



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL

# Regulación temporal y sensorial de la ingesta en la dorada (*Sparus aurata*)

---

SARA PUCHOL SORIANO

---

Dirigido por  
Dra. Esther Leal Cebrián  
Dr. José Miguel Cerdá Reverter

Diciembre, 2021

# TESIS DOCTORAL



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

## **Regulación temporal y sensorial de la ingesta en la dorada (*Sparus aurata*)**

Memoria para optar al grado de Doctor por la Universitat  
Politècnica de València presentada por Sara Puchol Soriano

Directores

Dra. Esther Leal Cebrián

Dr. José Miguel Cerdá Reverter



**IATS**  
INSTITUTO DE ACUICULTURA TORRE DE LA SAL



**CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



El Dr. José Miguel Cerdá Reverter y la Dra. Esther Leal Cebrián, investigador e investigadora contratada, respectivamente, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS) informan que: El presente trabajo titulado “Regulación temporal y sensorial de la ingesta en la dorada (*Sparus aurata*)” presentado por Dña. Sara Puchol Soriano, licenciada en Biología por la Universidad de Valencia, para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia; ha sido realizado bajo su dirección y que, una vez revisado y comprobado, consideran que reúne los requisitos necesarios para su presentación. Para que así conste firman la presente

Dra. Esther Leal Cebrián

Dr. José Miguel Cerdá Reverter



La presente Tesis Doctoral, llevada a cabo en el Departamento de Fisiología de Peces y Biotecnología del Instituto de Acuicultura Torre de la Sal (IATS) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), se realizó bajo el marco de la colaboración mantenido entre el grupo de “Control de Ingesta” del citado Instituto y liderado por el Dr. Cerdá Reverter, y la empresa LUCTA S.A cuyo responsable científico ha sido la Dra. Sofía Morais. Esta colaboración se ha materializado en el marco tres contratos de apoyo tecnológico titulados:

- 1. Evaluación de aditivos sensoriales y sus efectos sobre la ingesta de peces teleósteos*
- 2. Caracterización de saborizantes de interés para la acuicultura de peces*
- 3. Receptores gustativos en la dorada: caracterización funcional*

Por su implicación con la estructura de I+D empresarial que conlleva una confidencialidad en los productos utilizados y en los resultados obtenidos, la tesis se acoge a la modalidad Tesis Industrial de la Universidad Politécnica de Valencia.



# AGRADECIMIENTOS





Tras años estudiando, fue cuando entré en el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, a realizar prácticas de verano, cuando descubrí el mundo de la investigación.

Primero quiero agradecer a mis chicas, Alicia, Sol, Amparo, Lucinda y Elisa, las risas y el apoyo que siempre me han dado. El IATS me ha regalado a personas únicas. No podría haber hecho mis experimentos sin la valiosa ayuda del servicio de animalario. Conrado, Chimo y José Ramón, gracias por vuestra ayuda en los interminables muestreos, el aprendizaje sobre los peces y las charlas sobre la vida.

Es muy alentador encontrar a personas que hagan posibles que la infraestructura de mis experimentos funcione, gracias Toni y Paco, sin vosotros no lo habría logrado. Tuve la gran suerte de conocer a Karol y Beatriz, dos mujeres increíbles, que me ayudaron siempre que lo necesité y con las que compartí grandes momentos.

Durante mi tesis me ha acompañado gente maravillosa, que me ayudaron y me enseñaron muchísimo. Siempre os estaré agradecida: mis galleguiñas (Paula y Cris), Raúl y Sandra.

Gracias a María, Elisa y Rita, tres extraordinarias mujeres y científicas, que me han enseñado con mucha paciencia y amor como desenvolverse en el laboratorio.

Muchas gracias a José Miguel, mi co-director de tesis, siempre dispuesto a enseñar y a ayudar. Gracias por darme la oportunidad

de formar parte de tu equipo de investigación y poder hacer el doctorado.

Muchas gracias a Esther, mi co-directora de tesis, quien me ha ayudado enormemente siendo ese soplo de aire fresco que te da fuerzas.

Muchas gracias a LUCTA S.A. por la confianza depositada en mí. Las últimas frases son para mi familia, que siempre han estado ahí, dándome su calor y apoyo. A mis sobrinas, Vera y Adriana, que una sola sonrisa hacen que todo sea fácil. Yaya, tus ojos siempre me regalaron orgullo y amor.

Gracias a mis padres, por su constante apoyo. Ellos son un modelo a seguir, unos luchadores. Me siento muy orgullosa de ser vuestra hija. Infinitamente gracias.

Gracias a Rubén, ese apoyo incondicional que me brindas, no sólo en la tesis, sino en la vida. Eres la fuerza que me empuja. Siempre tus palabras de ánimo, tu risa y tu manera de ver la vida, me han hecho avanzar. Mis “Peñagolosos”, gracias por estar en mi vida.

Finalmente, quisiera hacer una mención especial a Jesús Rosel, quien me enseñó, con mucha paciencia y perseverancia la importancia de un buen análisis estadístico, haciéndome entender que la estadística no era mi enemiga. Gracias por esas interminables horas analizando los datos de la tesis, aprendiendo y, por raro que suene, disfrutando de la estadística.



**RESUMEN**  
**RESUM**  
**ABSTRACT**



## RESUMEN

La acuicultura es una de las principales actividades en el ámbito de la producción animal. Su progreso está delimitado por la dependencia de materias primas de origen tanto marino como terrestre, ambas necesarias para la elaboración de piensos destinados a la alimentación de las especies en cultivo. La introducción de nuevas materias primas o sustancias destinadas a la mejora de la fisiología de la especie (piensos funcionales) puede comprometer la palatabilidad de los piensos, su consumo y por extensión el crecimiento de los animales. El objetivo principal de esta tesis fue encontrar aditivos sensoriales (saborizantes) que puedan superar los efectos negativos sobre la palatabilidad de los piensos inducidos por la inclusión de materias vegetales en la elaboración de los piensos para cultivo de la dorada (*Sparus aurata*). Para ello, evaluamos la funcionalidad de los sistemas de auto-demanda en el estudio del comportamiento alimenticio de esta especie, profundizando en su posible utilidad en la discriminación sensorial/gustativa de los piensos. Evaluamos el efecto de estrógenos y andrógenos no aromatizables sobre la ingesta como posibles factores anti-nutricionales presentes en los piensos de sustitución. Estudiamos el efecto de dos saborizantes sobre la ingesta y dinámica de crecimiento de la dorada y finalmente estudiamos el posible efecto de estos sobre la anorexia inducida por el estrés. Los resultados demuestran que la dorada se adapta bien a los sistemas de auto-demanda y estos pueden ser utilizados para el estudio de su comportamiento alimenticio. Utilizando estos sistemas hemos demostrado que la dorada puede discriminar entre diferentes piensos en función de la presencia de elementos fuertemente amargos o de elementos saborizantes que pueden además ayudar a superar los efectos negativos del estrés sobre la ingesta. Finalmente, demostramos que esta especie es especialmente sensible a la presencia de estrógenos o

andrògenos no aromatizables en la composición del pienso sugiriendo que los elementos estrogénicos o androgénicos pueden actuar como elementos anti-nutricionales.

## **RESUM**

L'aqüicultura és una de les principals activitats en l'àmbit de la producció animal. El seu progrés està delimitat per la dependència de matèries primeres d'origen tant marí com terrestre, totes dues necessàries per a l'elaboració de pinsos destinats a l'alimentació de les espècies en cultiu. La introducció de noves matèries primeres o substàncies destinades a la millora de la fisiologia de l'espècie (pinsos funcionals) pot comprometre la palatabilitat dels pinsos, el seu consum i per extensió el creixement dels animals. L'objectiu principal d'aquesta tesi va ser trobar additius sensorials (saboritzants) que puguen sobrepassar els efectes negatius sobre la palatabilitat dels pinsos induïts per la inclusió de matèries vegetals en l'elaboració dels pinsos per a cultiu de l'orada (*Sparus aurata*). Per això, avaluem la funcionalitat dels sistemes d'auto-demanda en l'estudi del comportament alimentari d'aquesta espècie, aprofundint en la seua possible utilitat en la discriminació sensorial/gustativa dels pinsos. Avaluem l'efecte d'estrògens i andrògens no aromatizables sobre la ingesta com a possibles factors anti-nutricionals presents en els pinsos de substitució. Estudiem l'efecte de dos saboritzants sobre la ingesta i dinàmica de creixement de l'orada i finalment estudiem el possible efecte d'aquests sobre l'anorèxia induïda per l'estrés. Els resultats demostren que l'orada s'adapta bé als sistemes d'auto-demanda i aquests poden ser utilitzats per a l'estudi del seu comportament alimentari. Utilitzant aquests sistemes hem demostrat que l'orada pot discriminar entre diferents pinsos en funció de la presència



d'elements fortament amargs o d'elements saboritzants que poden a més ajudar a sobrepassar els efectes negatius de l'estrés sobre la ingesta. Finalment, vam demostrar que aquesta espècie és especialment sensible a la presència d'estrògens o andrògens no aromatitzables en la composició del pinso suggerint que els elements estrogènics o androgènics poden actuar com a elements anti-nutricionals.

