

Influencia de los ácidos grasos de la dieta en el perfil lipídico de ovocitos y espermatozoides de reproductores de *Seriola dumerili*

Influence of dietary fatty acids on the lipid profile of oocytes and sperm of *Seriola dumerili* broodstock



Trabajo de Fin de Grado

Grado en Biología. Curso 2021-2022

Abraham Cabrera Fuentes

Tutorizado por: Dra. Covadonga Rodríguez González y

Dra. Diana Botelho Reis

ÍNDICE

1. RESUMEN-ABSTRACT	3
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1. Sobreexplotación de los recursos marinos	5
2.2. Importancia de la acuicultura.....	5
2.3. <i>Seriola dumerili</i> (Risso, 1810)	6
2.3.1. Características generales.....	6
2.3.2. Reproducción.....	6
2.3.3. Nutrición.....	8
3. OBJETIVOS	10
4. MATERIAL Y MÉTODOS	11
4.1. Diseño experimental	11
4.2. Análisis lipídico	12
4.2.1. Extracción de lípidos	12
4.2.2. Determinación de la composición de clases lipídicas	13
4.2.3. Determinación del perfil de ácidos grasos.....	14
4.3. Análisis estadístico	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
5.1. Composición lipídica de las dietas.....	16
5.2. Efecto de la dieta en la composición lipídica del esperma y ovocitos de <i>S. dumerili</i>	19
6. CONCLUSIONES - CONCLUSIONS	25
7. BIBLIOGRAFÍA	28
AGRADECIMIENTOS:.....	33

1. RESUMEN-ABSTRACT

La demanda de una nutrición de calidad que resulte sostenible supone uno de los principales retos para la sociedad actual. La acuicultura surge como una de las posibles soluciones a este dilema, no obstante, no todas las especies resultan susceptibles de ser cultivadas. El medregal (*Seriola dumerili*), es un pez perciforme con gran potencial, sin embargo, los problemas para su reproducción en cautividad dificultan su exitosa producción. La nutrición ha sido reconocida como un factor fundamental para el buen desarrollo reproductivo. El objetivo de este trabajo fue valorar el efecto de dos dietas de distinto perfil de ácidos grasos (dieta control y dieta experimental), sobre la composición lipídica de dos gametos de *S. dumerili*. Aunque la dieta experimental promueve una mayor proporción de lípidos polares en los gametos, el cambio no resultó significativo durante el tiempo ensayado. Sin embargo, el esperma y especialmente los ovocitos de los peces experimentales mostraron contenidos al alza de ARA y DHA, generando relaciones ARA/EPA y DHA/EPA significativamente superiores, frente a los gametos control que mostraron niveles significativamente superiores de 20:1n-9 y 22:1n-11, siendo también el EPA significativamente más elevado en los ovocitos de los peces control. Se puede concluir, por lo tanto, que la dieta afecta a la composición de ácidos grasos de los gametos de ambos sexos. Si bien las gónadas de esta especie en su estado natural muestran contenidos superiores de lípidos polares, ARA y DHA, que la de ejemplares cautivos, en futuros estudios cabría determinar si los cambios inducidos por la dieta experimental se traducen en un mayor éxito reproductivo de la especie.

Palabras clave: ARA, composición lipídica, EPA, DHA, nutrición, reproducción, *Seriola dumerili*.

The demand for a sustainable quality nutrition is one of the main challenges of today's society. Aquaculture emerges as one of the possible solutions to this dilemma, however, not all species are appropriate for farming. The amberjack (*Seriola dumerili*) is a perciform fish with great potential, however, the problems regarding its reproduction in captivity hamper its successful production. Nutrition has been recognized as a fundamental factor for good reproductive development. The objective of this study was to evaluate the effect diets with different fatty acid profiles (control diet and experimental diet) on the lipid composition of *S. dumerili* gametes. Although experimental diet promotes a higher proportion of polar lipids in the gametes, the changes were not statistically significant during the experiment period. Sperm and especially oocytes of

experimental fish showed upward contents of ARA and DHA, generating significantly higher ARA/EPA and DHA/EPA ratios, compared to control gametes that showed significantly higher levels of 20:1n-9 and 22:1n-11, with EPA also being significantly higher in oocytes of control fish. It can be concluded, therefore, that diet affects the fatty acid composition of gametes of both sexes. Although the gonads of this species in their natural state show higher contents of polar lipids, ARA and DHA than those of captive specimens, future studies could determine whether the changes induced by the experimental diet translate into higher reproductive success of the species.

Keywords: ARA, EPA, DHA, lipid composition, nutrition, reproduction, *Seriola dumerili*.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Sobreexplotación de los recursos marinos

Se estima que la población mundial actual, está en torno a los 7954 millones de personas según el Fondo de Población de las Naciones Unidas (UNFP, 2022). Sin embargo, según la Organización de las Naciones Unidas (ONU), se prevé que este número aumente hasta llegar a los 9700 millones de personas en el año 2050 (ONU, 2019). Este constante crecimiento de la población trae consigo una serie de problemas en cuanto a la gestión de recursos, siendo uno de ellos, la producción de alimentos.

Durante más de 60 años el consumo mundial de pescado ha aumentado a una tasa significativamente superior a la tasa de crecimiento de la población mundial. Entre 1961 y 2017 la tasa media de crecimiento anual del consumo total de pescado fue de un 3,1%, superando la tasa de crecimiento anual de la población de 1,6% (FAO, 2020). Esto se debe a la concienciación de la importancia del pescado como fuente no solo de proteína de alta calidad, pero además de numerosos nutrientes esenciales. En consecuencia, la industria pesquera ha ganado una importancia notable en la producción de alimentos. Sin embargo, debido a este aumento de la demanda y, a que los recursos naturales no son ilimitados, el sector pesquero se enfrenta a un grave problema. La sobreexplotación de los recursos marinos ha provocado que las poblaciones de peces explotadas que están dentro de niveles biológicamente sostenibles hayan pasado de un 90% en el año 1974 a un 65,8% en 2017 (FAO, 2020).

2.2. Importancia de la acuicultura

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la acuicultura es el cultivo de organismos acuáticos (principalmente peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas) tanto de agua dulce, como salada. Los avances científicos de los últimos 50 años han ayudado a mejorar los conocimientos acerca de los ecosistemas acuáticos, ocasionando un avance dentro de la acuicultura, lo que ha permitido que su contribución a la producción pesquera mundial alcanzara en 2018 el 46,0%, frente a los 25,7% en el año 2000 (FAO, 2020). La acuicultura se encuentra en constante expansión y podría presentarse como parte de una solución más sostenible para la producción pesquera y la gestión de los recursos marinos. El continente asiático posee una producción mundial de pescado proveniente de la acuicultura mucho mayor (89% del

total mundial del volumen en los últimos 20 años) que en el resto de los continentes. En Europa la producción acuícola de peces con escama se centra en un número reducido de especies: salmón del atlántico (*Salmo salar*), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), carpa común (*Cyprinus carpio*), lubina (*Dicentrarchus labrax*) y dorada (*Sparus aurata*) (FAO, 2020). De este modo, se necesita ampliar el número de especies que se cultivan, para hacer frente a las demandas de los consumidores y ofertar un mayor catálogo de productos.

En la búsqueda de nuevas especies que puedan cumplir con los estándares exigidos y así contribuir con la diversificación de especies y el desarrollo del sector de la acuicultura, se encuentra el medregal (*Seriola dumerili*, Risso, 1810). Esta especie, también conocida como pez limón, es un pez con una distribución cosmopolita, que resulta de gran interés por su carne de buena calidad, tratándose de un alimento ampliamente aceptado por los consumidores. Además, presenta un rápido crecimiento, alcanzando rápidamente la talla mínima de comercialización recomendada de 113 cm (Asociación del sector de la Pesca Recreativa en Canarias, s/f). Además, puede alcanzar hasta 190 cm (Bauchot, 1987), adquiriendo un gran valor comercial e interés en el mercado. Esto lo convierte en uno de los principales candidatos para la diversificación de especies en la acuicultura en Europa (Diversify, s/f).

2.3. *Seriola dumerili* (Risso, 1810)

2.3.1. Características generales

S. dumerili (Risso, 1810) (medregal) es un pez óseo que pertenece a la familia *Carangidae*. Tienen costumbres diurnas, los adultos de mayor tamaño se pueden ver solos, en parejas o en pequeños grupos, mientras que los medianos son gregarios. Son bentopelágicos y se encuentran en profundidades de 1 a 150 metros, aunque han sido encontrados a profundidades de 360 metros (Fisher et al., 1981, 1987). Prefieren zonas rocosas expuestas a corrientes. La talla de este pez puede llegar a los 190 cm (Bauchot, 1987) y debido a este gran tamaño puede alimentarse de peces grandes, incluso de gallos oceánicos (Del Rosario y Del Rosario, 2015).

2.3.2. Reproducción

El medregal, tiene una reproducción gonocórica. Las puestas son pelágicas desde mitad de abril hasta finales de octubre alcanzando un pico en los meses de junio, julio y agosto.

