Physiol. Biochem.* 1: 27-35.

- Libralato, S. and Solidoro, C. 2008. A bioenergetic growth model for comparing *Sparus aurata*'s feeding experiments. *Ecol. Model.* 214: 325-337.
- Lie, Ø., Lied, E. and Lambertsen, G. 1987. Lipid digestion in cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 88: 697-700.
- Lionetto, M.G., Vilella, S., Trischitta, F., Cappello, M.S., Giordano, M.E. and Schettino, T. 1998. Effects of CdCl₂ on electrophysiological parameters in the intestine of the teleost fish, *Anguilla Anguilla*. *Aquat. Toxicol.* 41: 251-264.
- 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.
- Loeschke, K., Schreiner, J. and Oberst, G. 1991. Effects of n-3 fatty acids on fluid and electrolyte transport in rat intestine in vivo and in vitro. *Z. Gastroenterol.* 29: 227-230.
- Lorenzo, A., García, T., Rodríguez, A., Gómez, T. and Badía, P. 1987a. Effect of theophylline on ion transport in the lizard colon. *Comp. Biochem. Physiol. A* 88: 405-410.
- Lorenzo, A., Rodríguez, A., García, T., Badía, P. and Gómez, T. 1987b. Intestinal glucosa and galactose transport in the cultured gilthead bream (*Sparus aurata*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 88: 411-416.
- Lorenzo, A., Cozzi, S., Badía, P. and Bolaños, A. 1989. Intestinal phenylalanine transport in the cultured gilthead bream (*Sparus aurata*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 94: 209-213.
- Machen, T.E. and McLennan, W.L. 1980. Na⁺-dependent H⁺ and Cl⁻ transport in *in vitro* frog gastric mucosa. *Am. J. Physiol.* 238: G403-G413.
- Maffia, M., Acierno, R., Cillo, E. and Storelli, C. 1996. Na⁺-D-glucose cotransport by intestinal BBMVs of the antarctic fish *Trematomus bernachii*. *Am. J. Physiol.* 271: R1576-R1583.
- March, B.E. 1993. Essential fatty acids in fish physiology. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71: 684-689.
- Marshall, W.S. 2003. Rapid regulation of NaCl secretion by estuarine teleost fish: coping strategies for short-duration freshwater exposures. *Biochim. Biophys. Acta* 1618: 95-105.
- Marshall, W.S. and Grosell, M. 2005. Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance. En: *The Physiology of Fishes (3rd Edition)*, pp. 177-230. Editores D.H. Evans y J.B. Claiborne. CRC (New York).
- Martín, M.V. 2003. Estudio de la influencia de los ácidos grasos n-3 HUFA de la dieta en la composición corporal de reproductores de dorada (*Sparus aurata* L.) durante el desarrollo gonadal. Tesis Doctoral, Universidad de la Laguna. 237 pp.
- Martín, M.V., Rodríguez, C., Cejas, J.R., Pérez, M.J., Jérez, S. and Lorenzo, A. 2009. Body lipid and fatty acid composition in male gilthead seabream broodstock at different stages

- of the reproductive cycle: effects of a diet lacking n-3 and n-6 HUFA. *Aquacult. Nutr.* 15: 60-72.
- Martín, M.V., Fabelo, N., Santperec, G., Puig, B., Marín, R., Ferrer, I. and Díaz, M. 2010. Lipid alterations in lipid rafts from Alzheimer's disease human brain cortex. *J. Alzheimers Dis.* 19: 489-502.
- Martínez-Llorens, S., Vidal, A.T., Moñino, A.V., Torres, M.P. and Cerdá, M.J. 2007. Effects of dietary soybean oil concentration on growth, nutrient utilization and muscle fatty acid composition of gilthead bream (*Sparus aurata* L.). *Aquacult. Res.* 38: 76-81.
- Martins, D.A., Valente, L.M.P. and Lall, S.P. 2009. Apparent digestibility of lipid and fatty acids in fish oil, poultry fat and vegetable oil diets by Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *Aquaculture* 294: 132-137.
- Mayer, P., Estruch, V., Blasco, J. and Jover, M. 2008. Predicting the growth of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) farmed in marine cages under real production conditions using temperature- and time-dependent models. *Aquacult. Res.* 39: 1046-1052.
- Mazza, M., Pomponi, M., Janiri, L., Bria, P. and Mazza, S. 2006. Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric diseases: an overview. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 31: 12-26.
- McGreevy, J.M., Barton, R.G. and Housinger, T. 1986. Chloride transport in bullfrog gastric mucosa. *J. Surg. Res.* 40: 462-466.
- McKenzie, D.J. 2001. Effects of dietary fatty acids on the respiratory and cardiovascular physiology of fish. *Comp. Biochem. Physiol. A* 128: 607-621.
- McKenzie, D.S., Van Putte, C.M., and Leiner, K.A. 1998. Nutrient regulation of endocrine function in fish. *Aquaculture* 165: 3-25.
- Meddings, J.B., DeSouza, D., Goel, M. and Thiesen, S. 1990. Glucose transport and microvillus membrane physical properties along the crypt-villus axis of the rabbit. *J. Clin. Invest.* 85: 1099-1107
- Menoyo, D., Izquierdo, M.S., Robaina, L., Ginés, R., López-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.
- Menoyo, D., Díez, A., López-Bote, C.J., Casado, S., Obach, A. and Bautista, J.M. 2006. Dietary fat type affects lipid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and differentially regulates glucose transporter GLUT4 expression in muscle. *Aquaculture* 261: 294-304.
- Metzger, H. and Lindner, E. 1981. The positive inotropic-acting forskolin, a potent adenylate cyclase activator. *Arzneimittelforschung.* 31: 1248-1250.