## **ABSTRACT**

Aquaculture is one of the main activities within the animal production. Its progress is constricted by the dependency raw materials with marine and terrestrial origin both critical for the production of feed diets for cultured species. The incorporation of new raw materials or functional substances driven to the improvement of animal physiology (functional feed) can compromise the palatability of diets, consumption and by extension animal growth. The main issue of this thesis was to find sensorial enhancers that can overcome the negative effects on diet palatability induced by the inclusion of vegetal rows in the elaboration of feed for seabream culture (*Sparus aurata*). To that end we test the functionality of self-feeding systems in the study of feeding behaviour of this species deepening in the study of sensory/gustatory feed discrimination. We also evaluate the effect of both oestrogens and no-aromatized androgen on food intake as potential anti-nutritionals included in the substitution diets. In addition, we studied the effect of flavourings on seabream feeding behaviour and growth performance and finally we studied the potential effect on stress-induced anorexia. Results demonstrated that seabream adapts perfectly to self-feeding systems that can be used for the study its feeding behaviour. Using self-feeding

systems, we have also demonstrated that seabream can discriminate between different diets by association to potent sour deterrents of flavourings that can help to overcome the negative effects of stress on feeding behaviour. Finally, we demonstrate that seabream is especially sensible to the presence of oestrogen or androgens in the diet compositing suggesting its potential role as anti-nutritional elements.



# ÍNDICE



<b>Introducción general .....</b>	<b>1</b>
1.1. Acuicultura y palatabilidad .....	3
1.2. El sistema gustativo .....	6
1.3. Receptores del gusto .....	10
1.4. Clasificación de las sustancias químicas en función del gusto.....	12
1.5. Gusto y comportamiento alimenticio .....	15
1.6. Preferencias gustativas.....	17
1.7. Aplicaciones en acuicultura .....	20
1.8. Especie objetivo .....	22
<b>Objetivos .....</b>	<b>24</b>
<b>Material y Métodos (general) .....</b>	<b>29</b>
2.1. Animales.....	31
2.2. Dietas.....	32
2.2.1. Dieta comercial .....	32
2.2.2. Dietas basal o control .....	33
2.2.1. Dietas experimentales .....	36
2.3. Procedimiento experimental general .....	39
2.4. Expresión de los resultados y análisis estadísticos .....	45
<b>Capítulo I (Estimación de los niveles de ingesta mediante sistemas de auto-demanda en dorada).....</b>	<b>55</b>
3.1. Introducción.....	57
3.2. Material y Métodos.....	63
3.3. Resultados .....	66

3.3.1. Puesta a punto usando fuentes alternativas de ácido butírico 292 y 295 .....	66
3.3.2. Estimación del efecto de diferentes saborizantes sobre la ingesta utilizando piensos de sustitución vegetal .....	72
3.3.3. Expresión de receptores gustativos .....	79
3.4. Discusión .....	82
<b>Capítulo II (Sistema de selección alternativa de piensos (Dual- choice)).....</b>	<b>90</b>
4.1. Introducción.....	92
4.2. Material y Métodos.....	94
4.3. Resultados .....	100
4.4. Discusión .....	131
<b>Capítulo III (Efecto de los esteroides sobre el nivel de ingesta en la dorada) .....</b>	<b>141</b>
5.1. Introducción.....	143
5.2. Material y Métodos.....	145
5.3. Resultados .....	150
5.4. Discusión .....	162
<b>Capítulo IV (Efecto de los aditivos experimentales sobre el efecto de la ingesta inducido por el estrés) .....</b>	<b>168</b>
6.1. Introducción.....	170
6.2. Material y Métodos.....	172
6.3. Resultados .....	174
6.4. Discusión .....	179

<b>Discusión General.....</b>	<b>184</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>196</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>200</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>220</b>
- Abreviaturas .....	222
- Listado de especies.....	227





# INTRODUCCIÓN GENERAL



## 1.1. Acuicultura y palatabilidad

La acuicultura se ha situado como uno de los sectores de la producción animal con mejores niveles de eficiencia y productividad, además del incremento social muy significativo de la demanda. Los informes de la FAO del año 2017 (<http://www.fao.org/fishery/statistics/yearbook/es>) remarcan que casi la mitad de la producción mundial de pescado y otras especies acuáticas (80.1 millones de toneladas) fueron cubiertas por la acuicultura. Ese mismo año, los niveles de producción acuícola dependientes de la acuicultura en España, alcanzaron un 22% de los publicados para la Unión Europea (UE), siendo el tercer país productor tras Reino Unido y Grecia. Por poner un ejemplo de la importancia del sector, en el 2017 en España se cosecharon alrededor de 66.600 toneladas de pescado siendo la lubina la primera especie de producción con 22.000 toneladas, aproximadamente. Se estima que el empleo asociado fue de 6.300 puestos de trabajo que repercutieron directamente sobre 16.000 personas, e indirectamente sobre más de 40.000 puestos laborales (<https://www.observatorio-acuicultura.es/recursos/publicaciones/la-acuicultura-en-espana-2019>).

En España, las principales especies de peces cultivadas son la lubina (*Dicentrarchus labrax*), la dorada (*Sparus aurata*), la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y el rodaballo (*Scophthalmus maximus*). Sin embargo, los procesos de expansión han llevado a las diferentes empresas a la incorporación de nuevas especies que sean capaces de diversificar el comercio, y delimitar una diferencia tecnológica e innovativa que potencie sus redes propias de mercado. El mejor ejemplo de innovación dentro del sector español de la producción acuícola, es la introducción del cultivo de la seriola (*Seriola dumerili*) y la corvina atlántica (*Argyrosomus regius*) en el Mediterráneo. Dicha apuesta por la

innovación no está exenta del evidente riesgo que supone el desconocimiento parcial de la fisiología de las especies. El riesgo productivo solamente puede solventarse con la investigación paulatina de la biología de la especie, una investigación que, en última instancia, debe aportar información de carácter técnico para generar herramientas que conlleven la mejora del cultivo de la especie, de su producción y, por ende, del rendimiento empresarial.

Las previsiones sobre la demanda global de pescado apuntan hacia un fuerte incremento que puede llegar a doblar la demanda actual a mediados de siglo (revisado por Naylor et al., 2021a), ya que los “alimentos azules” están considerados a ser una de las fuentes nutricionales que cubrirán parte del incremento de demanda alimenticia, generado por el aumento demográfico mundial (Costello et al., 2020). Profundizar en las mejoras nutricionales de los peces y principalmente en la eficiencia de conversión alimenticia, debe de ser uno de los objetivos de la investigación en acuicultura a nivel global (Costello et al., 2020). Sin embargo, la acuicultura ha sido, y es, uno de los principales consumidores de pescado. Esta paradoja se debe a la elevada inclusión de proteína y aceites marinos, integrados fundamentalmente como harinas y aceites de pescado, en los piensos de acuicultura (Naylor et al., 2000). Una reevaluación de la situación actual, sugiere que ha habido una mejora sustancial en la eficiencia alimenticia y la nutrición de peces, que ha llevado a una disminución en la ratio pescado/pez, es decir en la cantidad de pescado utilizada para producir los peces cultivados. Sin embargo, todavía persiste esa dependencia de los ingredientes marinos y ahora también, existe un incremento de la dependencia sobre los terrestres (revisado por Naylor et al., 2021b). Este aumento de la dependencia de los productos terrestres viene provocado, fundamentalmente, por la inclusión de materias primas de origen

vegetal en los piensos de acuicultura, en lo que tradicionalmente se conoce como piensos de sustitución. Esta sustitución ha traído una ligera mejora en la sostenibilidad de la producción de peces de acuicultura, sin olvidar que la generación de estas fuentes proteicas vegetales, también compromete la sostenibilidad del proceso en función de la necesidad de un aumento de las superficies de cultivo y el consumo de agua. La proteína de origen vegetal no es la única estrategia de sustitución. Se han utilizado otras fuentes proteicas animales para este fin o están bajo activa investigación. Estas fuentes alternativas incluyen los subproductos de la pesca marina (principalmente derivados de las empresas de conserva) o de animales de terrestres, así como la proteína de insectos (revisado por Henry et al., 2015; Hua et al., 2019). Es cierto, que los mayores esfuerzos en las estrategias de sustitución se han enfocado hacia la sustitución vegetal, la cual presenta inconvenientes patentes que incluyen la baja palatabilidad y digestibilidad de los ingredientes de origen vegetal, la inducción de disfunciones del tracto gastrointestinal, el alto contenido en carbohidratos y la presencia de factores anti-nutricionales (fitoestrógenos, alcaloides) entre otros (revisado por Gatlin et al., 2007).

La palatabilidad de los piensos de sustitución es un interés prioritario para las empresas de manufactura de piensos. De nada sirve diseñar piensos muy ajustados nutricionalmente para el crecimiento de las especies, si los animales los rechazan por presentar sabores inaceptables para su gusto. De forma similar, de nada sirve la incorporación de agentes sanitarios (antiparasitarios, antibióticos, etc.) si estos generan gustos que rechazan los animales. Estos agentes saborizantes pueden formar parte de los piensos funcionales que tienen por objetivo, el aporte de mejoras fisiológicas dirigidas hacia la supervivencia y el crecimiento de

los animales, además, evidentemente, de cubrir las necesidades nutricionales de la especie (Encarnaçao, 2016).