El reclutamiento de las larvas es pelágico, los alevines están cerca de la superficie y, preferiblemente alejados de la costa, encuentran refugio bajo objetos que están flotando como, por ejemplo, algas, medusas o plásticos. Los juveniles hasta una talla de 15 cm conservan las bandas transversales oscuras que sirven para camuflarse de los depredadores, pero estas van desapareciendo con el crecimiento. Por encima de esta talla empiezan a reclutarse cerca de la costa (Del Rosario y Del Rosario, 2015).

Aunque esta especie ha alcanzado muy buenos resultados en cuanto a su alimentación y desarrollo en cultivo, su producción y comercialización se encuentran actualmente limitados debido a una serie de problemas asociados principalmente a su susceptibilidad a los patógenos y la reproducción en cautividad.

La reproducción es una etapa que depende de las hormonas, donde entran en juego factores genéticos y factores ambientales como: temperatura, estrés, salinidad, fotoperiodo y nutrición entre otros. Los factores ambientales hacen que comiencen a producirse unos cambios en la secreción de hormonas que estimulan o inhiben la liberación de gonadotropinas que se encargan de la maduración, ovulación y desove (Sanz, 2009). Los problemas reproductivos en peces cultivados son en general más graves en hembras que en machos. Estos problemas se podrían clasificar en tres tipos:

- Los ovocitos no son lo suficientemente maduros.
- Ausencia de maduración final del ovocito.
- Ausencia de desove al final del ciclo reproductivo.

Mientras que los problemas que se observan en los machos son: la reducción en la producción y calidad del semen. Siendo la causa más probable el estrés provocado por la cautividad y la falta de un ambiente “natural” apropiado para la liberación de los gametos (Zohar y Mylonas, 2001; Mañananós et al., 2008). Este tipo de problemas reproductivos se dan también en el medregal y conducen a la atresia folicular de los ovocitos y la reducción del índice gonadosomático (Zupa et al., 2017).

Debido a que el problema con la función reproductiva de los peces en cautividad se debe a una disminución en la liberación de la hormona luteinizante (LH), la manipulación de la reproducción se centró en un principio en usar preparaciones de LH exógena que actúan directamente en la gónada. Actualmente se centra en utilizar implantes de GnRHa (hormona agonista de la hormona liberadora de gonadotropina) que actúa sobre la glándula pituitaria y hace que se libere la LH endógena (Mylonas, et al., 2010). Este último ha resultado ser un tratamiento hormonal eficaz en *S. dumerili* ya que demostró ser capaz de inducir la maduración, ovulación y el desove de ejemplares maduros. Tras

múltiples aplicaciones de GnRH α , los medregales fueron capaces de proporcionar huevos y larvas viables, mejorando el grado de desarrollo y rendimiento reproductivo de cara a la comercialización y manteniendo un correcto bienestar del animal (Mylonas, et al. 2004; Jerez et al., 2018).

2.3.3. Nutrición

La nutrición ha demostrado ser un factor que también condiciona el buen desarrollo de la función reproductiva (Izquierdo et al., 2001; Rodríguez-Barreto et al., 2012, 2014), de tal manera que tiene un efecto directo en aspectos muy importantes como el tiempo para la primera madurez, la fecundidad, el tamaño y la calidad de los huevos, la eclosión y la supervivencia larvaria (Schreck, 2010).

En lo que respecta a la nutrición de peces teleósteos, se ha descrito la importancia de los lípidos, concretamente de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA, del inglés *long chain polyunsaturated fatty acids*) por su función estructural y en el desarrollo del metabolismo. Los lípidos son un grupo de macro biomoléculas que pueden clasificarse según su polaridad distinguiendo entre lípidos neutros (LN) y lípidos polares (LP) (Turchini et al., 2022). Los lípidos neutros son hidrófobos y pueden tener una gran variedad de funciones (Christie y Han, 2012). Dentro de este grupo se encuentran principalmente los triglicéridos y el colesterol (Turchini et al., 2022). Por otro lado, los lípidos polares son moléculas que poseen un extremo hidrófilo y otro hidrófobo (molécula anfipática) y están localizados en las membranas celulares formando los fosfoglicéridos y los esfingolípidos (Turchini et al., 2022). Los fosfoglicéridos son la clase lipídica que mayor importancia fisiológica tiene y la que más abunda (Turchini et al., 2022). Se caracterizan porque están contruidos a partir de una estructura común, el ácido fosfatídico que está formado por una molécula de L-glicerol-3-fosfato unido a dos ácidos grasos (AG) esterificados en las posiciones sn-1 y sn-2. A partir de la esterificación de las “bases” de colina, etanolamina, serina e inositol al grupo fosfato del ácido fosfatídico, se forman los principales fosfoglicéridos de los tejidos de los peces, siendo muy abundantes en gónadas y huevos fecundados: la fosfatidilcolina (PC, del inglés *phosphatidylcholine*), la Fosfatidiletanolamina (PE, del inglés *phosphatidylethanolamine*), la fosfatidilserina (PS, del inglés *phosphatidylethanolamine*) y el fosfatidilinositol (PI, del inglés *phosphatidylinositol*) (Tocher et al., 2008; Turchini et al., 2022). Los lípidos cumplen funciones sumamente importantes como componentes estructurales de las membranas, son depósitos de energía, transportadores de sustratos en

reacciones enzimáticas de carotenoides y además también son importantes precursores de eicosanoides y moduladores de la expresión génica (Tocher et al., 2008 Turchini et al., 2022).

Los AG son componentes importantes para la biosíntesis de lípidos porque se localizan formando parte de los lípidos más complejos. Su clasificación se realiza a partir de la longitud de su cadena, del número de dobles enlaces que tenga (grado de insaturación) y la posición en la que se encuentren esas insaturaciones. Podemos encontrar AG saturados cuando los carbonos que forman la molécula están unidos por enlaces simples o saturados; monoinsaturados cuando la molécula de AG posee un doble enlace en la cadena, y si posee dos o más dobles enlaces en su estructura se le considera poliinsaturado (PUFAs, del inglés, *polyunsaturated fatty acids*) (Turchini et al., 2010). Aquellos AG que poseen 20 carbonos o más y tres o más dobles enlaces, se les denomina ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA, del inglés, *long chain polyunsaturated fatty acids*), grupo al que pertenecen el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) y ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5n-3) de la serie omega-3 y el ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6) de la serie omega-6, siendo los dos últimos los principales precursores de los eicosanoides (Tocher, 2008) y el DHA el principal precursor de los docosanoides. Los derivados de estos AG pueden ser eminentemente antiinflamatorios (derivados del EPA y DHA) o proinflamatorios (derivados del ARA) (James et al., 2000; Wall et al., 2010). El DHA, el EPA y el ARA han demostrado ser AG de gran importancia para un correcto desarrollo de la función reproductiva, tanto en la calidad de los gametos como en el mantenimiento de la etapa embrionaria, así como en los estadios tempranos de desarrollo larvario. Esto se debe a que además de que el DHA tiene un papel muy importante en la producción de cambios conformacionales de las membranas, junto con el EPA, es esencial en la formación de gónadas, huevos, espermatozoides y en el desarrollo neural y visual de las larvas (Glencross et al., 2009; Rodríguez-Barreto et al., 2014; Zupa et al., 2017; Pousis et al., 2019), afectando de manera sustancial a su capacidad depredadora y cognitiva. Como mencionamos anteriormente, tanto EPA como ARA son importantes precursores de eicosanoides que intervienen de manera competitiva, en procesos de inflamación y de la respuesta inmune como mediadores del sistema nervioso central. Estos dos AG comparten el mismo pool de enzimas lipooxigenasas y ciclooxigenasas, por tanto, es necesario mantener un equilibrio en la proporción EPA/ARA para una correcta nutrición y un buen desarrollo de la etapa reproductiva como se ha demostrado

en varios estudios (Rodríguez-Barreto et al., 2012, 2014; Zupa et al., 2017; Pousis et al., 2019).

Teniendo en cuenta esta información, en condiciones de cultivo, la nutrición de los reproductores es uno de los factores más determinantes, dentro del contexto de la nutrición de los peces ya que condicionan el buen desarrollo de los especímenes cultivados, puesto que la deficiencia de determinados nutrientes en la dieta puede llegar a ocasionar graves problemas en la etapa reproductiva tales como, el desarrollo de gónadas inmaduras o una reducción en las proporciones de eclosión y supervivencia en alevines de algunas especies (Watanabe, 1990) o una reducción de los ratios de fertilización (Fernández Palacios et al., 1995, 1997).

3. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo fin de grado es mejorar el conocimiento en relación a los requerimientos lipídicos del *S. dumerili* durante el proceso reproductivo y así ayudar en la optimización de su rendimiento reproductor en cautividad. Para ello se determinó el efecto de los ácidos grasos de la dieta (dieta control versus dieta experimental), en la composición lipídica de esperma y ovocitos, obtenidos a través de un masaje de la zona abdominal (método manual).