- Miller, N.G.A., Hill, M.W. and Smith M.W. 1976. Positional and species analysis of membrane phospholipids extracted from goldfish adapted to different environmental temperatures. *Biochim. Biophys. Acta* 455: 644-654.
- Miller, M.R., Nichols, P.D. and Carter, C.G. 2007. Replacement of dietary fish oil for Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.) with a stearidonic acid containing oil has no effect on omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid concentrations. *Comp. Biochem. Physiol. B* 146: 197-206.
- Monroig, O., Webb, K., Ibarra-Castro, L., Holt, G.J. and Tocher, D.R. 2011. Biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in marine fish: Characterization of an Elovl4-like elongase from cobia *Rachycentron canadum* and activation of the pathway during early life stages. *Aquaculture*: 312: 145-153.
- Montero, D. 1996. Efecto de las deficiencias nutricionales de α -tocoferol y n-3 HUFA sobre la resistencia a condiciones estresantes de cultivo en juveniles de dorada (*Sparus aurata*). Tesis Doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 262 pp.
- Montero, D. and Izquierdo, M. 2001. Efecto de los lípidos dietéticos en la salud y resistencia al estrés en peces. En: *Avances en Nutrición Acuícola IV (1ª Edición)*, pp. 282-297. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. La Paz, B.C.S. (México) 15-18 Noviembre, 1998. Editores R.C. Cerecedo, C.J. Pérez Estrada, L.D. Ricque Marie y L.E. Cruz Suárez. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (México). http://www.uanl.mx/utillerias/nutricion_acuicola/IV/archivos/19monte.pdf.
- Montero, D., Tort, L., Izquierdo, M.S., Robaina, L. and Vergara, J.M. 1998. Depletion of serum alternative complemented pathway activity in gilthead seabream caused by α -tocopherol and n-3 HUFA dietary deficiencies. *Fish Physiol. Biochem.* 18: 399-407.
- Montero, D., Kalinowski, T., Obach, A., Robaina, L., 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.
- Montero, D., Socorro, J., Tort, L., Caballero, M.J., Robaina, L.E. and Vergara, J.M. 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.
- Montero, D., Robaina, L., Caballero, M.J., Ginés, R. and Izquierdo, M.S. 2005. Growth, feed utilization and flesh quality of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing vegetable oils: A time-course study on the effect of a re-feeding period with a 100% fish oil diet. *Aquaculture* 248: 121-134.
- 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 expresión and some immune parameters. *Fish Shellfish Immunol.* 24: 147-155.
- 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.
- Moretti, V.M. and Corino, C. 2008. Omega-3 and trans fatty acids. En: *Handbook of Processed Meats and Poultry Analysis*, pp. 233-271. Editores L.M.L. Nollet y F. Toldra. CRC Press Crystal Bay (EEUU).
- Mourente, G. and Bell, J.G. 2006. Partial replacement of dietary fish oil with blends of vegetable oils (rapeseed, linseed and palm oils) in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) over a long term growth study: Effects on muscle and liver fatty acid composition and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Comp. Biochem. Physiol. B* 145: 389-399.
- Mourente, G. and Tocher, D.R. 1993. Effects of weaning on to a dry pellet diet on brain lipid and fatty acid compositions in postlarvae of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Comp. Biochem. Physiol. A* 104: 605-611.
- Mourente, G. and Tocher, D.R. 1994. In vivo metabolism of [1-¹⁴C]linolenic acid (18:3(n-3)) and [1-¹⁴C]eicosapentaenoic acid (20:5(n-3)) in a marine fish: Time-course of the desaturation/elongation pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 1212: 109-118.
- Mourente, G., Rodríguez, A., Tocher, D.R. and Sargent, J.R. 1993. Effect of dietary docosahexaenoic acid (DHA; 22:6(n-3)) on lipid and fatty acid compositions and growth in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) during first feeding. *Aquaculture* 112: 79-98.
- Mourente, G., Dick, J.R., Bell, J.G. and Tocher, D.R. 2005a. Effect of partial substitution of dietary fish oil by vegetable oils on desaturation and β -oxidation of [1-¹⁴C] 18:3n-3 (LNA) and [1-¹⁴C] 20:5n-3 (EPA) in hepatocytes and enterocytes of European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 248: 173-186.
- Mourente, G., Good, J.E. and Bell, J.G. 2005b. 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 E₂ and F_{2 α} , immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Aquacult. Nutr.* 11: 25-40.
- Musch, M.W., Orellana, S.A., Kimberg, L.S., Field, M., Halm, D.R., Krasny, E.J. and Frizzel, R.A. 1982. Na⁺-K⁺-2Cl-co-transport in the intestine of marine teleost. *Nature* 300: 351-353.
- Mustafa, T. and Srivastava, K.C. 1989. Prostaglandins (eicosanoids) and their role in ectothermic organisms. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 5: 157-207.
- Naciones Unidas. 2009. Tendencias Demográficas en el Mundo. Informe del Secretario General E/CN.9/2009/6. Naciones Unidas (Nueva York). 24 pp.

- Nácher-Mestre, J., Serrano, R., Benedito-Palos, L., Navarro, J.C., López, F.J., and Pérez-Sánchez, J. 2009. Effects of fish oil replacement and re-feeding on the bioaccumulation of organochlorine compounds in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) of market size. *Chemosphere* 76: 811-817.
- Nácher-Mestre, J., Serrano, R., Benedito-Palos, L., Navarro, J.C., López, F.J., Kaushik, S. and Pérez-Sánchez, J. 2010. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) exposed to long term feeding trials with different experimental diets. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 59: 137-146.
- Nagan, N. and Zoeller, R.A. 2001. Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog. Lipid Res.* 40: 199-229.
- Nanton, D.A., Vegusdal, A., Bencze Rørå, A.M., Ruyter, B., Baeverfjord, G. and Torstensen, B.E. 2007. Muscle lipid storage pattern, composition, and adipocyte distribution in different parts of Atlantic salmon (*salmo salar*) fed fish oil and vegetable oil. *Aquaculture* 265: 230-243.
- Navarro, J.C., McEvoy, L.A., Bell, M.V., Amat, F., Hontoria, F. and Sargent, J.R. 1997. Effect of different dietary levels of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 ω 3) on the DHA composition of lipid classes in sea bass larvae eyes. *Aquacult. Int.* 5: 509-516.
- Nordrum, S., Krogdahl, Å., Røsjø, C., Olli, J.J. and Holm, H. 2000. Effects of supplementation of high energy diets with methionine, cysteine and medium-chain triglycerides on apparent nutrient digestibility, amino acid absorption along the intestinal tract, plasma amino acid levels, body composition and nutrient retention in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) under a pair-feeding regime. *Aquaculture* 186: 341-360.
- Oku, T., Sugawara, A., Choudhury, M., Komatsu, M., Yamada, S. and Ando, S. 2009. Lipid and fatty acid compositions differentiate between wild and cultured Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Food Chem.* 115: 436-440.
- Olsen, R.E. and Henderson, R.J. 1989. The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 129: 189-197.
- Olsen, R.E., Myklebust, R., Kaino, T. and Ringø, 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.
- Olsen, R.E., Myklebust, R., Ringø, 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.