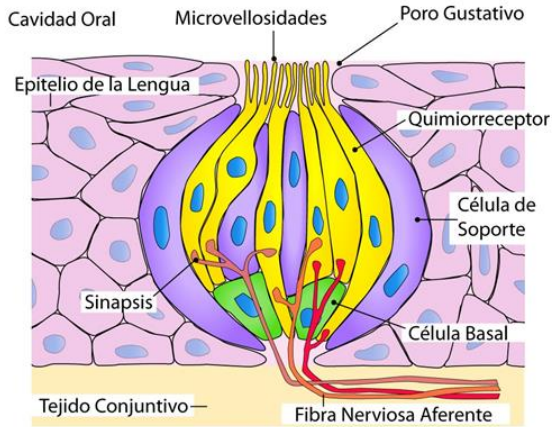
## 1.2. El sistema gustativo

En peces, el comportamiento alimenticio es afectado, dependiendo de la especie, por diversos sistemas sensoriales que abarcan desde la detección exterior del alimento a través de la visión, olfacción, electro-recepción y estímulos acústicos, hasta la deglución mediada sensorialmente por el sentido del gusto o palatabilidad, términos en ocasiones intercambiables, y las características físicas del alimento, como su textura. A diferencia de otros sistemas sensoriales que median diversas funciones, el sentido del gusto está únicamente relacionado con la alimentación, particularmente con la evaluación cualitativa de los alimentos que permite su distinción y selección antes de ser ingeridos (Kasumyan, 2019). Las papilas gustativas conforman la base estructural de los órganos gustativos, y en los peces se localizan fundamentalmente en los arcos y cepillos branquiales, así como, en la cavidad oral, incluyendo los labios, la faringe y el esófago. También pueden encontrarse en estructuras externas como aletas y barbas en determinadas especies como los siluros y ciprínidos. Su densidad varía y en ocasiones se ha correlacionado con el estilo de vida de las diferentes especies. Por ejemplo, algunos ciprínidos exhiben densidades mayores a 300 papilas por  $\text{mm}^2$  en la región faríngea, mientras que en salmónidos la densidad más elevada es de 30 papilas  $\text{mm}^2$  en el paladar. Como curiosidad, en una especie de pez gato (*Ictalurus natalis*) se han contabilizado más de 175.000 papilas distribuidas a lo largo de todo el cuerpo de aproximadamente 25 cm de longitud. Ambos, ciprínidos y siluros, son peces detritívoros que capturan el alimento del suelo y tras analizarlo gustatoria y mecánicamente

(textura) en la cavidad, lo rechazan o lo ingieren, por tanto, su ingesta es altamente dependiente del gusto. Por el contrario, salmónidos y otras especies carnívoras son predadores activos, se guían más a través de otros estímulos de carácter visual y olfatorio y una vez capturada la presa es ingerida en un elevado número de ocasiones, sin muchas opciones para los estímulos de carácter gustativos (revisado por Hara et al., 1994a y b; revisado por Morais, 2016; Kasumyan, 2019).

Estas papilas gustativas no están formadas únicamente por células receptores del gusto, sino que, en su estructura, integra diferentes botones gustativos de estructura bulbiforme donde se integran tres tipos celulares: las células gustativas o receptoras del gusto, las células basales y las células de soporte. Se localizan en el epitelio sensorial y son inervadas por diferentes fibras nerviosas que transiten el estímulo al sistema nervioso central (SNC). Tanto las células receptoras como las de soporte, alcanzan la superficie del epitelio a través de un poro cubierto por las microvellosidades terminales de ambos tipos celulares, que constituyen la superficie de contacto, a través de la cual la célula receptora queda expuesta al ambiente externo o interno (Figura 1).

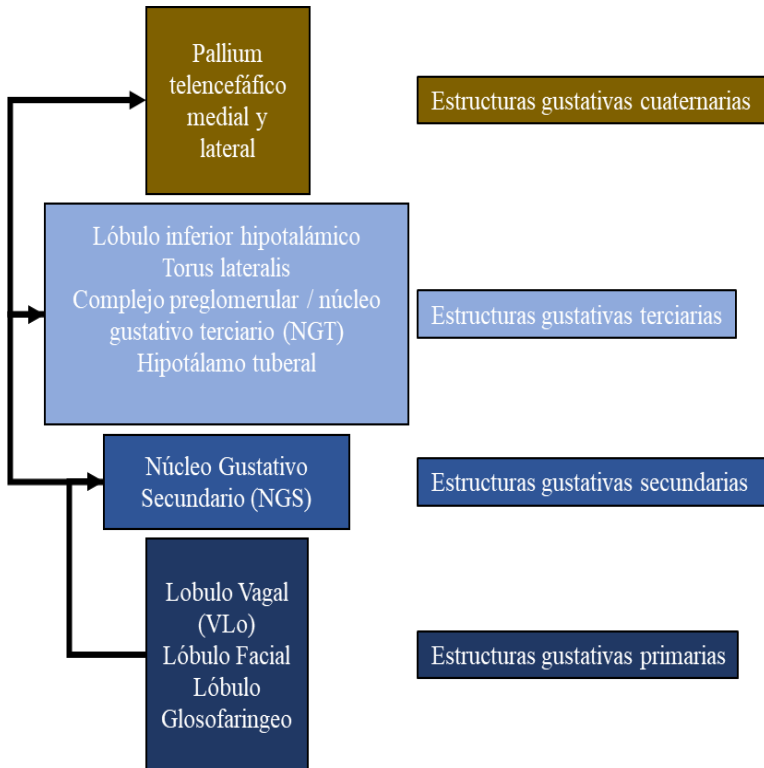




**Figura 1.** Estructura de la papila gustativa de vertebrados mostrando los diferentes tipos celulares. Modificado de <https://opentextbc.ca/biology/chapter/17-3-taste-and-smell/>

Las terminales nerviosas procedentes de las diferentes papilas gustativas se empaquetan y proyectan al SNC. En mamíferos, estas fibras gustativas entran incorporadas en los pares nerviosos VII, IX y X a través del tracto solitario, y proyectan al núcleo del tracto solitario (NTS) desde donde proyectan al cerebro anterior. En peces teleosteos, las fibras gustativas junto con otras fibras craneales se incorporan en el nervio facial, glossofaríngeo y vagal, proyectando a los lóbulos sensoriales romboencefálicos facial, glossofaríngeo y vagal, estructuras equivalentes al NTS de mamíferos. Las fibras de los núcleos gustativos primarios (lóbulos, facial, glossofaríngeo y vagal) proyectan a su vez al núcleo gustativo secundario (NGS) desde donde alcanzan diversas estructuras diencefálicas, que incluyen entre otras el complejo preglomerular, los lóbulos hipotalámicos inferiores, torus lateral, y el hipotálamo tuberal dorsal, así como la región medial del

telencéfalo dorsal en algunos teleósteos (Yáñez et al., 2017 y referencias internas) (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema de las conexiones gustativas en el SNC de peces teleósteos percomorfos.

### 1.3. Receptores del gusto

En vertebrados, la sensación gustativa de sabores importantes como dulce, amargo o umami se media a través de dos familias de receptores acoplados a la proteína de gusnidinio o proteína G: T1R y T2R, que se expresan de forma selectiva en las diferentes células receptoras gustativas. La familia T1R está compuesta por tres miembros denominados T1R1, T1R2 y T1R3 que actúan en forma heterodimérica. El dímero T1R1/T1R3 se encarga del reconocimiento de sabores umami, localizando las fuentes de proteínas mediante su activación por diferentes L-aminoácidos, pero no por sus D-enantiómeros, potenciada por la presencia de ribonucleótidos de purina. Por otra parte, el heterodímero T1R2/T1R3 reconoce sabores dulces gracias a su activación por azúcares naturales, edulcorantes naturales y artificiales, D-aminoácidos y proteínas dulces, detectando así, las principales fuentes de energía metabólica. Esta familia muestra un elevado grado de conservación evolutiva e incluso el repertorio de genes por especie, es prácticamente constante a excepción de la pérdida de T1R2 en el genoma del pollo, insensible a sabores dulces, la pseudogenización en el gato (Li et al., 2005) y la pérdida de T1R1 en el oso panda (Li et al., 2010). Esta característica revela la importancia universal de los sabores dulce y umami. Por el contrario, la familia T2R integra mucho mayor número de genes (25 a 30 en diversas especies de mamíferos y hasta 49 en algunos anfibios), que median las respuestas aversivas a agentes potencialmente tóxicos o sustancias amargas y/o dañinas. Además de ser más numerosos, la familia T2R es bastante divergente, y su respuesta está más afinada a un determinado/único sabor amargo. Esta diversidad probablemente responde a un mayor espectro químico de los sabores amargos, así como la importancia de su

detección para la supervivencia de cada organismo (revisado por Morais, 2016).

En peces teleósteos también se han caracterizado ortólogos de receptores gustativos de tetrápodos (Figura 3). Los receptores de la familia T1R muestran un elevado grado de conservación evolutiva y hasta la fecha, se ha caracterizado un solo ortólogo de T1R1 y T1R3 en cada especie. Este no es el caso para los múltiples ortólogos de T1R2 en varias especies de peces, 2-3 en diversas especies y hasta 8 formas y 2 pseudogenes en el espinoso (*Gasterosteus aculeatus*) (Yasuoka y Abe, 2009; Angotzi et al., 2020). A diferencia de lo que ocurre en mamíferos donde T1R1 y T1R2 nunca se expresan de forma aislada, pero si T1R3, en peces es relativamente habitual encontrar células receptoras gustativas que expresan únicamente formas de T1R2. En el pez cebra (*Danio rerio*) existen pequeñas poblaciones de células receptores gustativas que expresan únicamente T1R1 o T1R3 (Oike et al., 2007, revisado por Morais et al., 2016). De hecho, los estudios filogenéticos sugieren que los receptores T1R2 de peces están más relacionados a los receptores T1R1 que a los propios T1R2 de mamíferos (Figura 3) (Angotzi et al., 2020). La caracterización farmacológica de los receptores de peces medaka (*Oryzias latipes*) y pez cebra desvela que ambos dímeros T1R1/T1R3 y T1R2/T1R3 reconocen por igual los diferentes aminoácidos y son difícilmente activados por los azúcares (Oike et al., 2007; Angotzi et al., 2020). Estos resultados sugieren que, evolutivamente, los genes ancestrales respondían principalmente a los aminoácidos, pero durante la evolución de los mamíferos surgió esta habilidad para detectar los sabores dulces. Es bastante sugerente que los carbohidratos dietarios tienen menor importancia para el metabolismo energético de los peces. Sorprendentemente, en peces teleósteos, el repertorio génico de la familia T2R es mucho más reducido que en tetrápodos y hasta la fecha, no se han