Para la consecución del objetivo general, se cuantificó:

- El contenido lipídico de esperma y ovocitos de dos grupos de reproductores; un grupo alimentado con la dieta control y el otro con la dieta experimental.
- El perfil de clases lipídicas del esperma y ovocitos de ambos grupos de reproductores.
- El perfil de AG del esperma y ovocitos de los reproductores alimentados con ambas dietas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Diseño experimental

Se analizaron un total de 27 muestras de esperma y ovocitos (13 de esperma y 14 de ovocitos) de 13 ejemplares (8 machos y 5 hembras), obtenidas a través de un masaje abdominal (método manual) de reproductores de *S. dumerilii* cultivados en la planta de cultivo del Instituto Español de Oceanografía-Centro Oceanográfico de Canarias (IEO-coc; CSIC), localizado en la Dársena Pesquera, Santa Cruz de Tenerife (Calle Farola del Mar, nº 22). Los diferentes individuos, pertenecen a una generación F1, nacida en las instalaciones del IEO-COC de progenitores salvajes. Los individuos fueron cultivados en tanques circulares sombreados de 50 m³, con renovación continua, en condiciones naturales de fotoperiodo, salinidad (37,5 psu) y temperatura (19,2 ± 0,3). Los ejemplares fueron separados en dos tanques y alimentados durante 3 meses, 3 veces a la semana hasta aparente saciedad con 2 dietas distintas:

- **Dieta control:** pienso comercial para rodaballo (VITALIS, Skretting Aquaculture Research Center (SARC); Norway).
- **Dieta experimental:** pienso Génesis 20.0, elaborado por IRIDA (hr@irida.com, Grecia; MAGIATIKO Project; HCMR, Creta) con mayores proporciones de ingredientes ricos en lípido polar y un perfil de ácidos grasos esenciales basado en el encontrado en las gónadas maduras de ejemplares de *S. dumerili* salvaje del Mediterráneo (ARA/EPA y DHA/EPA, superiores) (Zupa et al., 2017; Pousis et al., 2019).

La extracción de esperma y ovocitos se realizó en tres fechas distintas: 30 de julio, 23 de septiembre y 11 de noviembre de 2020. Debido a la mala calidad de los gametos obtenidos de algunos de los ejemplares y/o al pequeño tamaño de las muestras, no todas las extracciones fueron conservadas y/o analizadas en el laboratorio de Fisiología Animal del Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología de la Universidad de La Laguna (Grupo de investigación NUTRAHLIPIDS; Fisiología de los Lípidos y sus Derivados en la Nutrición Animal y Humana). En la tabla 1 se presentan los ejemplares a los cuales se procedió al análisis lipídico de los gametos.

Tabla 1 – Identificación de los ejemplares de *Seriola dumerili*, a los cuales se procedió al análisis lipídico de sus gametos

		Identificación (número del chip)	30/07/2020	23/09/2020	11/11/2020
Dieta control					
Machos		618004	×	×	×
		618399	×	×	-
		556586	-	×	-
		74915	×	-	-
Hembras		613539	×	×	×
		061162	×	×	×
Dieta experimental					
Machos		617611	×	×	-
		615402	×	-	-
		590714	×	-	-
		743091	×	-	-
Hembras		566030	×	×	×
		060470	×	×	-
		903193	×	×	×

Tanto las labores de cultivo de los ejemplares de *S. dumerilii*, como la extracción de esperma y ovocitos fueron realizadas por personal cualificado del IEO-COC, siguiendo la normativa de bienestar animal. Para la elaboración de este trabajo, el autor realizó el análisis del contenido y perfil lipídico de las muestras de esperma y ovocitos obtenidas.

4.2. Análisis lipídico

4.2.1. Extracción de lípidos

Para determinar el contenido lipídico de las muestras seleccionadas, se realizó una extracción lipídica siguiendo el método descrito por Folch et al. (1957) modificado por Christie (2003). Para ello, se pesaron entre 50 y 180 mg de muestra (dependiendo de la cantidad de muestra disponible para el análisis) en un tubo de ensayo. Las muestras se homogeneizaron por medio de un homogeneizador (Virtishear homogenizar, Virtis Company, NY, USA) con 10 ml de cloroformo:metanol 2:1 (Cl:Met, 2:1 v/v), que se añadió de 3 veces (1/3 de volumen de solvente cada vez). Para evitar la acción hidrolítica de las lipasas sobre los lípidos, todo el proceso de extracción se realizó manteniendo los tubos de ensayo en contacto con hielo. Una vez, homogeneizadas se trasvasaron las muestras a otro tubo a través de un filtro de poro 14-18 μm de diámetro (Filter-Lab, Barcelona, España), previamente lavado con Cl:Met, para eliminar los residuos sólidos. Seguidamente, se añadieron 2,5 ml (1/4 del volumen de Cl:Met utilizado) de cloruro potásico (KCl; 0,88% w/v) y se agitó fuertemente en el vortex, de forma que el Cl:Met pudiera extraer las sustancias liposolubles y el KCl aumentar la tensión superficial entre las fases a separar, arrastrando a su vez a la fase acuosa, parte del metanol y la materia

hidrosoluble. Las muestras se centrifugaron a 1500 rotaciones por minuto (rpm) durante 5 minutos en centrífuga y en frío (Beckman Coulter Allegra 25R, IN, USA). Finalizado el periodo de centrifugación, se recuperó la fase inferior liposoluble (donde se encuentran los lípidos disueltos) en un nuevo tubo y se evaporó la misma bajo atmosfera de nitrógeno, ya que los lípidos son fácilmente oxidables por el oxígeno. El extracto seco, se traspasó a un vial de vidrio, previamente pesado e identificado. El solvente fue nuevamente evaporado bajo atmosfera de nitrógeno y colocado en un desecador en oscuridad, para evitar la degradación de los lípidos por la luz, y bajo vacío durante toda la noche para eliminar la presencia de oxígeno y cualquier resto de humedad. Pasado ese tiempo se pesaron de nuevo los viales y por diferencia de pesada se calculó la cantidad de lípido existente. Para el cálculo del porcentaje (%) de lípido de las muestras analizadas, se usó la siguiente formula:

$$\begin{aligned} \text{Lípido total (mg)} &= \text{Peso vial con extracto lipídico (mg)} - \text{Peso vial vacío (mg)} \\ \% \text{Lípido} &= (\text{Lípido total} \times 100) / (\text{Peso de la muestra}) \end{aligned}$$

Por último, los extractos lipídicos se redisolviéron con Cl:Met (2:1 v/v) con 0,01% de butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante, a una concentración de 10 mg/ml y se guardaron en el congelador a -20°C en atmosfera de nitrógeno hasta la realización de los siguientes análisis.

4.2.2. Determinación de la composición de clases lipídicas

La separación de las diferentes clases lipídicas (CL) se realizó por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC, *High Performance Thin Layer Chromatography*) en placas de sílica gel, de 10 cm x 10 cm x 25 mm (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), mediante un doble desarrollo unidireccional (Olsen y Henderson, 1989). Las placas previamente lavadas con dietil éter, se activaron a 110°C en estufa durante 30 minutos, para quemar impurezas y eliminar el exceso de humedad de las placas, y se mantuvieron posteriormente en el desecador hasta su utilización. Con una microjeringa Hamilton de 10 µl, se cargaron las placas con 2-3 µl (20-30 µg) de cada extracto lipídico. En cada placa se cargaron 5 muestras problema y un estándar de composición conocida (extracto lipídico de huevo de bacalao), además se dejó una fracción de placa sin aplicación de muestra, para observación de los frentes de los solventes (casilla control).

Para la separación de los lípidos polares (LP), se utilizó una solución de, metilacetato: isopropanol: cloroformo: metanol: cloruro potásico (5:5:5:2:1,8 v/v). Una vez

desarrollada hasta el punto medio de la placa, se dejó secar bajo campana extractora durante 5 minutos. Para la separación de los lípidos neutros (LN) se utilizó una solución de, hexano: dietil-éter: ácido acético (20:5:0,5 v/v) dejando que se desarrollara hasta la marca situada a 0,5cm del margen superior de la placa. Las placas desarrolladas y secas bajo campana extractora, se tiñeron de forma homogénea con una solución de acetato cúprico al 3% y ácido ortofosfórico al 8% y se colocaron en la estufa a una temperatura de 160°C durante 10-15 minutos aproximadamente, para quemar y revelar las bandas correspondientes a las distintas CL. Finalmente, las muestras se escanearon en el CAMAG TLC visualizer (CAMAG, Muttenz, Suiza) y usando el software informático winCATS, versión 1.4.4, se analizaron las bandas de las distintas CL por densitometría. El procesado de las bandas para obtener la proporción de cada CL se realizó con el software VideoScan, versión 1.02.