- Olsen, R.E., Dragnes, B.T., Myklebust, R. and Ringø, 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.
- Oxley, A., Torstensen, B.E., Rustan, A.C. and Olsen, R.E. 2005. Enzyme activities of intestinal triacylglycerol and phosphatidylcholine biosynthesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comp. Biochem. Physiol. B* 141: 77-87.
- Pansu, D., Bellaton, C., Roche, C. and Bronner, F. 1989. Theophylline inhibits transcellular Ca transport in intestine and Ca binding by CaBP. *Am. J. Physiol.* 257: G935-G943.
- Parpoura, A.C.R. and Alexis, M.N. 2001. Effects of different dietary oils in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) nutrition. *Aquacult. Int.* 9: 463-476.
- Parra, D., Ramel, A., Bandarra, N., Kiely, M., Martínez, J.A. and Thorsdottir, I. 2008. A diet rich in long chain omega-3 fatty acids modulates satiety in overweight and obese volunteers during weight loss. *Appetite* 51: 676-680.
- Peng, S., Chen, L., Quin, J.G., Hou, J., Yu, N., Long, K., Ye, J. and Sun, X. 2008. Effect of replacement of dietary fish oil by soybean oil on growth performance and liver biochemical composition in juvenile black seabream, *Acanthopagrus schlegelii*. *Aquaculture* 276: 154-161.
- Pérez, J.A., Rodríguez, C. and Henderson, R.J. 1999. The uptake and esterification of radiolabelled fatty acids by enterocytes isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* 20: 125-134.
- Petridis, D. and Rogdakis, I. 1996. The development of growth and feeding equations for sea bream, *Sparus aurata* L., culture. *Aquacult. Res.* 27: 413-419.
- Pettitt, T.R. and Wakelam, M.J.O. 1998. Distinct phospholipase C-regulated signalling pathways in Swiss 3T3 fibroblasts induce the rapid generation of the same polyunsaturated diacylglycerols. *FEBS Lett.* 427: 371-376.
- Piedecausa, M.A., Mazón, M.J., García García, B. and Hernández, M.D. 2007. Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils in the diets of sharpnose seabream (*Diplodus puntazzo*). *Aquaculture* 263: 211-219.
- Poisson, J.P., Dupuy, R.P., Sarda, P., Descomps, B., Narce, M., Rieu, D. and Poulet, A.C. 1992. Evidence that liver microsomes of human neonates desaturate essential fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1167: 109-113.
- Polakof, S., Ceinos, R.M., Fernández-Durán, B., Míguez, J.M. and Soengas, J.L. 2007. Daily changes in parameters of energy metabolism in brain of rainbow trout: Dependence on feeding. *Comp. Biochem. Physiol. A* 146: 265-273.

- Porthe-Nibelle, J. and Lahlou, B. 1978. Cyclic AMP levels in plasma and in intestinal mucosa of fishes, with special reference to the effects of theophylline and catecholamines. *Gen. Comp. Endocrinol.* 36: 609-617.
- Querellou, J. 1984. Modèles de production en pisciculture intensive: application à l'élevage du loup *Dicentrarchus labrax* L. En: *L'Aquaculture du Bar et des Sparidés*, pp. 483-494. Editores G. Barnabé y R. Billard. INRA Publ. (Paris).
- Ramel, A., Martínez, J.A., Kiely, M., Bandarra, N. and Thorsdottir, I. 2010. Moderate consumption of fatty fish reduces diastolic blood pressure in overweight and obese European young adults during energy restriction. *Nutrition* 26: 168-174.
- Rao, M.C., Nash, N.T. and Field, M. 1984. Differing effects of cGMP and cAMP on ion transport across flounder intestine. *Am. J. Physiol.* 246: C167-C171.
- 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.
- 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.
- Rehman, H., Awad, W.A., Lindner, I., Hess, M. and Zentek, J. 2006. Clostridium perfringens alpha toxin affects electrophysiological properties of isolated jejunal mucosa of laying hens. *Poult. Sci.* 85: 1298-1302.
- Reshkin, S.J. and Ahearn, G.A. 1987. Intestinal glucose transport and salinity adaptation in a euryhaline teleost. *Am. J. Physiol.* 252: R567-R578.
- Reymann, A., Braun, W., Bergheim, M. and Hißnauer, K. 1985. Forskolin-induced elevation of rat jejunal cyclic AMP levels and stimulation of active glucose transport in vitro. *Arch. Pharmacol.* 328: 317-323.
- Richard, N., Kaushik, S., Larroquet, L., Panserat, S. and Corraze, G. 2006a. Replacing dietary fish oil by vegetable oils has little effects on lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nutr.* 96: 299-309.
- Richard, N., Mourente, G., Kaushik, S. and Corraze, G. 2006b. Replacement of a large portion of fish oil by vegetable oils does not affect lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 261: 1077-1087.
- Rincón-Sánchez, A.R., Hernández, A., López, M.L. and Mendoza-Figueroa, T. 1992. Synthesis and secretion of lipids by long-term cultures of female rat hepatocytes. *Biol. Cell* 76: 131-138.