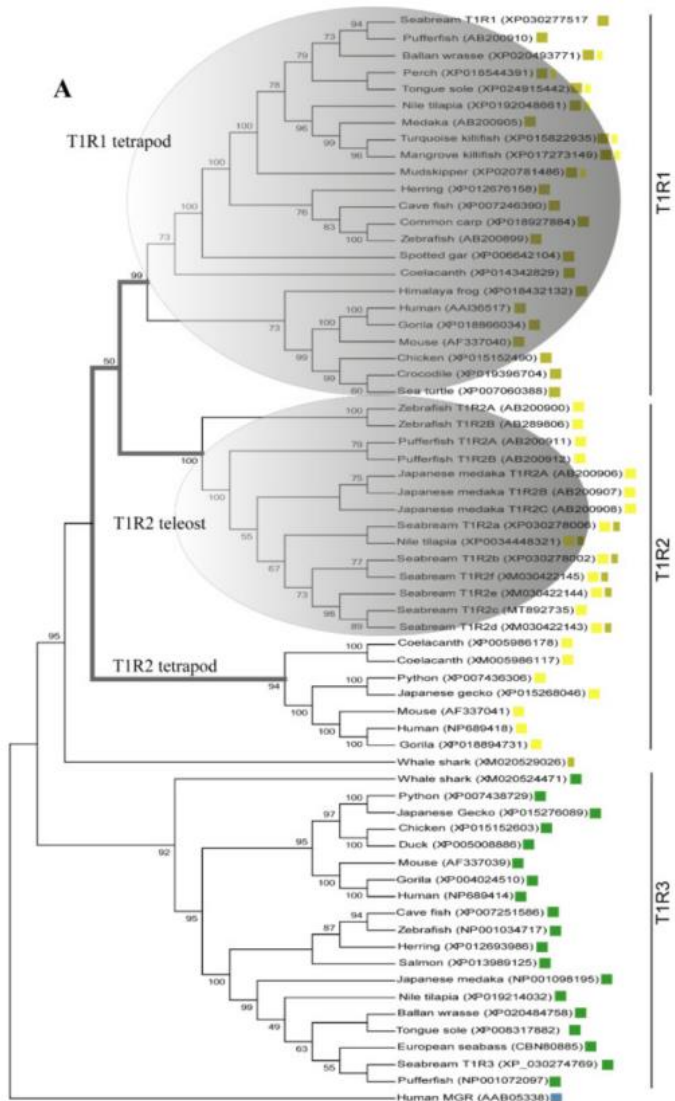
detectado más de 4 formas en fuga (*Lagocephalus sceleratus*) y pez cebra, respectivamente, (Picone et al., 2014), aunque es posible que el bajo grado de homología haya enmascarado el resto de receptores en diferentes especies. Como en mamíferos, estos receptores se encuentran segregados en células receptoras del gusto diferentes de aquellas que integran los receptores de la familia T1R.

Nuestro reciente trabajo ha caracterizado los receptores gustativos de la familia T1R1 en la dorada (Angotzi et al., 2020). Esta especie integra un ortólogo para T1R1 y T1R2, pero 6 parálogos de T1R2 (a-f) además de un pseudogen de T1R2 que no presenta niveles de expresión en ningún tejido. La caracterización farmacológica indica que todas las formas diméricas de T1R3 reconocen diferencialmente los distintos aminoácidos y azúcares, no existiendo una diferenciación funcional en el reconocimiento de estas moléculas como se ha observado en las diversas especies de peces.

#### **1.4. Clasificación de las sustancias químicas en función del gusto**

Las sustancias químicas pueden ser clasificadas de diversas formas en función de su efecto sobre el comportamiento alimenticio. La presencia de estos compuestos en la dieta determinará si un alimento es capturado o ignorado, si es comido o rechazado y de alguna manera, la cantidad de ese alimento que será ingerida por el animal. Una de estas clasificaciones atiende a si el alimento tiene efecto sobre el sistema gustativo oral o extra-oral, sistemas que tienen roles diferentes sobre el comportamiento alimenticio. Los incitadores son sustancias que estimulan el sistema extra-oral e inducen la captura del alimento. Los

supresores disminuyen la tasa de captura del alimento activando el sistema extra-oral. Los estimulantes promueven la ingesta activando el sistema gustativo oral. Habitualmente un alimento que es capturado, será deglutido si contiene sustancias estimulantes en esa primera captura. Las sustancias disuasorias provocan el rechazo del alimento una vez capturado. Los alimentos que contienen estas sustancias tienen un tiempo de retención reducido en la cavidad oral y los peces, normalmente, no intentan recapturarlos. Es más, generalmente estas sustancias producen una inhibición de la motivación por la alimentación durante un periodo de tiempo reducido.



**Figura 3.** Relaciones filogenéticas de los diferentes receptores de la familia T1R, basadas en el método de máxima verosimilitud usando alineamientos de las secuencias proteicas de la región codificadora de las diferentes proteínas según Angotzi et al., (2020).

Los potenciadores no son estimulantes, pero acentúan el sabor del alimento provocando un aumento de la ingesta del sustento saborizado. Presumiblemente, existen también sustancias detractoras que son elementos neutros, es decir, no causan efecto alguno por sí mismas, pero disminuyen los efectos positivos de los estimulantes. Finalmente, hay sustancias que no tienen ningún efecto sobre el sistema intra- o extra-oral y son clasificadas como indiferentes (revisado por Kasumyan y Doving, 2003).

## **1.5. Gusto y comportamiento alimenticio**

Los subsistemas gustativos extra-oral e intra-oral, además de otros órganos sensoriales como puede ser la línea lateral, median complejas respuestas comportamentales hacia el alimento. Normalmente, el sistema gustativo participa en las fases finales de una serie de eventos comportamentales, que ligan la búsqueda de alimento y su consumo final. El sistema gustativo extra-oral parece estar más conectado con los comportamientos de búsqueda y captura de los elementos alimenticios, mientras que el sistema intra-oral participaría en la evaluación de esos alimentos y en su expulsión o deglución en función de la presencia de elementos disuasorios o estimulantes, respectivamente.

Cuando el sistema extra-oral de un pez entra en contacto con una pieza de alimento provoca un comportamiento específico que dirige al animal hacia este o, por el contrario, puede inducir que lo esquive. El pez puede parar bruscamente, iniciar una natación hacia adelante y hacia atrás, rodear el ítem de alimento girando a su alrededor o describir una trayectoria de natación en “S” o círculos para acercarse al alimento. Este comportamiento se sigue habitualmente de un movimiento mandibular de apertura y cierre (del inglés, *snapping*), a veces de elevada frecuencia, que puede concluir en un contacto súbito con el alimento. Una vez el



alimento está en la situación adecuada respecto a la boca, el pez sujeta la pieza de alimento con las mandíbulas. La presencia de sustancias aversivas provocará un cambio de dirección en la natación que conlleva la búsqueda de alimento, por el contrario, la presencia de incitantes conllevará un aumento en esta frecuencia mandibular mientras que los supresores harán lo contrario.

Una vez el alimento es capturado e introducido en la cavidad oral, entran a tomar partido los sistemas gustativos intra-orales. Estos alimentos pueden incorporarse mediante diversos mecanismos como el desgarrar del material, los mordiscos, el raspado y la succión entre otros, pero una vez en la boca pasan a la última fase de evaluación, que conllevará su expulsión o la deglución/ingestión. El tiempo que pasa en la boca el alimento se denomina tiempo de retención, y es el tiempo necesario para reconocer las sustancias gustativas, definir la palatabilidad y finalmente decidir si se expulsa o se ingiere. Muchas especies, como el carpín dorado (*Carassius auratus*), pueden recapturar el alimento una vez ha sido escupido para su reevaluación acortando o extendiendo el tiempo de retención. Durante este tiempo de retención el alimento puede ser clasificado separando el material de desecho, posibles elementos no alimenticios incorporados en su captura, y elementos ingeribles (revisado por Kasumyan y Doving, 2003).

## 1.6. Preferencias gustativas

Las sensaciones gustativas han sido evaluadas generalmente mediante estudios electrofisiológicos y/o comportamentales que en muchas ocasiones no son coincidentes, indicando que las respuestas positivas a diferentes sustancias químicas, no son siempre un sinónimo de activación del sistema gustativo en peces. Los estudios clásicos han evaluado las preferencias a todas las modalidades gustativas en diferentes especies, incluyendo los sabores dulces, agrio/ácidos, amargos y salados representados, por ejemplo, por la sucrosa, el vinagre (ácido acético), la cafeína y el cloruro sódico, respectivamente. Aunque es cierto que los diferentes aminoácidos libres han recibido la mayor atención (Hara, 1994b; revisado por Kasumyan y Doving, 2003; revisado por Morais, 2016). Sin embargo, las preferencias gustativas son dependientes de cada especie y generalmente, las extrapolaciones realizadas a partir de resultados obtenidos en otras especies no son válidas. Como ejemplo, en un estudio enfocado a la valoración del gusto ácido realizado en 37 especies se observó que, en 16 especies, este tipo de sabor deprimió la aceptación de los alimentos mientras que en otras 15 estimuló significativamente la palatabilidad del alimento. Para las 8 especies restantes la adición de ácido cítrico fue totalmente indiferente (revisado por Kasumyan y Doving, 2003). Es cierto que estas preferencias se explican, en muchas ocasiones, en función de las mejoras que pueden aportar al metabolismo energético de la especie, o incluso en referencia al nicho ecológico que ocupan. Ambos procesos pueden aportar, a su vez, pistas inversas en la evaluación de sustancias potencialmente positivas. Así, conociendo el nicho ecológico de una especie y sus alimentos/presas favoritas, podemos intuir las sustancias químicas o composición de aminoácidos que pueden estimular su ingesta. Por ejemplo, la

sucrosa es indiferente o incluso disuasoria en varias especies como pez gato, trucha marrón (*Salmo trutta*) y rutilo marino (*Rutilus rutilus*), lo cual no es sorprendente debido a la baja predominancia en los ecosistemas y a la carencia como requerimiento nutricional en muchas especies (revisado por Morais, 2016). Como se ha visto anteriormente, esto se ajusta bien a la farmacología de los receptores de la familia T1R en peces, y su inactividad frente a compuestos relacionados con los sabores dulces (ver sección receptores del gusto).