4.2.3. Determinación del perfil de ácidos grasos

A través del proceso de transesterificación se obtienen como resultado los ésteres metílicos de los diferentes ácidos grasos presentes en el extracto lipídico. Este proceso hace con que los AG se tornen volátiles, permitiendo su identificación y cuantificación por cromatografía de gases. Para realizar este proceso se utilizó 1 mg de extracto lipídico al que se le añadió 50 µl de estándar interno (en este caso se utilizó el AG, 19:0) y se evaporó el contenido bajo atmosfera de nitrógeno. Posteriormente, se le añadió 1 ml de tolueno al extracto lipídico seco, se agitó fuertemente y se añadieron 2 ml de ácido sulfúrico al 1% en metanol (v/v) y se dejó reaccionado durante 16-18 horas a 50°C y en oscuridad. Una vez ha transcurrido el tiempo, se dejó enfriar el tubo y se le añadieron 2 ml de KHCO_3 al 2% (w/v) y 5 ml de hexano:éter 1:1 (v/v) (con BHT al 0,01%). La mezcla se centrifugó a 1500 RPM durante 5 minutos, periodo tras el cual se recogió la fase superior (fase orgánica) que se pasó a un nuevo tubo. Este mismo proceso se repitió una vez más. Las dos fases superiores (ahora en el mismo tubo) se evaporaron bajo atmosfera de nitrógeno. A las muestras secas se añadió 100 µl de hexano y se procedió a realizar la purificación de los ésteres metílicos. Para ello, se desarrolló una cromatografía de placa fina (TLC, del inglés *thin layer chromatography*), para la cual se preparó una disolución de, hexano:éter: ácido acético (90:10:1, v/v). Las placas se prepararon realizando 5 marcas, cuatro de ellas de 2 cm (donde se cargaron las muestras) y una marca de 1 cm (donde se cargó el estándar externo, en este caso ésteres metílicos de huevo de bacalao), dejando 2 cm de separación entre ellas. Una vez cargada la placa con las 4 muestras, previamente

resuspendidas con 80-100 μ l de hexano y el estándar, estas se colocaron verticalmente en la cubeta y se dejó que se desarrollaran hasta la marca situada a 1 cm del borde superior. Una vez desarrolladas se sacaron las placas de la cubeta y se dejaron secar bajo campana extractora. Una vez bien secas se pulverizaron las placas con iodina (1% yodo en cloroformo), se marcó la zona correspondiente a los ésteres metílicos y se raspó la sílice de la placa, pasando las muestras de manera individualizada a un nuevo tubo donde se le añadieron 10 ml de hexano:éter (2 ml con BHT y 8 sin BHT). Una vez se ha añadido el hexano:éter se llevó a la centrifugadora durante 5 minutos a 1500 rpm, se recogió la fase superior, se pasó a otro tubo limpio y se evaporó totalmente el contenido bajo atmosfera de nitrógeno. Posteriormente, los ésteres metílicos de cada muestra fueron resuspendidos con 1 ml de hexano repartido en 3 veces y se pasaron a un vial pequeño (1,7 ml de capacidad) previamente etiquetado.

Para la determinación del perfil de AG de las muestras analizadas, se realizó finalmente una cromatografía de gases. Para ello, se utilizó el cromatógrafo de gases TRACE GC Ultra (Thermo Scientific) con un inyector on column y un detector FID para la determinación y cuantificación de los ésteres metílicos de ácidos grasos.

4.3. Análisis estadístico

Debido al reducido número de muestras de esperma y ovocitos disponibles en cada fase de experimentación animal (n incluso inferior a 3 en algún caso), se ha evaluado la composición global de cada tipo de gameto y dieta, analizado estadísticamente solamente las diferencias entre dietas. Es decir, en este caso, las diferencias entre fechas de recolección o fase reproductora, no han podido ser consideradas.

Para determinar la existencia de diferencias significativas en la composición en lípido total, perfil de clases lipídicas y ácidos grasos, entre las muestras de esperma u ovocitos de grupos de animales alimentados con las diferentes dietas (dieta control versus dieta experimental), se realizó una prueba-t de muestras independientes. Se evaluaron los valores atípicos por inspección de los diagramas de caja para cada grupo. La normalidad se verificó por medio del test Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas por medio de la prueba de Levene. En los casos donde no se verificó la normalidad, se aplicó el test no paramétrico U de Mann-Whitney. Los resultados obtenidos en este trabajo son expresados como media \pm desviación estándar. A lo largo de todo el estudio se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. Para el análisis estadístico de

este trabajo se utilizó el software IBM SPSS Statistics 25.0 para Windows (SPSS INC., Nueva York, USA).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Composición lipídica de las dietas

La nutrición es un factor determinante para la calidad de los gametos. Por lo tanto, es de vital interés conocer los requerimientos nutricionales de cada especie con el fin de aportar la dieta más adecuada para su éxito reproductivo. En la tabla 2 podemos observar el contenido lipídico de las dos dietas ensayadas y su composición. Ambas dietas presentan un contenido graso similar, observándose cierto incremento de lípidos polares en la dieta experimental, que presenta, a su vez, menos triglicéridos (TAG) y más diglicéridos (DAG) y colesterol, en relación a la dieta control.

Tabla 2. Contenido lipídico (% en peso fresco) y composición de clases lipídicas (% de lípido total) de las Dietas Control y Experimental

	Dieta Control	Dieta Experimental
<i>Lípido total</i>	17,5 ± 0,9	18,3 ± 0,4
<i>Clases Lipídicas</i>		
Esfingomielina	1,5 ± 1,8	1,6 ± 0,7
Fosfatidilcolina	3,9 ± 0,0	4,1 ± 0,4
Fosfatidilserina+Fosfatidilinositol	4,0 ± 1,2	4,6 ± 2,3
Fosfatidilglicerol	1,6 ± 0,5	1,8 ± 0,7
Fosfatidiletanolamina	2,2 ± 0,3	2,4 ± 0,9
Σ Lípidos polares	13,2 ± 1,4	14,5 ± 2,8
Monoglicéridos	1,1 ± 0,5	1,1 ± 0,3
Diglicéridos	4,7 ± 0,2	7,4 ± 0,1
Colesterol	9,7 ± 1,8	12,1 ± 0,9
Ácidos grasos libres	12,7 ± 1,3	12,6 ± 0,4
Triglicéridos	51,6 ± 2,6	45,1 ± 1,4
Ésteres de esterol	7,1 ± 1,1	7,2 ± 2,2
Σ Lípidos neutros	86,8 ± 1,4	85,5 ± 2,8

Los valores son expresados en porcentaje (%) como medias ± desviación estándar (n=2).

Según la empresa IRIDA (comunicación personal), conseguir ingredientes de origen marino ricos en fosfolípidos, en ARA y DHA, para la elaboración de dietas para reproductores de peces, no es fácil y resulta extremadamente caro. A pesar de ello, considerando que la dieta experimental se elaboró con la intención de favorecer la función reproductiva, las diferencias observadas en cuanto a la mayor cantidad de lípidos polares y colesterol y menor contenido de triglicéridos, podrían suponer una ventaja de la dieta

experimental frente al control en este aspecto (Pousis et al., 2019). El colesterol es un compuesto fundamental en las membranas celulares, participando en la integridad estructural de estas frente a las alteraciones ambientales, como los cambios de temperatura y salinidad, ya que variaciones en el contenido de colesterol alteran significativamente la fluidez de las membranas (Yang et al., 2016). Altos niveles de colesterol dan lugar a una membrana más compacta, rígida e impermeable. De manera que, en general, las especies cuyos espermatozoides son más resistentes al shock térmico por bajas temperaturas tienen espermatozoides con una mayor relación colesterol/fosfolípidos que aquellas que son más sensibles (Darin-Bennett y White, 1977). Esta característica es de especial importancia en los gametos ya que va a intervenir directamente en la capacidad de reconocimiento de ambos y en la capacidad del gameto masculino de fecundar al ovocito y de responder funcionalmente al cambio térmico inducido al liberarse los gametos al agua para la fecundación externa. Además, el colesterol es una molécula que tiene una función endocrinológica esencial como precursor de las hormonas esteroideas que intervienen en la reproducción, como el estradiol y la progesterona (Nagahama, 1994). En la trucha arco iris, la calidad del esperma se mejoró utilizando una dieta enriquecida en fosfolípidos (Labbé et al., 1995; Pustowka et al., 2000). Mientras, en *Solea senegalensis*, un mayor contenido de colesterol en la dieta favoreció también la calidad del esperma de esta especie (Cabrita et al., 2010).

Con respecto al perfil de AG de las dietas (Tabla 3), observamos principalmente un menor contenido en MUFAs en la dieta experimental, donde destacan los valores de 20:1n-9 y 22:1n-11, este último ha demostrado ser un buen indicador de la dieta en los depredadores marinos (Cooper et al., 2006). Por otro lado, esta dieta presenta una mayor abundancia de PUFAs, tanto de la serie omega-6 (n-6) como de la serie omega-3 (n-3). Entre estos últimos, destaca la proporción de DHA, que casi duplica la observada en la dieta control. El DHA es considerado un AG esencial, puesto que es imprescindible para el desarrollo gonadal y la calidad de los huevos y larvas (Sargent et al., 2003; Rodríguez-Barreto et al., 2012, 2014; Zupa et al., 2017; Pousis et al., 2019). En base a esto podemos señalar que su abundancia relativa en la dieta experimental podría suponer un punto clave en la función reproductiva de *S. dumerili*. En cuanto al EPA, este aparece más representado en la dieta control, algo que ya fue reportado para otras especies de peces, y en particular para reproductores de medregal, dando pie al presente diseño experimental con la reducción dietaria de este ácido graso a favor de incrementar ARA y DHA (Rodríguez-

Barreto et al., 2012, 2014; Zupa et al., 2017; Pousis et al., 2019). Por último, entre los ácidos grasos de la serie omega-6, el ARA se encuentra también en mayor proporción en la dieta experimental, concordando el conjunto con aspectos ampliamente referenciados en la bibliografía, sobre la relevancia de una adecuada proporción de AG n-3 y n-6, así como de DHA/EPA/ARA (Sargent et al., 2003), lo que podría significar que el consumo de esta dieta experimental aportase unas proporciones de n-3/n-6, DHA/EPA/ARA más equilibradas y, por tanto, favoreciera la adecuada función reproductiva.