- Rizza, S., Tesauro, M., Cardillo, C., Galli, A., Iantorno, M., Gigli, F., Sbraccia, P., Federici, M., Quon, M.J. and Lauro, D. 2009. Fish oil supplementation improves endothelial function in normoglycemic offspring of patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 206: 569-574.
- Robertson, J.C. and Hazel, J.R. 1997. Membrane constraints to physiological function at different temperatures: does cholesterol stabilize membranes at elevated temperatures?. En: *Global Warming: Implications for Freshwater and Marine Fish*, pp. 25-49. Editores C.M. Wood y D.G. McDonald. Cambridge University Press, Cambridge (UK).
- Rodríguez, C. 1994. Estudio de los requerimientos de ácidos grasos esenciales de la dorada europea (*Sparus aurata*, L.) durante las dos primeras semanas de alimentación. Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna. 284 pp.
- Rodríguez, C., Henderson, R.J., Porter, A.E.A. and Dick, J.R. 1997. Modification of odd-chain length unsaturated fatty acids by hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing fish oil or olive oil. *Lipids* 32: 611-619.
- Rodríguez, C., Cejas, J.R., Martín, M.V., Badía, P., Samper, M. and Lorenzo, A. 1998a. Influence of n-3 highly unsaturated fatty acid deficiency on the lipid composition of broodstock gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) and on egg quality. *Fish Physiol. Biochem.* 18: 177-187.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Badía, P., Izquierdo, M.S., Fernández-Palacios, H. and Lorenzo Hernández, A. 1998b. The n-3 highly unsaturated fatty acids requirements of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae when using an appropriate DHA/EPA ratio in the diet. *Aquaculture* 169: 9-23.
- Rodríguez, C., Pérez, J.A., Henderson, R.J. 2002. The esterification and modification of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids by hepatocytes and liver microsomes of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 132: 559-570.
- Rodríguez, C., Martín, M.V. and Lorenzo, A. 2009. Nutrición lipídica. En: *Nutrición y Alimentación en Piscicultura*, pp. 151-274. Editor F. Sanz. Publicaciones científicas y tecnológicas de OESA (Madrid).
- 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.
- Ruyter, B., Moya-Falcón, C., Rosenlund, G. and Vegusdal, A. 2006. Fat content and morphology of liver and intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*): Effects of temperature and dietary soybean oil. *Aquaculture* 252: 441-452.
- Saera-Vila, A., Benedito-Palos, L., Sitjà-Bobadilla, A., Nàcher-Mestre, J., Serrano, R., Kaushik, S. and Pérez-Sánchez, J. 2009. Assessment of the health and antioxidant trade-off in

- gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed alternative diets with low levels of contaminants. *Aquaculture* 296: 87-95.
- Sala-Rabanal, M., Gallardo, M.A., Sánchez, J. and Planas, J.M. 2004. Na-dependent D-glucose transport by intestinal brush border membrane vesicles from gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Membr. Biol.* 201: 85-96.
- Salte, R., Thommansen, M.S. and Wold, K. 1988. Do high levels of dietary polyunsaturated fatty acids (EPA/DHA) prevent diseases associated with membrane degeneration in farmed Atlantic salmon at low water temperatures?. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.* 8: 63-65.
- Sandstrom, R.P. and Cleland, R.E. 1989. Comparison of the lipid composition of oat root and coleoptile plasma membranes. *Plant Physiol.* 90: 1207-1213.
- Sargent, J.R., Henderson, R.J. and Tocher, D.R. 1989. The lipids. En: *Fish Nutrition (2nd Edition)*, pp. 153-218. Editor J.E. Halver. Academic Press (London).
- Sargent, J.R., Bell, M.V. and Tocher, D.R. 1993. Docosahexaenoic acid and the development of brain and retina in marine fish. En: *Omega-3 Fatty Acids: Metabolism and Biological Effects*, pp. 139-149. Editores C.A. Drevon, I. Baksaas y H.E. Krokan. Birkhäuser Verlag, Basel (Switzerland).
- Sargent, J.R., Bell, M.V., Bell, J.G., Henderson, R.J. and Tocher, D.R. 1995. Origins and functions of n-3 polyunsaturated fatty acids in marine organisms. En: *Phospholipids: Characterization, Metabolism and Novel Biological Applications*, pp. 248-259. Editores G. Ceve y F. Paltauf. Champaign IL: American Oil Chemical Society Press (EEUU).
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A. and Bell, J.G. 1997. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155: 117-127.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R. and Bell, J.G. 2002. The lipids. En: *Fish Nutrition (3rd Edition)*, pp. 181-257. Editores J.E. Halver y R.W. Hardy. Academic Press, San Diego (CA).
- Sastry, P.S. 1985. Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog. Lipid Res.* 24: 69-176.
- Schedl, H.P., Wilson, H.D., Mathur, S.N., Murthy, S. and Field, F.J. 1989. Effects of phospholipid or cholesterol enrichment of rat intestinal brush border membrane on membrane order and transport of calcium. *Metabolism* 38: 1164-1169.
- Schultz, S.G. and Zalusky, R. 1964a. Ion transport in isolated rabbit ileum. I. Short-circuit current and Na fluxes. *J. Gen. Physiol.* 47: 567-583.
- Schultz, S.G. and Zalusky, R. 1964b. Ion transport in isolated rabbit ileum. II. The interaction between active sodium and active sugar transport. *J. Gen. Physiol.* 47: 1043-1059.