En muchas especies de peces, y especialmente aquellas relacionadas con la acuicultura, las proteínas son la fuente principal de su metabolismo energético. Sin embargo, una de las particularidades es que, aún, con los requerimientos estrictos de aminoácidos esenciales, estos no son siempre los más palatables. De hecho, el dímero T1R1/T1R3 responde a la mayoría de los 20 L-aminoácidos estándar, sin preferencia hacia los esenciales (excepto en humanos donde el gusto umami se ciñe escuetamente a la activación por L-glutámico (Glu) y otros pocos no esenciales como L-ácido aspártico (Asp) y L-glutamina (Gln)). Las preferencias umami sólo se manifiestan cuando la ingesta de proteína sobrepasa los requerimientos esenciales. En caso de deficiencia o malnutrición proteica, las preferencias alimenticias suelen desplazarse hacia fuentes de cloruro sódico (NaCl) o incluso, hacia fuentes que contienen el aminoácido esencial que muestra deficiencias concretas. Por tanto, la preferencia por el gusto umami asegura un aporte proteico balanceado más que mitiga las deficiencias existentes (revisado por Hara, 1994a; revisado por Kasumyan y Doving, 2003; revisado por Morais, 2016). También es importante destacar que, a diferencia de los que ocurre en mamíferos, los nucleótidos, presentes en grandes cantidades en los tejidos en descomposición, no siempre presentan

actividades sinérgicas con los aminoácidos, aunque tienen actividad estimulante per se (revisado por Morais, 2016).

Con referencia a sus preferencias umami, los peces pueden clasificarse en dos grandes grupos; aquellos que responden a un amplio rango de aminoácidos, como puede ser la tilapia (*Oreochromis niloticus*) o el pargo japonés (*Pagrus major*), y aquellos que responden a un escueto rango como los salmónidos, la seriola, la anguila (*Anguilla anguilla*) o los ciprínidos. Así, por ejemplo, para determinados salmónidos solamente la L-prolina (L-Pro), hidroxil-L-prolina (L-Hpr), y L-alanina (L-Ala) son los únicos aminoácidos estimulantes (Hara, 1994b). Por lo tanto, el número, tipo y potencias de los aminoácidos palatables en peces es muy variable, aunque un estudio realizado en 21 especies ha mostrado que los aminoácidos estimulatorios más frecuentes son L-alanina > L-cisteína > L-serina > L-glutamina = L-glicina = L-ácido glutámico = L-tirosina (revisado por Kasumyan y Doving, 2003).

## 1.7. Aplicaciones en acuicultura

Desde el punto de vista de la acuicultura, deben tenerse en cuenta dos aspectos importantes que pueden afectar la producción animal. Por un lado, lo referente a la atracción química y en segundo lugar, lo relativo a la estimulación de la ingesta. En el primero de los casos, la atracción química, no implica necesariamente de un incremento en el nivel de ingesta, sino que los incitadores o atrayentes pueden aumentar la velocidad de captura del alimento, reduciendo el número de pellets desperdiciados y por extensión la calidad del medio. Esto puede implicar una disminución en los gastos de cultivo que no tienen que verse reflejados en mejoras de crecimiento o eficiencia alimenticia. Por otro lado, los estimulantes químicos provocan mejoras en la tasa de ingesta; bien estimulando los sistemas hedónicos de control alimenticio, o bien inhibiendo los sistemas de periféricos de saciedad. Otros casos en los que el uso de sustancias químicas gustativas puede ser beneficioso para la acuicultura refieren, como hemos visto anteriormente, la inclusión de medicamentos (antibióticos, aceites esenciales, etc.) o la sustitución de materias primas (vegetales o animales) que puede conllevar la inclusión de sustancias disuasivas o supresoras de la ingesta. Una forma de solventar este problema podría ser la inclusión de potenciadores o estimulantes que aumenten la motivación por el alimento. Finalmente, estas sustancias estimulantes pueden ayudar también a sobrepasar situaciones en las que los animales pueden ver su ingesta desfavorecida, por ejemplo, situaciones de estrés promovidas, bien por cambios naturales o derivadas de la acción humana. Como se ha descrito anteriormente, los sistemas gustativos son influenciados significativamente por las condiciones ambientales, y los cambios en la temperatura pueden modificar la sensibilidad de los sistemas

gustativos permitiendo el cambio estacional de dietas (Kasumyan, 2019). De igual forma la condición energética del organismo puede modificar la sensibilidad de los sistemas gustativos, siendo mucho más permisivos a sustancias disuasorias en estados de metabolismo energético negativo vs positivo. De hecho, la ingesta de los peces depende en gran medida de la temperatura, en condiciones favorables de temperaturas en su rango térmico, comerán un mayor espectro de alimentos que cuando las condiciones son restrictivas, y es entonces, cuando estos sistemas de estimulación de la ingesta encontrarán una ventana de acción y no durante las fases más activas de ingesta. Experimentos realizados en moscas (*Drosophila*) han demostrado que la colecistoquinina (CCK) central es capaz de regular la expresión oral de receptores gustativos, de tal forma que durante los periodos de saciedad hay una estimulación de la expresión que conlleva mayor sensibilidad espectral de los sistemas gustativos. Por el contrario, en condiciones de ayuno la ausencia de CCK, un péptido anorexigénico, conlleva un descenso en los niveles de expresión de receptores que hacen la ingesta mucho más permisiva desde el punto de vista gustativo (Guo et al., 2021). Hasta nuestro conocimiento, no existen estudios similares en vertebrados, pero es muy posible que estos sistemas de regulación estén bien conservados.

## 1.8. Especie objetivo

La dorada es un espárido muy común en el mar Mediterráneo, aunque su distribución también abarca la zona atlántica desde el este de Gran Bretaña hasta las costas de Senegal. Se encuentra tanto en ambientes marinos como salobres, gracias a su carácter eurihalino y euritérico. Las lagunas costeras y aguas estuarinas son sus zonas preferidas durante las primeras etapas de vida. Tras su nacimiento en mar abierto durante octubre-noviembre, los juveniles migran a aguas costeras donde encontrarán los recursos tróficos idóneos para su crecimiento. Esta especie es hermafrodita protándrica. El desarrollo de la madurez sexual resulta en machos a los 2 años de edad (20–30 cm) y en hembras a los 2–3 años (33–40 cm). Las hembras desovan en tandas intermitentes, pudiendo poner 20.000–80.000 huevos cada día por un periodo de hasta 4 meses. En cautiverio, el cambio de sexo parece estar condicionado por factores sociales y hormonales ([http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus\\_aurata/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/es)).

Como se ha introducido anteriormente, la dorada es una de las especies principales en la acuicultura mediterránea y ha sido la especie elegida por LUCTA S.A. para el desarrollo de la línea Aqua, dirigida al estudio de las relaciones gusto/ingesta en peces para el ulterior desarrollo de productos comerciales que favorezcan la ingesta del alimento.





# OBJETIVOS



Las nuevas estrategias adoptadas en el diseño de piensos para peces, conllevan un continuo estudio enfocado a la sinergia entre los requerimientos nutricionales de las diferentes especies en cultivo y la sostenibilidad del proceso productivo. Las empresas de manufactura de alimento exploran continuamente la inclusión de materias primas que abaraten los costes de producción y en ocasiones, colateralmente, hagan más sostenible ambiental y ecológicamente el proceso. Esto puede conllevar una modificación en la palatabilidad de los piensos que los haga poco atractivos para los animales. Nuestro objetivo principal fue estudiar el comportamiento alimenticio de la dorada mediante un sistema de auto-demanda de alimento con el cual testar posteriormente, el efecto de diversos componentes. La tesis se desarrolla bajo el marco de diversos convenios colaborativos entre la empresa LUCTA S.A. y el grupo de Control de Ingesta del Instituto de Acuicultura del Torre la Sal (IATS) perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y conlleva, por tanto, diversos compromisos de confidencialidad sobre los componentes estudiados y resultados generados. Se atendieron los siguientes objetivos específicos:

1. Validar el sistema de control de ingesta que el grupo de investigación ha utilizado durante los últimos años en la dorada.
2. Evaluar el efecto de dos aditivos químicos sensoriales gustativos (saborizantes) provistos por LUCTA S.A. sobre los niveles de ingesta y la dinámica de crecimiento de la dorada.
3. Corroborar la discriminación sensorial gustativa en la dorada, mediante un sistema de selección dual de piensos “dual-choice”.
4. Comprobar el efecto de los anti-nutricionales sobre la ingesta de la dorada.

5. Comprobar el efecto del estrés sobre la ingesta y las posibles soluciones paliativas derivadas de la estimulación del sistema gustativo, mediante el uso de saborizantes provistos por LUCTA S.A.



# **MATERIAL Y MÉTODOS (GENERAL)**



## **2.1. Animales**

Los animales experimentales de diferentes pesos, según el experimento pertinente, fueron comprados a empresas de acuicultura del grupo Culmarex (Águilas, Murcia) o Avramar (Burriana, Castellón). Tras su llegada a las instalaciones experimentales, los peces fueron introducidos en dos tanques de 2500 litros provistos de renovación de agua, aireación constante y comederos de auto-demanda (ver sección 2.3. Procedimiento experimental general). Tras su recepción los peces fueron alimentados con una dieta comercial de la compañía Biomar (ver sección 2.2. Dietas).