Tabla 3. Perfil de ácidos grasos (% ácidos grasos total) de las Dietas Control y Experimental

	Dieta Control	Dieta Experimental
<i>Ácidos grasos</i>		
16:0	19,5 ± 0,2	22,5 ± 0,2
18:0	3,2 ± 0,1	4,6 ± 0,1
Σ SFAs	29,4 ± 0,3	33,0 ± 1,5
16:1n-7	5,4 ± 0,0	4,2 ± 0,0
18:1n-9	17,3 ± 0,2	15,0 ± 0,0
18:1n-7	2,8 ± 0,2	2,8 ± 0,1
20:1n-9	5,0 ± 0,0	2,4 ± 0,0
22:1n-11	7,6 ± 0,0	2,2 ± 0,1
Σ MUFAs	42,7 ± 0,3	30,3 ± 0,3
18:2n-6	5,3 ± 0,1	6,7 ± 0,2
20:4n-6 (ARA)	0,5 ± 0,0	1,2 ± 0,0
22:5n-6	0,0 ± 0,0	1,7 ± 0,0
Σ n-6 PUFA	6,1 ± 0,1	9,8 ± 0,2
18:3n-3	01,6 ± 0,0	1,2 ± 0,0
18:4n-3	2,2 ± 0,1	1,0 ± 0,0
20:5n-3 (EPA)	6,5 ± 0,2	5,8 ± 0,2
22:6n-3 (DHA)	8,7 ± 0,4	16,7 ± 0,3
Σ n-3 PUFA	20,5 ± 0,7	26,2 ± 0,7
Σ PUFAs	27,7 ± 0,8	36,5 ± 0,5
n-3/n-6	3,4 ± 0,1	2,7 ± 0,1
ARA/EPA	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0
DHA/EPA	1,3 ± 0,0	2,9 ± 0,0

Los valores son expresados como medias ± desviación estándar. SFAs, ácidos grasos saturados; MUFAs, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; LC-PUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Σ, los sumatorios incluyen ácidos grasos no presentados en la tabla. Los valores separados por “/” indican relaciones entre ácidos grasos o entre sus sumatorios

5.2. Efecto de la dieta en la composición lipídica del esperma y ovocitos de *S. dumerili*

Los lípidos son los componentes de la dieta de los reproductores que más afectan la composición de los gametos e incluso los factores dietéticos principales que determinan la reproducción exitosa y la supervivencia de la progenie (Izquierdo et al., 2001). En la tabla 4 podemos observar el contenido total y composición de clases lipídicas del esperma y de los ovocitos analizados en función de la dieta suministrada a los reproductores. Como se puede comprobar, no se observó un efecto significativo de la dieta en la composición lipídica de los gametos, salvo una tendencia a un menor contenido graso y una mayor proporción de lípidos polares en los gametos de los ejemplares alimentados con la dieta experimental. Más concretamente, el esperma de ejemplares experimentales parece mostrar una tendencia a la baja en el contenido de TAG, si bien, de nuevo se trata de diferencias no significativas. Esto se puede deber a la elevada variabilidad de los datos, que posiblemente esté relacionado con el hecho de haber agrupado muestras de diferentes fechas y, por tanto, diferentes estadios de maduración, para la realización del análisis estadístico. La decisión de agrupar los datos se tomó basándonos en el reducido número de muestras viables para la realización del análisis lipídico. En este sentido, y para una mejor determinación del efecto de la dieta en los gametos, lo ideal sería repetir el experimento en un futuro, de manera que podamos conseguir un mayor número de muestras que nos permita hacer un estudio estadístico más detallado y preciso, y comparando, distintos momentos reproductivos.

Aunque no sea estadísticamente significativo, debemos destacar el hecho de que la dieta experimental promueva precisamente una mayor proporción de LP (11 puntos porcentuales), sobre todo en el esperma, en comparación con la dieta control, destacando entre estos lípidos el contenido en PC. Se trata de algo que se perseguía en el diseño de la dieta experimental, si bien, parece ser necesarios nuevos ajustes del perfil dietario, o un mayor tiempo de experimentación para observar efectos más significativos en los perfiles.

La PC es una lecitina muy presente en el medio marino, que tiene un elevado contenido en DHA que es importante en las sinapsis y los gametos, donde se requieren eventos de fusión de membranas (Tocher et al., 2008). Entre los LN, destaca la abundancia del colesterol. Como mencionamos previamente, el colesterol es una importante molécula que interviene en la fluidez y la resistencia al estrés osmótico de la membrana celular (Müller, 2008), factores claves en la membrana espermática de peces con reproducción

externa, donde las células se enfrentan a importantes diferencias de temperatura y osmolaridad.

Para las muestras de ovocitos, tampoco se detectaron diferencias significativas entre grupos para ninguna de las clases lipídicas. Sin embargo, se observó una mayor proporción de LN frente a LP más acusada que la observada en el esperma. En el entorno natural, los peces acumulan gran cantidad de reservas lipídicas, principalmente en forma de lípidos neutros tales como los TAG, que se distribuyen principalmente en el hígado y el músculo. Estas reservas son movilizadas y utilizadas como energía metabólica, en especial el lípido neutro, para la maduración de las gónadas y la gametogénesis (Sargent et al, 2003). Además, en las hembras estas reservas también son trasladadas al ovario para el proceso de formación del vitelo (vitelogénesis) (Almansa et al., 2001; Tocher, 2003). De este modo, como se muestra en algunos estudios, durante la temporada de desove se produce un detrimento de las reservas de lípido en músculo e hígado en favor de un aumento del contenido lipídico neutro en el ovario (Henderson et al., 1984; Almansa et al., 2001; Pérez et al., 2007).

Tanto para los individuos alimentados con la dieta control como para los alimentados con la dieta experimental, la PC fue la clase lipídica más representada. Los fosfoglicéridos son la CL que mayor importancia fisiológica tiene y la que más abunda (Turchini et al., 2022). Dentro de este grupo encontramos, entre otros, la PC y la PE que contienen altos niveles de DHA, considerado como el mejor indicador de calidad tanto para esperma como para ovocitos (Sargent et al., 2003). Es tal la importancia de la PC que este fosfolípido forma parte de 2/3 de la fracción lipídica de la vitelogenina (Sargent et al., 2003) y además también es el principal fosfolípido de ovarios maduros y huevos fertilizados (Watanabe y Vasallo-Agius, 2003). Numerosos autores destacan la importancia de PC y PE por su contenido en n-3 LC-PUFA, así como su implicación en las relaciones de EPA/ARA/DHA que son esenciales en el desarrollo de las gónadas y en la calidad de los huevos y el desarrollo y supervivencia larvarias (Fernández-Palacios et al., 1995; Almansa et al., 1999; Rodríguez-Barreto et al., 2012, 2014; Olsen et al., 2014; Li y Olsen, 2015).

Tabla 4. Contenido lipídico (% en peso fresco) y perfil de clases lipídicas (% de lípido total) de esperma y ovocitos de *Seriola dumerili* alimentados con diferentes dietas (Dieta Control vs Dieta Experimental)

	ESPERMA		OVOCITOS	
	Dieta Control	Dieta Experimental	Dieta Control	Dieta Experimental
Lípido total	2,7 ± 1,8	1,6 ± 0,7	2,4 ± 1,4	1,4 ± 0,5
Clases Lipídicas				
Lisofosfatidilcolina	0,3 ± 0,4	0,4 ± 0,5	0,3 ± 0,3	0,7 ± 0,5
Esfingomielina	0,9 ± 0,3	1,2 ± 0,6	1,6 ± 0,8	2,2 ± 1,6
Fosfatidilcolina	15,4 ± 3,0	19,0 ± 2,7	11,6 ± 2,4	11,8 ± 1,9
Fosfatidilserina+ fosfatidilinositol	6,3 ± 3,0	8,7 ± 4,5	3,5 ± 1,7	5,5 ± 1,4
Fosfatidilglicerol	1,7 ± 0,5	3,7 ± 2,2	2,1 ± 0,6	1,9 ± 0,5
Fosfatidiletanolamina	7,2 ± 4,6	9,5 ± 4,4	5,6 ± 2,7	6,2 ± 1,1
Σ Lípidos polares	31,7 ± 11,6	42,5 ± 8,4	25,0 ± 6,4	28,3 ± 2,6
Monoglicéridos	8,1 ± 4,6	6,3 ± 4,3	3,8 ± 1,7	4,3 ± 3,0
Diglicéridos	1,1 ± 0,3	1,5 ± 0,8	1,1 ± 0,3	1,5 ± 0,7
Colesterol	39,1 ± 12,6	38,4 ± 6,1	21,2 ± 5,3	23,2 ± 5,2
Ácidos grasos libres	2,4 ± 1,0	3,4 ± 2,2	2,8 ± 1,4	2,3 ± 1,0
Triglicéridos	12,7 ± 14,8	5,1 ± 4,2	17,4 ± 5,6	20,7 ± 7,5
Ésteres de esteroles	5,0 ± 6,6	2,7 ± 1,4	28,6 ± 8,6	28,3 ± 2,6
Σ Lípidos neutros	68,3 ± 11,6	57,5 ± 8,4	75,0 ± 6,4	71,7 ± 2,6