- Schulz, C., Knaus, U., Wirth, M. and Rennert, B. 2005. Effects of varying dietary fatty acid profile on growth performance, fatty acid, body and tissue composition of juvenile pike perch (*Sander lucioperca*). *Aquacult. Nutr.* 11: 403-413.
- Seamon, K.B. and Daly, J.W. 1981. Forskolin: a unique diterpene activator of cyclic AMP-generating systems. *J. Cyclic Nucleotide Res.* 7: 201-224.
- Seamon, K.B., Padgett, W. and Daly, J.W. 1981. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 3363-3367.
- Seidelin, M., Madsen, S.S., Blenstrup, H. and Tipsmark, C.K. 2000. Time-course changes in the expression of the Na⁺, K⁺-ATPase in gills and pyloric caeca of brown trout (*Salmo trutta*) during acclimation to seawater. *Physiol. Biochem. Zool.* 73: 446-453.
- Seileiz, I., Paserat, S., Corraze, G., Kaushik, S. and Bergot, P. 2003. Cloning and nutritional regulation of a $\Delta 6$ -desaturase-like enzyme in the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Comp. Biochem. Physiol. B* 135: 449-460.
- Senso, L., Suárez, M., Ruiz-Cara, T. and García-Gallego, M. 2007. On the possible effects of harvesting season and chilled storage on the fatty acid profile of the fillet of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Food Chem.* 101: 298-307.
- Serhan, C.N., Gotlinger, K., Hong, S., Lu, Y., Siegelman, J., Baer, T., Yang, R., Colgan, S.P., and Petasis, N.A. 2006. Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxycontaining docosatrienes. *J. Immunol.* 176: 1848-1859.
- Serot, T., Regost, C., Prost, C., Robin, J. and Arzel, J. 2001. Effect of dietary lipid sources on odour-active compounds in muscle of turbot (*Psetta maxima*). *J. Sci. Food Agric.* 81: 1339-1346.
- Sheldon, W.M. 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.
- Sheridan, M.A. 1988. Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comp. Biochem. Physiol. B* 90: 670-690.
- Shohet, S.B. 1977. Red blood cells. En: *Lipid Metabolism in Mammals, Vol. I*, pp. 191-208. Editor F. Snyder. Plenum Press (New York).
- Sidell, B.D., Crockett, E.L. and Driedzic, W.R. 1995. Antarctic fish tissues preferentially catabolize monoenoic fatty acids. *J. Exp. Zool.* 271: 73-81.
- Simopoulos, A.P. 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 70: 560S-569S.
- Sitjà-Bobadilla, A., Peña-Llopis, S., Gómez-Requeni, P., Médale, F., Kaushik, S. and Pérez-Sánchez, J. 2005. Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific

- defense mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 249: 387-400.
- Skalli, A. and Robin, J.H. 2004. Requirement of n-3 long chain polyunsaturated fatty acids for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: growth and fatty acid composition. *Aquaculture* 240: 399-415.
- Skuladottir, G.V., Schiöth, H.B., Gudmundsdottir, E., Richards, B., Gardarsson, F. and Jonsson, L. 1990. Fatty acid composition of muscle, heart, and liver lipids in Atlantic salmon, *Salmo salar*, at extremely low environmental temperature. *Aquaculture* 84: 71-80.
- Smith M.W. 1983. Membrane transport in fish intestine. *Comp. Biochem. Physiol. A* 75: 325-335.
- Smith, S.A. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptors and the regulation of mammalian lipid metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 1086-1090.
- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. 1981. *Biometry* (2nd Edition). Editor W.H. Freeman and Co. (New York). 859 pp.
- Spector, A.A. and Yorek, M.A. 1985. Membrane lipid composition and cellular function. *J. Lipid Res.* 26: 1015-1035.
- Stickney, R.R. and Andrews, J.W. 1971. Combined effects of dietary lipids and environmental temperature on growth, metabolism and body composition of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Nutr.* 101: 1703-1710.
- Storelli, C., Villela, S. and Cassano, G. 1986. Na-dependent D-glucose and L-alanine transport in eel intestinal brush border membrane vesicles. *Am. J. Physiol.* 251: R463-R469.
- Stubbs, C.D. and Smith, A.D. 1984. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim. Biophys. Acta* 779: 89-137.
- Stubhaug, I., Frøyland, L. and Torstensen, B.E. 2005a. β -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.
- Stubhaug, I., Tocher, D.R., Bell, J.G., Dick, J.R. and Torstensen, B.E. 2005b. Fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) hepatocytes and influence of dietary vegetable oil. *Biochim. Biophys. Acta* 1734: 277-288.
- Stubhaug, I., Lie, Ø. 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.
- Surette, M.E., Whelan, J., Lu, G., Hardard'ottir, I. and Kinsella, J.E. 1995. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids modify syrian hamster platelet and macrophage phospholipid

- fatty acyl composition and eicosanoid synthesis: a controlled study. *Biochim. Biophys. Acta* 1255: 185-191.
- Tabas, I. 2002. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J. Clin. Invest.* 110: 905-911.
- Tacon, A.G.J. and Metian, M. 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture* 285: 146-158.
- Tai, C. and Ding, S.T. 2010. N-3 polyunsaturated fatty acids regulate lipid metabolism through several inflammation mediators: mechanisms and implication for obesity prevention. *J. Nutr. Biochem.* 21: 357-363.
- Takama, K., Suzuki, T., Yoshida, K., Arai, H. and Anma, H. 1994. Lipid content and fatty acid composition of phospholipids in white-flesh fish species. *Fish. Sci.* 60:177-184.
- Takeuchi, T., Satoh, S. and Watanabe, T. 1983. Requirement of *Tilapia nilotica* for essential fatty acids. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 49: 1127-1134.
- Tanaka, T., Iwawaki, D., Sakamoto, M., Takai, Y., Morishige, J., Murakami, K. and Satouchi, K. 2003. Mechanisms of accumulation of arachidonate in phosphatidylinositol in yellowtail. *Eur. J. Biochem.* 270: 1466-1473.
- Tapiero, H., Nguyen Ba, G., Couvreur, P. and Tew, K.D. 2002. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomed. Pharmacother.* 56: 215-222.
- Teague, W.E., Fuller, N.L. Rand, R.P. and Gawrisch, K. 2002. Polyunsaturated lipids in membrane fusion events. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 7: 262-264.
- Thomas, K., Rutter, A., Suller, M., Harwood, J. and Lloyd, D., 1998. Oxygen induces fatty acid (n-6)-desaturation independently of temperature in *Acanthamoeba castellanii*. *FEBS Lett.* 425: 171-174.
- Thompson, A.J., Sargent, J.R. and Owen, J.M. 1977. Influence of acclimatization temperature and salinity on (Na⁺ + K⁺)-dependent adenosine triphosphatase and fatty acid composition in the gills of the eel, (*Anguilla anguilla*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 56: 223-228.
- Thompson, K.D., Henderson, R.J. and Tatner, M.F. 1995. A comparison of the lipid composition of peripheral blood cells and head kidney leucocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comp. Biochem. Physiol. B* 112: 83-92.
- Thomson, A.B.R., Keelan, M., Garg, M.L. and Clandinin, M.T. 1987. Spectrum of effects of dietary long-chain fatty acids on rat intestinal glucose and lipid uptake. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65: 2459-2465.
- Thomson, A.B.R., Keelan, M., Garg, M.L. and Clandinin, M.T. 1989. Influence of dietary fat composition on intestinal absorption in the rat. *Lipids* 24: 494-501.