Para cualquier manipulación los animales fueron previamente anestesiados en 2-fenoxietanol al 0.1% hasta que los movimientos operculares se detuvieron, aproximadamente dos minutos. El día previo a la manipulación los animales no fueron alimentados.

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con los principios publicados por la directiva europea 86/609/CEE, referente a la protección de animales experimentales. Los procedimientos se aprobaron por el comité de ética del IATS y por el comité interno del CSIC.



## 2.2. Dietas

Todos los piensos fueron conservados a 4°C para evitar su oxidación.

### 2.2.1. Dieta comercial

La dieta comercial de engorde para dorada EFICO 3073 (Biomar Spain) se usó para alimentar a los peces de forma rutinaria, mientras no estaban sometidos a ninguna dieta experimental. Su composición se muestra en la Tabla 1. La distribución de energía digestible se compone de un 8% de hidratos de carbono, 40% de grasas y un 52% de proteínas.

**Tabla 1.** Formulación de la dieta comercial.

<b>Energía digestible BioMar (MJ/kg)</b>	<b>16.7</b>
<b>Prot. Digestible/En. Digestible (g/MJ)</b>	<b>22.1</b>
<b>Proteína en bruto (%)</b>	41-45
<b>Grasa en bruto (%)</b>	16-20
<b>Carbohidratos (%)</b>	18-31
<b>Celulosa en bruto (%)</b>	2-4
<b>Cenizas (%)</b>	5-8
<b>Total fósforo (%)</b>	0.9
<b>Energía en bruto (MJ/kg)</b>	21.7-22.3
<b>Energía digestible clásica</b>	19.2
<b>Vitamina A añadida (U.I/kg)</b>	5000
<b>Vitamina D3 añadida (U.I/kg)</b>	1000
<b>Vitamina E añadida (mg/kg)</b>	200
<b>Vitamina C añadida (mg/kg)</b>	100
<b>Número pellets indicado por kg</b>	12500

Dieta compuesta por gluten de maíz, guisante, harina de pescado, torta de colza, harina de sangre, torta de cacahuetes, aceite de soja, aceite de pescado, vitaminas y minerales. Con un contenido en OGM (organismo genéticamente modificado) inferior al 0.9%.

### **2.2.2. Dietas basales o control**

Las dietas experimentales fueron manufacturadas por la compañía Sparos Lda (Portugal). La característica principal de la dieta base es la ausencia de harinas de pescado en su composición con el fin de obtener una baja palatabilidad y aceptación por los animales experimentales. Sobre esta dieta se añadirán, posteriormente, diversos componentes experimentales para intentar aumentar esa palatabilidad. La dieta base muestra un 44% de proteína y un 18% de lípidos totales. Los gránulos extruidos fueron de 3 mm recubiertos en vacío sólo con aceite. Este aceite se utilizará como vehículo para el emulsionado de los diferentes aditivos experimentales.

**Tabla 2.** Formulación de la dieta basal.

<b>INGREDIENTES, %</b>	<b>BASAL</b>
<b>Concentrado de proteína de soja</b>	27.00
<b>Gluten de trigo</b>	14.30
<b>Gluten de maíz</b>	13.00
<b>Harina de soja 48</b>	9.00
<b>Harina de colza</b>	5.00
<b>Harina de girasol</b>	2.00
<b>Harina de trigo</b>	4.20
<b>Almidón de guisante</b>	3.00
<b>Aceite de pescado</b>	3.80
<b>Aceite de soja</b>	4.00
<b>Aceite de colza</b>	4.00
<b>Aceite de palma</b>	4.00
<b>Vit &amp; Min Premix PV01</b>	1.00
<b>Lecitina de soja</b>	1.00
<b>Aglutinante (goma guar)</b>	0.20
<b>Antioxidante</b>	0.20
<b>MCP</b>	3.00
<b>L-Lisina</b>	0.80
<b>DL-Metionina</b>	0.50
<b>Total</b>	100.00
<b>COMO BASE DE ALIMENTACIÓN</b>	<b>BASAL</b>
<b>Proteína cruda</b>	44.23
<b>Grasa cruda</b>	18.37
<b>Fibra</b>	2.64
<b>Almidón</b>	7.41
<b>Ceniza</b>	5.97
<b>Energía en bruto</b>	21.16
<b>Lys</b>	2.57
<b>Met + Cys</b>	1.85
<b>Total P</b>	1.06
<b>Disponible P</b>	0.78
<b>EPA</b>	0.33
<b>DHA</b>	0.22

Composición de la dieta basal: Vit (vitaminas), Min (minerales), MCP (fósforo monocalcico), Lys (lisina), Met (metionina), Cys (cisteína), P (fósforo), EPA (ácido eicosapentaenoico) y DHA (ácido docosahexaenoico).

Para el experimento de estrés descrito en el capítulo 4 (ver después) se formuló una dieta basal alternativa no tan restrictiva en su composición que contenía un 12% de harina de pescado. Su

formulación queda reflejada en la Tabla 3, con las variaciones de la composición incluidas en el pie de la tabla.

**Tabla 3.** Composición de la dieta basal 2.

<b>INGREDIENTES %</b>	<b>BASAL 2</b>
<b>Harina de pescado Super Prime (Diamante)</b>	12.5
<b>Proteína de soja concentrada (Soycomil)</b>	17
<b>Gluten de trigo</b>	6
<b>Gluten de maíz</b>	10
<b>Harina de soja 48</b>	20
<b>Harina de colza</b>	5
<b>Harina de trigo</b>	10
<b>Aceite de sardina (Sopropeche)</b>	4.8
<b>Aceite de colza</b>	11.2
<b>Vit. &amp; Min. Premix INVIVO 1%</b>	1
<b>MCP</b>	2
<b>L-Lisina</b>	0.3
<b>DL- Metionina</b>	0.2
<b>TOTAL</b>	100
<b>COMO BASE DE ALIMENTACIÓN</b>	%
<b>Proteína cruda</b>	44
<b>Lípidos crudos</b>	18.2

### **2.2.3. Dietas experimentales**

#### **Dietas 292/295 (Capítulo 1)**

Durante el primer experimento se usaron dos componentes utilizados como fuentes de ácido butírico y codificados como 292 y 295. Ambos componentes fueron proporcionados por la empresa y su composición reside dentro del secreto empresarial. Ambos compuestos se disolvieron en etanol 100% (0.1 g/ml) en un volumen final de 30 ml. Cada compuesto se aplicó en forma de spray sobre 1 kg de dieta basal generando así los dos piensos experimentales. Tras la mezcla, los piensos se secaron a 37°C toda la noche con el fin de evaporar el componente alcohólico.

#### **Dietas A y B (Capítulo 1)**

Para el segundo experimento, se produjo un lote de 100 kg de dieta basal. De éstos, 50 kg fueron usados como tratamiento control. Los otros 50 kg, se utilizaron para desarrollar las dos dietas experimentales mediante recubrimiento con aceite previamente emulsionado con los aditivos correspondientes (MP09699 y MP10063). Por tanto, se elaboraron 25 kg de cada dieta experimental denominadas como A y B aplicando las siguientes dosis:

Dieta A: 0.2% de MP09699 (80% DM), i.e., 50g/25 kg pienso

Dieta B: 0.3% de MP10063 (50% DM), i.e., 75g/25 kg pienso

Las características químicas de ambos aditivos fueron desconocidas para el experimentador y se enmarcan dentro del secreto empresarial.

### **Dieta con quinina vaporizada 1.5% y 7.5% (Capítulo 2)**

Se disolvieron 15 g de quinina (Sigma) en 100 ml de etanol. Esta disolución se usó para para vaporizar 0.2 kg (7.5%) o 1 kg de pienso basal (1.5%), que se mantuvieron en una campana de extracción durante 48 horas con el fin de evaporar el componente alcohólico.

### **Dieta positiva y negativa (Capítulo 2)**

Las dietas positiva y negativa se utilizaron en los experimentos de selección alternativa de piensos o “dual choice”. Se elaboraron 15 kg de pienso negativo y 15 kg de pienso positivo, cuya composición aparece en la siguiente Tabla 4. El tamaño del pellet fue de 5 mm.

**Tabla 4.** Composición y formulación aproximada de las dietas experimentales positiva y negativa utilizadas en los experimentos de selección alternativa o “dual choice”.

<b>INGREDIENTES %</b>	<b>NEGATIVO</b>	<b>POSITIVO</b>
<b>Harina de pescado Super Prime (Diamante)</b>	12.5	30
<b>Harina de pescado 60 (CONRESA)</b>		10
<b>CPSP 90</b>		6
<b>Harina de calamar 83 (Sopropeche)</b>		6
<b>Harina de Krill (Aker biomarine)</b>		6
<b>Proteína de soja concentrada (Soycomil)</b>	17	
<b>Gluten de trigo</b>	6	
<b>Gluten de maíz</b>	10	
<b>Harina de soja 48</b>	20	
<b>Harina de colza</b>	5	
<b>Harina de trigo</b>	8.5	28.5
<b>Aceite de sardina (Sopropeche)</b>	4.8	12.5
<b>Aceite de colza</b>	11.2	
<b>Vit. &amp; Min. Premix INVIVO 1%</b>	1	1
<b>MCP</b>	2	
<b>L-Lisina</b>	0.3	
<b>DL- Metionina</b>	0.2	
<b>Quinina clorhidrato dihidrato</b>	1.5	
<b>TOTAL</b>	100	100
<b>BASE DE ALIMENTACIÓN</b>	%	%
<b>Proteína cruda</b>	43.9	44
<b>Lípidos crudos</b>	18.2	18.2

CPSP 90: proteínas hidrolizadas de pescado.