Los valores son expresados como medias ± desviación estándar. Asterisco (*) representa diferencias significativas entre tratamientos (p<0,05)

En la tabla 5 aparece representado el perfil de ácidos grasos del esperma y de los ovocitos de *S. dumerili* alimentados con diferentes dietas. Como se puede observar existen diferencias significativas al comparar la composición lipídica del esperma entre los tratamientos dietarios. Estas diferencias se observan sobre todo en los MUFAs concretamente en el 20:1n-9 (p = 0,02) y 22:1n-11 (p = 0,02). En ambos casos se observa una menor representación de estos ácidos grasos, cuando los ejemplares son alimentados con la dieta experimental. Considerando que la dieta experimental, presenta en su composición una menor cantidad de estos AG (tabla 3), los resultados obtenidos, ilustran el efecto de la dieta, en el perfil lipídico del esperma. Por otro lado, también se hallaron diferencias significativas en el contenido de 22:5n-6 (p = 0,04) entre tratamientos, siendo este superior en el esperma de los individuos alimentados con la dieta experimental que aportaba mayor proporción de este ácido graso. Una vez más, podemos observar el efecto de la dieta sobre el esperma. Aunque no se observaron diferencias significativas en los valores de EPA, ARA o DHA, sí que se observan diferencias en sus coeficientes (ARA/EPA (p = 0,003) y DHA/EPA (p = 0,02), que son superiores en condiciones

experimentales. La ausencia de diferencias significativas a nivel individualizado podría estar condicionada por los elevados valores de desviación estándar registrados.

En relación con el efecto de la dieta en los **ovocitos**, se puede observar un mayor número de diferencias significativas entre los dos grupos de estudio. Estos datos parecen indicar, un mayor efecto o un efecto más directo de la dieta, en el perfil lipídico de los ovocitos, que finalmente podrán influir en aspectos muy importantes como el tiempo para la primera madurez, la fecundidad, el tamaño y la calidad de los huevos, la eclosión y la supervivencia larvaria (Schreck, 2010).

Los ácidos grasos 16:0, 18:0, 18:1n-9 y el 20:1n-9 son consumidos en gran cantidad durante el crecimiento y especialmente durante la maduración gonadal y la ovogénesis en hembras por su importante aporte energético a través de la beta oxidación (Henderson et al., 1984; Henderson y Almatar, 1989). En este sentido, altas concentraciones de éstos AG pueden indicar un estadio de gametogénesis avanzado. En el presente estudio, el contenido en SFA fue similar entre tratamientos, mientras el contenido en MUFA fue superior en los ovocitos del tratamiento control. Estos resultados, parecen estar ligados a la composición de la dieta, ya que la dieta experimental, fue la que presentó un menor aporte de MUFAs. Sin embargo, los efectos de esta bajada en los niveles de MUFAs (aunque compensada con el aumento del contenido en PUFAs) en la reproducción del medregal, están aún por determinar, ya que durante el periodo experimental no fue posible obtener una liberación espontánea de gametos, ni la obtención de huevos fecundados y larvas de los ejemplares F1 estudiados, factor que nos permitiría un estudio más profundo de las necesidades nutricionales de la especie durante esta fase.

Existen numerosos estudios que demuestran que ARA, EPA y DHA, particularmente ARA y DHA, tienen una gran implicación en el desarrollo de una buena función reproductiva, interviniendo en la gametogénesis y el desarrollo embrionario y en los estadios tempranos del desarrollo larvario. Este hecho se debe a que, además de intervenir en la producción de cambios conformacionales de las membranas asociados a eventos de fusión (espermato-óvulo, motilidad de espermato, sinapsis neuronales, entorno fosfolipídico de transportadores de membrana, etc.), también tienen un importante papel en la formación de las gónadas, huevos, y espermato (Glencross et al., 2009; Rodríguez-Barreto et al., 2014; Zupa et al., 2017).

En el presente estudio cabe destacar el contenido en ARA ($p = 0,03$) en los ovocitos de hembras alimentadas con la dieta experimental. El ARA es una AG que suele ser con

frecuencia infravalorado en las dietas de peces cautivos, generando desbalances importantes entre este y el EPA. El ARA y el EPA, son los principales precursores de los eicosanoides, moléculas que juegan un papel crítico en muchos procesos fisiológicos como la reproducción, la respuesta inmune, la inflamación o la osmoregulación (Bell y Sargent, 2003). Ambos AG, interfieren competitivamente en la producción de estas moléculas bioactivas. Los eicosanoides derivados del EPA presentan una menor actividad biológica y un espectro de acción distinto de aquellos producidos a partir del ARA. No obstante, el ARA adquiere una particular relevancia en el proceso reproductivo, mostrando jugar un papel esencial en la estereidogénesis y en la maduración del oocito de diversas especies de peces (Sorbera et al., 2001; Stocco et al., 2005; Henrotte et al., 2011).

El EPA y el DHA por su lado, regulan la producción de eicosanoides y docosanoides, incluyendo prostaglandinas, que toman parte de diversos procesos reproductivos, incluida la producción de esteroides y en el desarrollo gonadal, como la ovulación y pueden actuar como feromonas importantes que estimulan la conducta sexual y sincronizan a ambos sexos en el desove y por lo tanto influyen directamente sobre la fertilización (Larsen et al., 1997). En el presente estudio y similar a lo ocurrido con los demás AG, se observó un efecto directo de la dieta en la cantidad de EPA y DHA presente en los ovocitos de medregal, aumentando el DHA frente al EPA en los ovocitos experimentales. Estas diferencias son además observadas en las ratios n-3/n-6 ($p = 0,04$), ARA/EPA ($p = 0,002$) y DHA/EPA ($p = 0,001$). Los valores de ARA/EPA y DHA/EPA, superiores en el tratamiento experimental, podrían indicar una mejora en la composición lipídica de los reproductores alimentados con esta dieta, puesto que se ha visto que una mayor ratio favorece que los huevos tengan un perfil lipídico más equilibrado (Sargent et al., 2003), por otro lado, supone también un perfil que se acerca más al de las gónadas de individuos salvajes de esta especie (Zupa et al., 2017; Pousis et al., 2019), si bien, como se indicó anteriormente, no fue posible en este estudio, comprobar si estos cambios indujeron una mejora en la función reproductiva del medregal.

Tabla 5. Perfil de ácidos grasos (% de ácidos grasos totales) de esperma y ovocitos de *Seriola dumerili* alimentados con diferentes dietas (Dieta Control vs Dieta Experimental)

	ESPERMA		OVOCITOS	
	Dieta Control	Dieta Experimental	Dieta Control	Dieta Experimental
Ácidos grasos				
16:0	29,9 ± 8,8	31,0 ± 7,5	18,6 ± 1,9	19,3 ± 1,8
18:0	7,0 ± 1,6	8,1 ± 2,0	5,0 ± 1,5	5,3 ± 1,0
20:0	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,1
Σ SFAs	39,6 ± 8,0	42,1 ± 9,0	26,3 ± 3,0	26,7 ± 3,1
16:1n-7	2,5 ± 1,5	1,4 ± 1,1	2,9 ± 1,3	1,6 ± 0,4*
18:1n-9	18,9 ± 3,9	18,0 ± 3,6	18,2 ± 3,2	14,5 ± 1,0*
18:1n-7	2,5 ± 0,7	2,2 ± 0,9	3,8 ± 0,4	3,9 ± 0,5
20:1n-9	2,0 ± 0,8	1,0 ± 0,3*	1,7 ± 0,3	1,0 ± 0,1*
22:1n-11	1,5 ± 0,7	0,6 ± 0,2*	1,1 ± 0,2	0,5 ± 0,1*
24:1n-9	1,2 ± 0,2	0,6 ± 0,6	1,1 ± 0,8	1,0 ± 0,7
Σ MUFAs	31,3 ± 6,7	26,7 ± 7,8	31,1 ± 4,9	23,8 ± 1,6*
18:2n-6	4,2 ± 1,6	4,5 ± 0,3	6,9 ± 1,7	6,2 ± 0,8
20:2n-6	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1
20:4n-6 (ARA)	2,5 ± 1,3	3,4 ± 1,4	3,6 ± 2,1	5,9 ± 1,4*
22:5n-6	0,5 ± 0,2	1,7 ± 0,9*	0,6 ± 0,1	2,7 ± 0,5*
Σ n-6 PUFA	7,7 ± 1,3	10,1 ± 2,2	11,4 ± 1,1	15,3 ± 1,1*
18:3n-3	0,5 ± 0,4	0,4 ± 0,3	1,0 ± 0,4	0,5 ± 0,2
18:4n-3	0,3 ± 0,4	0,0 ± 0,1	0,6 ± 0,4	0,2 ± 0,1*
20:4n-3	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,0*
20:5n-3 (EPA)	3,8 ± 2,1	2,8 ± 1,6	5,4 ± 0,7	3,2 ± 0,7*
22:5n-3	1,2 ± 0,6	1,0 ± 0,6	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,1
22:6n-3 (DHA)	14,0 ± 8,9	15,5 ± 11,3	18,3 ± 1,9	23,7 ± 4,6*
Σ n-3 PUFA	20,2 ± 12,4	19,8 ± 13,8	27,6 ± 3,0	29,7 ± 5,3
Σ n-3 LC-PUFA	19,3 ± 12,4	19,4 ± 13,6	25,9 ± 2,6	29,0 ± 5,1
UK	0,4 ± 0,3	0,4 ± 0,2	0,2 ± 0,3	0,1 ± 0,2
Σ DMAs	0,6 ± 0,8	0,5 ± 0,3	2,7 ± 2,2	3,5 ± 1,2
Σ PUFAs	28,2 ± 13,7	30,3 ± 15,7	39,7 ± 3,0	45,9 ± 5,5*
n-3/n-6	2,6 ± 1,2	1,8 ± 0,9	2,4 ± 0,4	2,0 ± 0,4*
ARA/EPA	0,7 ± 0,2	1,4 ± 0,3*	0,7 ± 0,4	2,0 ± 0,6*
DHA/EPA	3,5 ± 0,4	5,2 ± 1,0*	3,4 ± 0,2	7,5 ± 1,1*