- Tidwell, J.H. and Allan, G.L. 2001. Fish as food: aquaculture's contribution. EMBO Rep. 2: 958-963.
- Tocher, D.R. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. Rev. Fish. Sci. 11: 107-184.
- Tocher, D.R. and Dick, J.R. 1990. Polyunsaturated fatty acid metabolism in cultured fish cells: Incorporation and metabolism of (n-3) and (n-6) series acids by Atlantic salmon (*Salmo salar*) cells. Fish Physiol. Biochem. 8: 311-319.
- Tocher, D.R., Bell, J.G., Farndale, B.M. and Sargent, J.R. 1997. Effects of dietary γ -linolenic acid-rich borage oil combined with marine fish oils on tissue phospholipid fatty acid composition and production of prostaglandins E and F of the 1-, 2- and 3- series in a marine fish deficient in $\Delta 5$ fatty acyl desaturase. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 57: 125-134.
- Tocher, D.R., Bell, J.G., Dick, J.R., Henderson, R.J., McGhee, F., Michell, D. and Morris, P.C. 2000. Polyunsaturated fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) undergoing parr-smolt transformation and the effects of dietary linseed and rapeseed oils. Fish Physiol. Biochem. 23: 59-73.
- Tocher, D.R., Fonseca-Madrigal, J., Bell, J.G., Dick, J.R., Henderson, R.J. and Sargent, J.R. 2002. Effects of diets containing linseed oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Fish Physiol. Biochem. 26: 157-170.
- Tocher, D.R., Bell, J.G., Dick, J.R. and Crampton, V.O. 2003. Effects of vegetable oil diets on Atlantic salmon hepatocyte desaturase activities and liver fatty acid compositions. Lipids 38: 723-732.
- Tocher, D.R., Fonseca-Madrigal, J., Dick, J.R., Wing Keong, N.G., Bell, J.G. and Campbell, P.J. 2004. Effects of water temperature and diets containing palm oil on fatty acid desaturation and oxidation in hepatocytes and intestinal enterocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp. Biochem. Physiol. B 137: 49-63.
- Tocher, D.R., Dick, J.R., MacGlaughlin, P. and Bell, J.G. 2006. Effects of diet enriched in $\Delta 6$ desaturated fatty acids (18:3n-6 and 18:4n-3), on growth, fatty acid composition and highly unsaturated fatty acid synthesis in two populations of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). Comp. Biochem. Physiol. B 144: 245-253.
- Tocher, D.R., Bendiksen, E.Å., Campbell, P.J. and Bell, J.G. 2008. The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. Aquaculture 280: 21-34.
- Torstensen, B.E., Frøyland, L., and Lie, Ø. 2004a. Replacing dietary fish oil with increasing levels of rapeseed oil and olive oil – effects on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) tissue and lipoprotein lipid composition and lipogenic enzyme activities. Aquacult. Nutr. 10: 175-192.

- Torstensen, B.E., Frøyland, L., Ørnsrud, R. and Lie, Ø. 2004b. Tailoring of a cardioprotective muscle fatty acid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed vegetable oils. *Food Chem.* 87: 567-580.
- Torstensen, B.E., Bell, J.G., Rosenlund, G., Henderson, R.J., Graff, I.E., Tocher, D.R., Lie, Ø and Sargent, J.R. 2005. Tailoring of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) flesh lipid composition and sensory quality by replacing fish oil with a vegetable oil blend. *J. Agric. Food Chem.* 53: 10166-10178.
- Torstensen, B.E., Espe, M., Sanden, M., Stubhaug, I., Waagbø, R., Hemre, G.-I., Fontanillas, R., Nordgarden, U., Hevrøy, E.M., Olsvik, P. and Berntssen, M.H.G. 2008. Novel production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) protein based on combined replacement of fish meal and fish oil with plant meal and vegetable oil blends. *Aquaculture* 285: 193-200.
- Trischitta, F., Denaro, M.G., Faggio, C. and Schettino, T. 1992. Comparison of Cl⁻ absorption in the intestine of seawater –and freshwater- adapted eel, *Anguilla anguilla*: evidence for the presence of a Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport system on the luminal membrane of the enterocyte. *J. Exp. Zool.* 263: 245-253.
- Trischitta, F., Denaro, M.G., Faggio, C., Mandolino, M. and Schettino, T. 1996. Different effects of cGMP and cAMP in the intestine of the European eel, *Anguilla anguilla*. *J. Comp. Physiol. B* 166: 30-36.
- Trischitta, F., Pidalà, P. and Faggio, C. 2007. Nitric oxide modulates ionic transport in the isolated intestine of the eel, *Anguilla anguilla*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 148: 368-373.
- Turchini, G.M., Mentasti, T., Frøyland, L., Orban, E., Caprino, F., Moretti, V.M. and Valfré, F. 2003. Effects of alternative dietary lipid sources on performance, tissue chemical composition, mitochondrial fatty acid oxidation capabilities and sensory characteristics in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquaculture* 225: 251-267.
- Turchini, G.M., Torstensen, B.E. and Ng, W.-K. 2009. Fish oil replacement in finfish nutrition. En: *Reviews in Aquaculture 1*, pp. 10-57. Editores S. De Silva y A. Tacon. Blackwell Publishing Asia Pty Ltd, Carlton, Melbourne (Australia).
- Uauy-Dagach, R., Mena, P. and Hoffman, D. 1994. Essential fatty acid metabolism and requirements for LBW infants. *Acta Pediatr. Suppl.* 405: 78-85.
- Valenzuela, A. 2009. Docosahexaenoic acid (DHA), an essential fatty acid for the proper functioning of neuronal cells: their role in mood disorders. *Grasas y Aceites* 60: 203-212.
- Valfré, F., Caprino, F. and Turchini, G.M. 2003. The health benefit of seafood. *Vet. Res. Comm.* 27 (Suppl. I): 507-512.
- Veillette, P.A., White, R.J. and Specker, J.L. 1993. Changes in intestinal fluid transport in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) during parr-smolt transformation. *Fish Physiol. Biochem.* 12: 193-202.