### 2.3. Procedimiento experimental general

Inicialmente, los animales se encontraban repartidos en dos tanques “*stock*” de 2500L como se muestra en la Figura 4. La finalidad de esta fase inicial fue la acomodación de los animales a las condiciones de cultivo de las instalaciones, su crecimiento hasta la talla experimental adecuada, y el aprendizaje en la utilización de los sistemas de auto-demanda alimenticia. En un primer momento, los animales fueron alimentados manualmente “*ad libitum*” debido a su pequeño tamaño. Tras un mes, los peces iniciaron el aprendizaje del sistema de alimentación por auto-demanda. Durante este periodo, el alimento fue liberado desde un comedero automático tras demanda del animal mediante activación de un sensor de contacto (ver más abajo). Los tanques fueron equipados con aireación adecuada para su volumen y flujo de agua de mar continuo.



**Figura 4.** Tanque “Stock” donde los peces se van aclimatando desde su llegada hasta el comienzo del experimento.

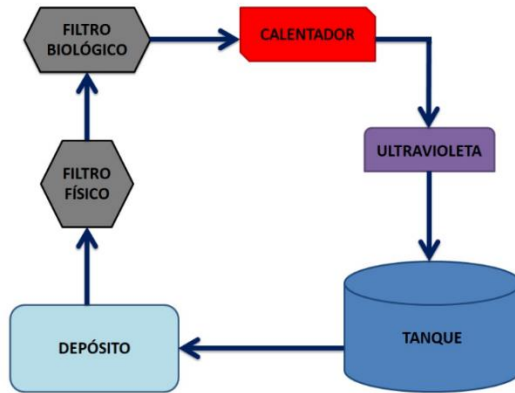


Los tanques fueron inspeccionados diariamente para verificar que no hubiese acumulación de alimento desperdiciado. De la misma forma, se comprobó la ausencia de mortalidad o signos de enfermedad en los animales. En una segunda fase o fase experimental, los experimentos se desarrollaron en una zona aislada del paso de personal, para minimizar el estrés de los animales. La entrada rutinaria a dicha zona fue limitada a la comprobación del estado de los peces y a la limpieza de los tanques, en caso necesario. Dicha zona experimental comprende 12 tanques de 500L (Figura 5), todos ellos dotados de un sistema de aireación constante.



**Figura 5.** Zona de experimentación con los tanques dotados de los comederos de auto-demanda.

El aporte de agua se produce de dos formas, directamente de la tubería procedente del mar o de un depósito que forma parte del circuito de recirculación. En este circuito (Figura 6), el agua sale del depósito pasa por una bomba que la impulsa hacia dos filtros, un primer filtro físico (compuesto por arena) y por un segundo filtro biológico (cargado con bacterias). A continuación, el agua pasa por un calentador, donde alcanzará la temperatura previamente seleccionada. Finalmente, el agua, ya caliente, pasa a través de una carcasa para su desinfección mediante luz ultravioleta y se distribuye a los tanques de experimentación antes de volver al depósito.



**Figura 6.** Esquema del funcionamiento del sistema de recirculación del agua de la zona de experimentación.

Cada tanque está provisto de dos unidades de auto-demanda para la alimentación de los peces. La activación de dicho sistema se produce cuando el pez tira de un cable (línea de acero inoxidable con una resistencia de 45 a 55 kg), en cuyo extremo final se halla una bola de 1 cm de diámetro, la cual se encuentra sumergida aproximadamente a 3 cm de la superficie del agua. El tirón activa un micro-interruptor cuyo cierre envía la señal a un arduino programado y subsecuentemente, a través de la red ethernet, al software de control (AUTÓMATA). Este integra la información elaborando una respuesta acorde a la programación, que es enviada de nuevo al arduino para que gestione la actividad del comedero asociado al sensor. Su activación implica el giro de un tambor/rotor socavado cuyas hendiduras sirven como dosificador del pienso a distribuir. Estas hendiduras pueden albergar una cantidad de pienso determinada, en función del tamaño del pellet, aproximadamente 1 g en nuestros experimentos. Desde el software, mediante una “interface” WEB programada en lenguaje

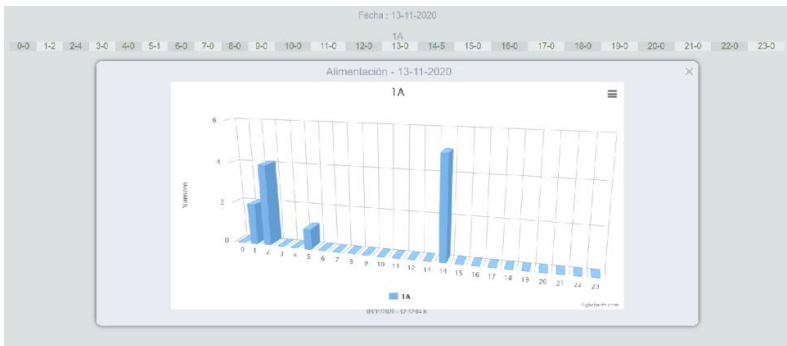
PHP y una segunda sección desarrollada de lenguaje C para recibir, integrar y emitir ordenes, se puede programar el tiempo de giro del tambor tras una activación del sensor, regulando así la cantidad de alimento liberado por cada demanda. En todos los experimentos, el tiempo de liberación fue ajustado a su valor mínimo, 1 segundo, para que la cantidad de pienso liberado y, por extensión, la cantidad de alimento no ingerido por los peces fuese mínima.

AUTÓMATA registra el momento de cada activación/demanda de alimento (Figura 7) que queda almacenado en una base de datos MYSQL desde donde pueden exportarse, en formato csv, legible por Excel, para su posterior tratamiento estadístico. El periodo de integración de los datos es también programable, así como el intervalo temporal de estos. El software ofrece, además, diversas opciones de alimentación manual, programada o auto-demanda con restricción temporal.



**Figura 7.** Registro de la actividad alimenticia de cada comedero en AUTÓMATA.

También ofrece un sistema gráfico (Highcharts, <https://dotnet.highcharts.com/>) para cada sensor/comedero que ayuda a la visualización in situ de la situación particular de cada unidad de alimentación (Figura 8). Cada tanque está provisto de dos comederos independientes activados por distintos sensores, lo que permite introducir piensos diferentes en cada comedero para la realización de ensayos de discriminación sensorial (Capítulo 2). Al inicio de cada experimento se cargan todos los comederos con una cantidad conocida de pienso control o experimental, estimada en función de la duración del experimento, el número y tamaño de los peces experimentales y la temperatura del agua. Al final de cada experimento se recupera el pienso restante, de forma que la diferencia con la cantidad inicial, rinde la cantidad de alimento ingerido durante todo el periodo experimental. Dicha cantidad es dividida por el número de activaciones del sensor durante el periodo experimental para estimar la tasa de liberación real de cada unidad de alimentación. A su vez, la cantidad de alimento ingerida se refiere a la biomasa total del tanque obteniendo una relación de alimento ingerido por gramo de biomasa.



**Figura 8.** Sistema de representación gráfica de la actividad alimenticia en AUTÓMATA.

Para asegurar una distribución homogénea de la talla y el peso de los animales al inicio de cada experimento, se realizaron muestreos biométricos de los tanques “stock”. En función de la distribución de pesos representada en forma de histograma, se seleccionaron intervalos de suficiente amplitud como para contener el número de peces necesario para el desarrollo experimental. Para evitar el estrés excesivo de los animales, antes de cada manipulación los peces se pre-anestesiaron en los tanques con fenoxietanol (1/40 vol/vol). Tras la captura de los peces del tanque, estos se pasaron a una concentración superior del mismo anestésico (1/10 vol/vol) previo a su pesaje. Una vez obtenido el intervalo correcto y tras al menos 7 días, los peces se volvieron a muestrear siguiendo el mismo procedimiento, seleccionando solamente aquellos pertenecientes al intervalo elegido. Estos peces se distribuyeron uno a uno en los tanques experimentales a razón de 10 animales por tanque. Tras una semana, la distribución de peso y talla de cada tanque experimental fue obtenida mediante un nuevo muestreo biométrico, con el fin de asegurar, de forma estadística, la distribución uniforme entre todos los grupos del experimento.

Para los muestreos de tejidos, los animales fueron previamente eutanizados mediante sobredosis de anestésico o mediante exposición prolongada a bajas temperaturas ( $< 5^{\circ}\text{C}$ ).

## 2.4. Expresión de resultados y análisis estadístico

Expondremos someramente las bases metodológicas y las de los modelos estadísticos que se han utilizado en esta tesis. En la presente investigación, el tanque fue usado como unidad experimental, a excepción de los dual-choice, donde la unidad experimental fueron los comederos. Hemos utilizado mayoritariamente el GLM (General Linear Model), que de forma matricial compacta se representa (Cohen et al., 2003; Fox, 2015; Vik, 2010):

$$Y = XB + E$$

Siendo  $Y$  la matriz de variables dependientes (modelo multivariado), aunque habitualmente se toma sólo una variable dependiente (VD);  $X$  la matriz del diseño, o matriz de variables independientes (VIs),  $B$  es la matriz de coeficientes del modelo, que se aplican a cada valor de las variables de la matriz  $X$ , y  $E$  son los errores de pronóstico.

En nuestra investigación, se ha aplicado el GLM univariado, o con una sola VD (tirones o gramos, según el objetivo de investigación), y una o varias variables independientes (VIs: día, hora, tratamiento,...), estableciéndose la relación entre las VIs y la VD mediante un conjunto de relaciones ( $Y = f(X)$ ) en las que se estiman unos coeficientes que se han de multiplicar al valor de 1 para el término independiente ( $B_0$ ) y al valor de cada VI,  $X_k$  ( $B_k$ ):  $Y = B_0 \cdot 1 + \sum(B_k \cdot X_k)$ .