Los valores son expresados como medias ± desviación estándar. Asterisco (*) representa diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$); SFAs, ácidos grasos saturados; MUFAs, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; LC-PUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. En los sumatorios (Σ) se incluyen ácidos grasos no presentados en la tabla. Los valores separados por “/” indican relaciones entre ácidos grasos o entre sus sumatorios.

6. CONCLUSIONES - CONCLUSIONS

- No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las clases lipídicas del esperma y ovocitos de los individuos alimentados con la dieta control en comparación con los alimentados con la dieta experimental, si bien, ciertas tendencias al alza de los lípidos polares en los gametos experimentales podrían tal vez, haberse visto reflejadas de forma significativa a más largo plazo, favoreciendo la función reproductiva de los ejemplares, de acuerdo a la bibliografía disponible para esta y otras especies de peces.
- Los cambios dietarios sí se vieron reflejados en el perfil de ácidos grasos del esperma. Así, se observaron diferencias significativas al comparar el 20:1n-9 y el 22:1n-11, que fueron más abundantes en las muestras de machos alimentados con dieta experimental. Además, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el nivel de 22:5n-6 y las proporciones de ARA/EPA y DHA/EPA, mostrando valores mayores para el esperma de los machos alimentados con dieta experimental en comparación con los alimentados con dieta control. Estas relaciones entre ARA/EPA y DHA/EPA, se asemejan más a las de las gónadas de individuos salvajes.
- Los cambios dietarios se vieron aún más reflejados en el perfil de ácidos grasos de los ovocitos. Se observaron diferencias significativas en los niveles de 16:1n-7, 18:1n-9, 20:1n-9, 22:1n-11 y el EPA que fueron más abundantes en las muestras de ovocitos procedentes de hembras alimentadas con dieta control. Por otro lado, el ARA y el DHA mostraron un mayor porcentaje en las muestras de ovocitos procedentes de hembras alimentadas con dieta experimental lo que dio lugar también a diferencias estadísticamente significativas en las proporciones de ARA/EPA y DHA/EPA, mostrando valores mayores para las muestras de las hembras del grupo de dieta experimental en comparación con las alimentadas con dieta control. Estas relaciones entre ARA/EPA y DHA/EPA, se asemejan más a las de las gónadas de individuos salvajes.
- En base a los resultados obtenidos se puede concluir que la dieta afecta a la composición de AG de los gametos de ambos sexos. Los cambios inducidos por la dieta experimental aproximan más el perfil de ácidos grasos de los gametos al descrito para las gónadas en estado reproductivo de individuos salvajes. En futuros estudios cabría determinar si esto

se traduce en un mayor éxito reproductivo, ya que en este trabajo no fue posible valorar los resultados de la calidad de puesta.

- La alta heterogeneidad en los resultados obtenidos en las muestras de esperma y ovocitos analizadas, probablemente debida al limitado número de muestras y variaciones en la época de recogida, debe tenerse en cuenta como una limitación del presente estudio.

- No statistically significant differences were found in the lipid classes of sperm and oocytes of individuals fed the control diet compared to those fed the experimental diet, although certain upward trends in polar lipids in the experimental gametes may have been significantly reflected in the longer term, favoring the reproductive function of the specimens, according to the literature available for this and other fish species.

- Dietary changes were reflected in the sperm fatty acid profile. Thus, significant differences were observed when comparing 20:1n-9 and 22:1n-11, which were more abundant in the samples of males fed the experimental diet. In addition, statistically significant differences were observed in the level of 22:5n-6 and the ratios of ARA/EPA and DHA/EPA, showing higher values for sperm from males fed experimental diet compared to those fed control diet. These ARA/EPA and DHA/EPA ratios more closely resembled those of gonads from wild-type individuals.

- Dietary changes were further reflected in the oocyte fatty acid profile. Significant differences were observed in the levels of 16:1n-7, 18:1n-9, 20:1n-9, 22:1n-11 and EPA which were more abundant in oocyte samples from females fed control diet. On the other hand, ARA and DHA showed a higher percentage in oocyte samples from females fed experimental diet which also resulted in statistically significant differences in ARA/EPA and DHA/EPA ratios, showing higher values for samples from females in the experimental diet group compared to those fed control diet. These ARA/EPA and DHA/EPA ratios are more similar to those of the gonads of wild individuals.

- Based on the results obtained, it can be concluded that diet affects the GA composition of gametes of both sexes. The changes induced by the experimental diet bring the fatty acid profile of the gametes closer to that described for the reproductive gonads of wild individuals. Future studies should determine whether this translates into greater

reproductive success, since in this work it was not possible to assess the results of clutch quality.

- The high heterogeneity in the results obtained in the sperm and oocyte samples analyzed, probably due to the limited number of samples and variations in the time of collection, should be taken into account as a limitation of the present study.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Almansa, E., Martián, M. V., Cejas, J. R., Badi, P., Jerez, S., & Lorenzo, A. (2001). Lipid and fatty acid composition of female gilthead seabream during their reproductive cycle: effects of a diet lacking n-3 HUFA. *Journal of fish biology*, 59(2), 267-286.
- Asociación del sector de la Pesca Recreativa en Canarias (s/f). *Tallas mínimas autorizadas para el Caladero Canario*. <https://proyepesca.es/tallas-minimas-canarias/peces-oseos/>
- Bauchot, M. L. (1987). Poissons osseux. *Fiches FAO d'identification pour les besoins de la pêche.(rev. 1). Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche*, 37, 891-1421.
- Bell, J. G., & Sargent, J. R. (2003). Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture*, 218(1-4), 491-499.
- Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez-Páramo, S., Robles, V., Beirão, J., Pérez-Cerezales, S., & Herráez, M. P. (2010). Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(5), 623-635.
- Christie, W. W., & Han, X. (2012). Analysis of simple lipid classes. *Lipid Analysis, 4th ed.*; Christie, WW, Han, X., Eds, 69-90.
- Cooper, M. H., Iverson, S. J., & Rouvinen-Watt, K. (2006). Metabolism of dietary cetoleic acid (22: 1n-11) in mink (*Mustela vison*) and gray seals (*Halichoerus grypus*) studied using radiolabeled fatty acids. *Physiological and Biochemical Zoology*, 79(4), 820-829.
- Darin-Bennett, A., & White, I. G. (1977). Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, 14(4), 466-470.
- Del Rosario, A. y del Rosario, F. (2015) Familia Carangidae. *Guía de la fauna marina de Canarias*, pp. 71-79.
- Diversify (s/f). *Ae 2015 Rotterdam special session diversify*. <http://www.diversifyfish.eu/greater-amberjack-seriola-dumerili.html>
- Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M. S., Robaina, L., Valencia, A., Salhi, M., & Vergara, J. (1995). Effect of n- 3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 132(3-4), 325-337.

- Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M., Robaina, L., Valencia, A., Salhi, M., & Montero, D. (1997). The effect of dietary protein and lipid from squid and fish meals on egg quality of broodstock for gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, *148*(2–3), 233–246.
- Fischer, W., Bianchi, G., & Scott, W. B. (1981). FAO species identification sheets for fishery purposes. Eastern Central Atlantic: fishing area 34 and part of 47. Volumes I-VII.
- Fischer, W. (1987). Fiches FAO d'identification des especes pour les besoins de la peche.(Rev 1). Mediterranee et mer Noire. Zone de Peche 37. *Vertebres*, *2*.
- Food and Agriculture Organization (2020). *Fisheries and Aquaculture*. <https://www.fao.org/fishery/en/aquaculture>
- Glencross, B. D. (2009). Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Aquaculture*, *1*(2), 71–124.
- Henrotte, E., Milla, S., Mandiki, S. N. M., & Kestemont, P. (2011). Arachidonic acid induces production of 17, 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) via a putative PGE2 receptor in fish follicles from the Eurasian perch. *Lipids*, *46*(2), 179-187.
- Henderson, R. J., Sargent, J. R., & Hopkins, C. C. E. (1984). Changes in the content and fatty acid composition of lipid in an isolated population of the capelin *Mallotus villosus* during sexual maturation and spawning. *Marine Biology*, *78*(3), 255-263.
- Henderson, R. J., & Almatar, S. M. (1989). Seasonal changes in the lipid composition of herring (*Clupea harengus*) in relation to gonad maturation. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *69*(2), 323-334.
- Izquierdo, M. S., Fernández-Palacios, H., & Tacon, A. G. J. (2001). Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, *197*(1–4), 25–42..
- James, M. J., Gibson, R. A., & Cleland, L. G. (2000). Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *The American journal of clinical nutrition*, *71*(1 Suppl), 343S–8S.
- Jerez, S., Fakriadis, I., Papadaki, M., Martín, M. V., Cejas, J. R., & Mylonas, C. C. (2018). Spawning induction of first-generation (F1) greater amberjack *Seriola dumerili* in the Canary islands, Spain using GNRHA delivery systems. *Fishes*, *3*(3).
- Kumar, V., Sinha, A. K., Romano, N., Allen, K. M., Bowman, B. A., Thompson, K. R., & Tidwell, J. H. (2018). Metabolism and nutritive role of cholesterol in the growth, gonadal development, and reproduction of crustaceans. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, *26*(2), 254-273.

- Labbé, C., Maise, G., Müller, K., Zachowski, A., Kaushik, S., & Loir, M. (1995). Thermal acclimation and dietary lipids alter the composition, but not fluidity, of trout sperm plasma membrane. *Lipids*, 30(1), 23-33.
- Larsen, L. N., Hørvik, K., Sørensen, H. I. N., & Bremer, J. (1997). Polyunsaturated thia- and oxa-fatty acids: incorporation into cell-lipids and their effects on arachidonic acid-and eicosanoid synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1348(3), 346-354.
- Li, K., & Olsen, Y. (2015). Effect of enrichment time and dietary DHA and non-highly unsaturated fatty acid composition on the efficiency of DHA enrichment in phospholipid of rotifer (*Brachionus Cayman*). *Aquaculture*, 446, 310-317.
- Mañanós, E., Duncan, N., y Mylonas, C. (2008). Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. *Methods in reproductive aquaculture: Marine and freshwater species*, 3-80.
- Müller, K., Müller, P., Pincemy, G., Kurz, A., & Labbe, C. (2008). Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 78(3), 390-399.
- Mylonas, C. C., Papandroulakis, N., Smboukis, A., Papadaki, M., & Divanach, P. (2004). Induction of spawning of cultured greater amberjack (*Seriola dumerili*) using GnRH α implants. *Aquaculture*, 237(1-4), 141-154.
- Mylonas, C. C., Fostier, A., & Zanuy, S. (2010). Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 516-534.
- Nagahama, Y., 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *International Journal of Developmental Biology*, 38, 217-217.
- Olsen, Y., Evjemo, J. O., Kjørsvik, E., Larssen, H., Li, K., Overrein, I., & Rainuzzo, J. (2014). DHA content in dietary phospholipids affects DHA content in phospholipids of cod larvae and larval performance. *Aquaculture*, 428, 203-214.
- Organización de Naciones Unidas (2019). *Desafíos globales: Población*. <https://www.un.org/es/global-issues/population>
- Pérez, M. J., Rodríguez, C., Cejas, J. R., Martín, M. V., Jerez, S., & Lorenzo, A. (2007). Lipid and fatty acid content in wild white seabream (*Diplodus sargus*) broodstock at different stages of the reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 146(2), 187-196

- Pousis, C., Rodríguez, C., De Ruvo, P., De Virgilio, C, Pérez, J.A., Mylonas, C., Zupà, R., Passantino, L., Santamaria, N., Valentini, L. & Corriero, A. (2019). Vitellogenin receptor and fatty acid profiles of individual lipid classes of oocytes from wild and captive-reared greater amberjack (*Seriola dumerili*) during the reproductive cycle. *Theriogenology*, *140*, 73-83.
- Pustowka, C., McNiven, M. A., Richardson, G. F., & Lall, S. P. (2000). Source of dietary lipid affects sperm plasma membrane integrity and fertility in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) after cryopreservation. *Aquaculture Research*, *31*(3), 297-305.
- Rodríguez-Barreto, D., Jerez, S., Cejas, J. R., Martin, M. V., Acosta, N. G., Bolaños, A., & Lorenzo, A. (2012). Comparative study of lipid and fatty acid composition in different tissues of wild and cultured female broodstock of greater amberjack (*Seriola dumerili*). *Aquaculture*, *360–361*, 1–9.
- Rodríguez-Barreto, D., Jerez, S., Cejas, J. R., Martin, M. V., Acosta, N. G., Bolaños, A., & Lorenzo, A. (2014). Ovary and egg fatty acid composition of greater amberjack broodstock (*Seriola dumerili*) fed different dietary fatty acids profiles. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *116*(5), 584–595.
- Sanz, F. (2009). La nutrición y alimentación en piscicultura. Catalogo general de publicaciones oficiales: Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura, pp.151. Madrid. España.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., & Bell, J. G. (2003). Chapter 4 - The lipids en Halver, J. E., Hardy, R. W. (Ed.), *Fish Nutrition* (Third Edition, pp. 181-257). Academic Press.
- Schreck, C. B. (2010). Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology*, *165*(3), 549–556.
- Sorbera, L.A., Asturiano, J.F., Carrillo, M. and Zanuy, S. (2001). Effects of polyunsaturated fatty acids and prostaglandins on oocyte maturation in a marine teleost, the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biology-of-Reproduction*, *64*: 382-389.
- Stocco, D. M., Wang, X., Jo, Y., & Manna, P. R. (2005). Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Molecular endocrinology*, *19*(11), 2647-2659.
- Tocher, D. R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in fisheries science*, *11*(2), 107-184.

- Tocher, D. R., Bendiksen, E. Å., Campbell, P. J., & Bell, J. G. (2008). The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*, 280,(1-4), 21-34.
- Turchini, G.M., Francis, D. S., Zhen-Yu Du, Olsen, R. E., Ringø, E., Tocher, D. R. (2022). Chapter 5 - The lipids en Hardy, R. W. y Kaushik, S. J Editor (Ed.), *Fish Nutrition* (Fourth Edition, pp. 303-467). Academic Press.
- Turchini, G. M., Ng, W. K., & Tocher, D. R. (2010). *Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds*. CRC Press.
- United Nations Population Fund (2022). *World Population Dashboard*. <https://www.unfpa.org/data/world-population-dashboard>
- Wall, R., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2010). Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition reviews*, 68(5), 280-289.
- Watanabe, T. (1990). Effect of broodstock diets on reproduction of fish. *Advances in Tropical Aquaculture*, 542.
- Watanabe, T., & Vassallo-Agius, R. (2003). Broodstock nutrition research on marine finfish in Japan. *Aquaculture*, 227(1-4), 35-61.
- Yang, S. T., Kreutzberger, A. J., Lee, J., Kiessling, V., & Tamm, L. K. (2016). The role of cholesterol in membrane fusion. *Chemistry and physics of lipids*, 199, 136-143.
- Zohar, Y., & Mylonas, C. C. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: From hormones to genes. *Aquaculture*, 197(1-4), 99-136.
- Zupa, R., Rodríguez, C., Mylonas, C. C., Rosenfeld, H., Fakriadis, I., Papadaki, M., et al. (2017). Comparative study of reproductive development in wild and captive-reared greater amberjack *seriola dumerili* (Risso, 1810). *PLoS ONE*, 12(1).

AGRADECIMIENTOS:

Me gustaría comenzar este párrafo agradeciendo a todas las personas del laboratorio de Fisiología Animal por su ayuda en todo momento, por estar para todo lo que necesitara y por hacerme sentir uno más a pesar de ser un alumno que estaba de paso. En concreto me gustaría agradecer a mi tutoras, Covadonga y Diana, por su infinita paciencia y dedicación en este trabajo, que no podría haber salido adelante sin ellas.

También quiero agradecer a mi familia y amigos por aguantarme durante toda la realización de este trabajo y en especial, a Noelia por estar en todo momento, enseñarme a no centrarme en las cosas negativas y levantarme cada vez que me venía abajo. A mis padres por acompañarme durante todos estos años de carrera (que no han sido pocos) y no rendirse conmigo, gracias. Por último, pero no menos importante, muchas gracias tanto a Elena como a Miguel por empujarme a seguir cuando quería dejarlo y por su inestimable ayuda. Muchas gracias.