- Vigliano, F.A., Quiroga, M.I. and Nieto, J.M. 2002. Metabolic adaptation to food deprivation and refeeding in fish. *Rev. Ictiol.* 10: 79-108.
- von Bertalanffy, L. 1938. A quantitative theory of organic growth (inquiries on growth laws). II. *Human Biol.* 10: 181-213.
- Watanabe, T. 1987. Requerimientos de ácidos grasos y nutrición lipídica en los peces. En: *Nutrición en Acuicultura II*, pp. 99-166. Editores J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta. FEUGA (Madrid).
- Whittamore, J.M. 2008. The regulation of intestinal bicarbonate secretion by marine teleost fish. Doctoral Theses, University of Exeter (UK). 372 pp.
- Wilkins, M.R., Mrochen, N., Breves, G. and Schröder, B. 2011. Gastrointestinal calcium absorption in sheep is mostly insensitive to an alimentary induced challenge of calcium homeostasis. *Comp. Biochem. Physiol. B* 158: 199-207.
- Willis, A.L. 1981. Nutritional and pharmacological factors in eicosanoid biology. *Nutr. Rev.* 39: 289-301.
- Wilson, C.M., Friesen, E.N., Higgs, D.A. and Farrell, A.P. 2007. The effect of dietary lipid and protein source on the swimming performance, recovery ability and oxygen consumption of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 273: 687-699.
- Wilson, R.W., Wilson, J.M. and Grosell, M. 2002. Intestinal bicarbonate secretion by marine teleost fish – why and how?. *Biochim. Biophys. Acta* 1566: 182-193.
- Yang, X., Sheng, W., Sun, G.Y. and Lee, J.C.-M. 2011. Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and α -secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *Neurochem. Int.* 58: 321-329.
- Yildiz, H.Y. 2009. Reference biochemical values for three cultured Sparid fish: striped sea bream, *Lithognathus mormyrus*; common dentex, *Dentex dentex*; and gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Comp. Clin. Pathol.* 18: 23-27.
- Young, A., Morris, P.C., Huntingford, F.A. and Sinnott, R. 2006. Replacing fish oil with pre-extruded carbohydrate in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar*, during their marine grow-out phase: Effects on growth, composition and colour. *Aquaculture* 253: 531-546.
- Young, G. and Conquer, J. 2005. Omega-3 fatty acids and neuropsychiatric disorders. *Reprod. Nutr. Dev.* 45: 1-28.
- Yu, T.C., Sinnhuber, R.O. and Putman, G.B. 1977. Effect of dietary lipids on fatty acid composition of body lipid on rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Lipids* 12: 495-499.
- Zakeri, M., Kochanian, P., Marammazi, J.G., Yavari, V., Savari, A. and Haghi, M. 2011. Effects of dietary n-3 HUFA concentrations on spawning performance and fatty acid composition of broodstock, eggs and larvae in yellowfin sea bream *Acanthopagrus latus*. *Aquaculture* 310: 388-394.

- Zalata, A.A., Christophe, A.B., Depuydt, C.E., Schoonjans, F. and Comhaire, F.H. 1998. The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients, *Mol. Human Repr.* 4: 111-118.
- Zar, J.H. 1984. *Biostatistical Analysis*. Editor J.H. Zar. Prentice-Hall, Upper Saddle River (NJ). 622 pp.
- Zheng, X., Tocher, D.R., Dickson, C.A., Bell, J.G. and Teale, A.J. 2004. Effects of diets containing vegetable oil on expression of genes involved in polyunsaturated fatty acid biosynthesis in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 236: 467-483.
- Zheng, X., Torstensen, B.E., Tocher, D.R., Dick, J.R., Henderson, R.J. and Bell, J.G. 2005. Environmental and dietary influences on highly unsaturated fatty acid biosynthesis and expression of fatty acyl desaturase and elongase genes in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Biochim. Biophys. Acta* 1734: 13-24.
- Zheng, X., Leaver, M.J. and Tocher, D.R. 2009. Long-chain polyunsaturated fatty acids in fish: Comparative analysis of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) $\Delta 6$ fatty acyl desaturase gene promoter. *Comp. Biochem. Physiol. B* 154: 255-263.

APÉNDICE 1. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Producción mundial de aceite de pescado, aceites vegetales y grasas animales entre 1980 y 2006 (miles de Tm) y precios medios* del aceite de pescado, de los principales aceites vegetales y del sebo, en el mercado Noroccidental europeo en la última década (US\$/Tm).....	10
Tabla 3.1. Ingredientes y composición proximal de las dietas experimentales.....	28
Tabla 3.2. Composición en clases lipídicas de las dietas experimentales.....	29
Tabla 3.3. Composición en ácidos grasos (% del total de ácidos grasos) del lípidos total de las dos dietas experimentales.....	30
Tabla 4.1. Contenido lipídico y composición en clases lipídicas de órganos de la muestra inicial.....	55
Tabla 4.2. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) del lípidos total de los órganos de la muestra inicial.....	56
Tabla 4.1.1. Resultados de crecimiento y utilización del alimento de juveniles de dorada alimentados durante 120 días con las dos dietas experimentales.....	58
Tabla 4.2.1. Contenido lipídico y composición en clases lipídicas del músculo de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD).....	65
Tabla 4.2.2. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) del lípidos total del músculo de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD).....	66
Tabla 4.2.3. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de la fosfatidilcolina (FC) y fosfatidiletanolamina (FE) del músculo de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD).....	67
Tabla 4.2.4. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de la fosfatidilserina (FS) , fosfatidilinositol (FI) y triglicéridos (TG) del	

músculo de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)	68
Tabla 4.3.1. Contenido lipídico y composición en clases lipídicas del hígado de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)	73
Tabla 4.3.2. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) del lípidio total del hígado de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)	74
Tabla 4.3.3. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) del total de lípidos polares (TLP) y triglicéridos (TG) del hígado de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)	75
Tabla 4.3.4. Contenido lipídico y composición en clases lipídicas del hematocrito de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)	82
Tabla 4.3.5. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) del lípidio total del hematocrito de juveniles de dorada alimentados con las dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)	83
Tabla 4.3.6. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de la fosfatidilcolina (FC) y fosfatidiletanolamina (FE) del hematocrito de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)	84
Tabla 4.3.7. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de la fosfatidilserina (FS) , fosfatidilinositol (FI) y triglicéridos (TG) del hematocrito de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)	85

Tabla 4.3.8. Contenido lipídico y composición en clases lipídicas del cerebro de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD).....	91
Tabla 4.3.9. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) del lípidio total del cerebro de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)	92
Tabla 4.3.10. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de la fosfatidilcolina (FC) y fosfatidiletanolamina (FE) del cerebro de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD).....	93
Tabla 4.3.11. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de la fosfatidilserina (FS) , fosfatidilinositol (FI) y triglicéridos (TG) del cerebro de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)	94
Tabla 4.3.12. Contenido lipídico y composición en clases lipídicas del intestino anterior y posterior de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD).....	106
Tabla 4.3.13. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) del lípidio total del intestino anterior y posterior de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)	107
Tabla 4.3.14. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de la fosfatidilcolina del intestino anterior y posterior de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)	108
Tabla 4.3.15. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de la fosfatidiletanolamina del intestino anterior y posterior de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD).....	109

Tabla 4.3.16. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de la fosfatidilserina del intestino anterior y posterior de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)	110
Tabla 4.3.17. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) del fosfatidilinositol del intestino anterior y posterior de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)	111
Tabla 4.3.18. Composición en ácidos grasos (porcentaje del total de ácidos grasos) de los triglicéridos del intestino anterior y posterior de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)	112
Tabla 4.5.1. Composición en electrolitos, proteína total, colesterol total y triglicéridos del plasma sanguíneo de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)	138

APÉNDICE 2. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Evolución de la producción acuática mundial en el periodo 1950-2008	2
Figura 1.2. Modelo simplificado de los procesos de transporte de electrolitos y agua en células del epitelio intestinal de teleósteos marinos	16
Figura 3.1. Aspecto de las dietas experimentales	27
Figura 3.2. Extracción de sangre	32
Figura 3.3. División en segmentos del tracto intestinal de la dorada.....	34
Figura 3.4. Perfusión del hígado	34
Figura 3.5. Izda. Visión general de sistema empleado en la determinación de parámetros bioeléctricos y flujos unidireccionales y netos a través del epitelio intestinal. Dcha. Montaje de tejidos en cámara de Ussing.....	36
Figura 3.6. Disposición de las parejas de electrodos para medidas de parámetros eléctricos en la cámara de Ussing.....	37
Figura 3.7. Desarrollo de clases lipídicas en la placa de HPTLC	44
Figura 4.1. Aspecto externo del hígado de ejemplares experimentales	70
Figura 4.2. Aspecto externo del intestino de los ejemplares experimentales	100
Figura 4.3. Evolución temporal de los parámetros eléctricos en el intestino anterior de juveniles de dorada en presencia de la solución Ringer	117
Figura 4.4. Evolución temporal de los parámetros eléctricos en el intestino posterior de juveniles de dorada en presencia de la solución Ringer.....	118
Figura 4.5. Flujos de cloruro a través del intestino anterior y posterior de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)	119

Figura 4.6. Flujos de sodio a través del intestino anterior y posterior de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD) 120

Figura 4.7. Efecto de la adición de teofilina 3 mM sobre los parámetros eléctricos a través del **intestino anterior** de juveniles de dorada..... 124

Figura 4.8. Efecto de la adición de teofilina 3 mM sobre los parámetros eléctricos a través del **intestino posterior** de juveniles de dorada 125

Figura 4.9. Efecto de la adición de teofilina 3 mM sobre los flujos de cloruro a través del **intestino anterior (a)** y **posterior (b)** de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD)..... 126

Figura 4.10. Efecto de la adición de la forskolina 10^{-5} M sobre los parámetros eléctricos a través del **intestino anterior** de juveniles de dorada 130

Figura 4.11. Efecto de la adición de forskolina 10^{-5} M sobre los parámetros eléctricos a través del **intestino posterior** de juveniles de dorada 131

Figura 4.12. Efecto de la adición de forskolina 10^{-5} M sobre los flujos de cloruro a través del **intestino anterior (a)** y **posterior (b)** de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD) 132

Figura 4.13. Efecto de la adición de teofilina 3 mM y de forskolina 10^{-5} M sobre los niveles de AMPc intracelular en el intestino anterior y posterior de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD) 134

Figura 4.14. Efecto de la adición de floricina 1 mM sobre los flujos de glucosa a través del **intestino anterior (a)** y **posterior (b)** de juveniles de dorada alimentados con la dieta control (DC) o con la dieta deficiente en HUFA (DD) 137