El GLM abarca distintos procedimientos de análisis de datos: regresión simple, múltiple y multivariada; comparaciones de medias (pruebas t, ANOVA, ANCOVA, etc.); distintos modelos de series temporales; análisis factorial exploratorio y

confirmatorio,... Obsérvese que todos los anteriores modelos tienen en común su carácter aditivo y lineal, siendo variantes del mismo GLM.

Se tuvo en cuenta que a medida que aumenta el tamaño de la muestra, la media se acerca a la normalidad. Según el Teorema del límite central (Fischer, 2011; Prieto y Herranz, 2010), las medias, cuando la muestra aumenta en número de elementos, tienden a seguir una distribución normal (campana de Gauss), incluyendo cuando la variable en sí no sigue tal distribución (Blanca et al., 2017). Pese a que inicialmente algunas variables no mostraban una distribución normal, el análisis de la varianza (ANOVA) para la comparación de medias se ha comprobado que resulta ser muy robusto (Khan et al., 2003), es decir, no rechazándose la hipótesis nula más allá de lo establecido probabilísticamente, y a la contra, aceptándose la hipótesis de nulidad en adecuado porcentaje de casos; todo ello se investigó mediante estudios de generación de muestras aleatorias por medio de investigaciones de simulación de datos mediante distintas distribuciones, normales y no-normales, comprobándose que el ANOVA posee una tolerancia muy buena al incumplimiento del supuesto de normalidad (Pearson, 1931).

En cuanto al estudio de los contrastes específicos de medias, se realizó mediante el procedimiento de Scheffé, por ser el test estadístico post hoc más exigente y útil para los contrastes no planeados.

El estudio mediante series temporales autorregresivas (que es una extensión de la regresión simple), se usó para describir y prever la evolución de las diferentes observaciones temporales, llevadas a cabo cada hora (como unidad de lapsus de medición). Mediante este procedimiento se pudo comprobar la influencia de la ingesta en el pasado sobre la magnitud de la ingesta en el presente. Como indican Box et al., 2016, una serie temporal es un modelo de

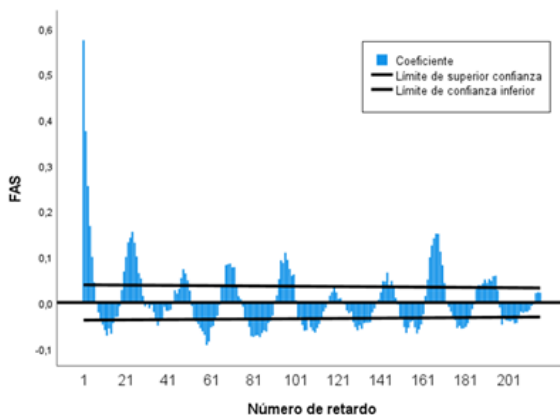
regresión en el que el analista estudia la ‘memoria’ o la ‘inercia’ temporal propia del proceso de estudio, en nuestro caso sobre la ingesta de los peces. Se asumió que la ingesta de los peces poseía una ciclicidad de 24 horas sujeta al fotoperiodo. Para el análisis se usaron retardos de las primeras 3 horas y periodos de 24 horas (24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 216), correspondiendo estos retardos horarios a sus correspondientes demoras de 1 hasta 9 días de duración (Box et al., 2016; Vandaele, 1983).

Para identificar los retardos que ha de tener una serie temporal, se ha de llevar a cabo mediante dos procedimientos complementarios, por una parte, se ha de efectuar mediante hipótesis substantivas (hipótesis sobre los retardos cíclicos de 24 horas) que dirijan la investigación (Hendry, 1995; Huckfeldt et al., 1982; Spanos, 1986), pero también sirve de gran ayuda el procedimiento inicialmente planteado por Box y Jenkins (Box et al., 2016), por el cual, primero se hace un estudio exploratorio de la serie, dibujando los datos temporales, hacienda su Función de Autocorrelación Simple (FAS) y la Función de Autocorrelación Parcial (FAP); en segundo lugar, se identifican los posibles retardos significativos de la serie; después se lleva a cabo la estimación de los parámetros de la serie con el correspondiente programa estadístico; al final se hace un análisis de residuales (Box et al., 2016; Napolitano, 2019). Uno de los procedimientos de comprobación, utilizado en series temporales, de que los residuales son ruido blanco, es mediante el test Q de (Ljung y Box, 1978); su comprobación se lleva a cabo mediante la probabilidad acumulada de un determinado retardo, si  $p > \alpha$ , los anteriores residuales forman un ruido blanco, y no presentan en conjunto autocorrelaciones significativas, si bien puede aparecer alguna de ellas por azar.

En una serie temporal, como estudio exploratorio para la formulación del modelo autorregresivo, con el fin de comprobar



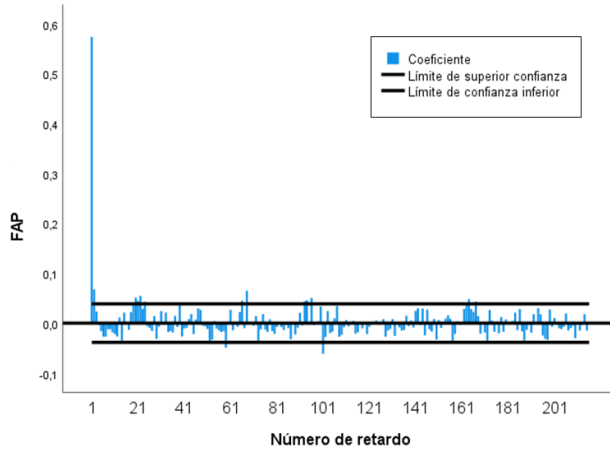
qué retardos horarios son significativos y, que por tanto, se han de incluir en la correspondiente ecuación temporal, el primer paso es obtener la FAS y la FAP, la FAS indica la correlación simple entre los valores en un momento cualquiera y el primer retardo, FAS1, el segundo retardo, FAS2, y así sucesivamente hasta llegar a FAS que no son ya significativas, un ejemplo se comprueba en la Figura 9).



**Figura 9.** Ejemplo de una Función de Autocorrelación Simple (FAS) de nuestra investigación.

La correlación parcial describe la relación lineal existente entre dos variables ( $X_1$  y  $X_2$ ) mientras se controlan los efectos de una o más variables adicionales ( $X_3$ ,  $X_4$ ,  $X_5$ ), se representa con medidas transversales o longitudinales como  $r_{X_1X_2.X_3X_4X_5}$ , y es la correlación real existente entre  $X_1$  y  $X_2$ , una vez controlados los efectos de las variables  $X_3$ ,  $X_4$  y  $X_5$ . Por decirlo de una manera más simple, la FAS da las correlaciones directas entre las variables, pero la FAP da las correlaciones reales entre dos variables, una vez extraídos los efectos de las otras variables que intervienen en la ecuación, sirviendo  $X_3$ ,  $X_4$  y  $X_5$  como variables

control de la relación entre  $X_1$  y  $X_2$ . Un ejemplo de FAP (correspondiente a la serie de la FAS de la Figura 9) es la de la Figura 10.



**Figura 10.** Ejemplo de una Función de Autocorrelación Parcial (FAP) de nuestra investigación.

Para la identificación de los retardos temporales significativos, se establece que un retardo es candidato, muy probablemente significativo, para ser incluido en la ecuación de regresión cuando es significativo en la FAS y en la FAP (saliéndose de las denominadas ‘bandas azules’ de Bartlett), y además es coherente con los supuestos de la conducta de los animales (acontecimientos inmediatos influyen más que los anteriores dentro de un mismo día, y la conducta se repite en ciclos de 24 horas). Tras realizar la identificación de los retardos que seguramente serían significativos en la serie temporal, se estimaron sus parámetros con el correspondiente programa los coeficientes en el modelo de regresión (SPSS, 2020), y se obtuvieron los diferentes coeficientes que son añadidos en la ecuación autorregresiva. En el ejemplo de

las Figuras 9 y 10 se comprueba que son candidatas los siguientes retardos:

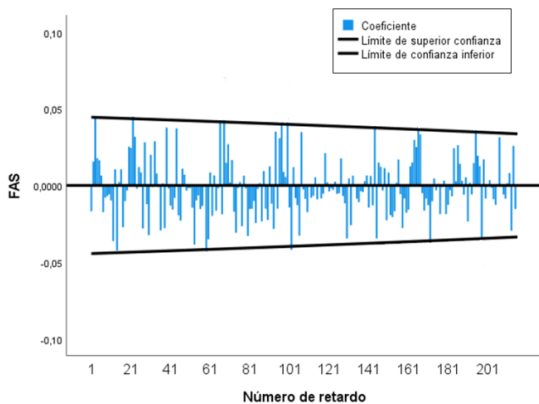
$$\begin{aligned}
 Y_h = & B_0 + B_1Y_{h-1} + B_2Y_{h-2} + B_3Y_{h-24} + B_4Y_{h-48} + B_5Y_{h-72} \\
 & + B_6Y_{h-96} + B_7Y_{h-120} + B_8Y_{h-144} + B_9Y_{h-168} \\
 & + B_{10}Y_{h-192} + B_{11}Y_{h-216} + e_h
 \end{aligned}$$

Siendo  $Y_h$  la VD; el subíndice h cualquier hora de medición durante la investigación; los valores de cada VI:  $Y_{h-k}$  (consistiendo cada valor de k en el correspondiente retardo: 1, 2, ..., 216),  $B_j$  los respectivos coeficientes estimados, y  $e_h$  el error de pronóstico de cada referida medición horaria. Una serie temporal puede ser definida como una regresión en la cual, la VD y las VIs son la misma variable, pero medida en momentos diferentes.

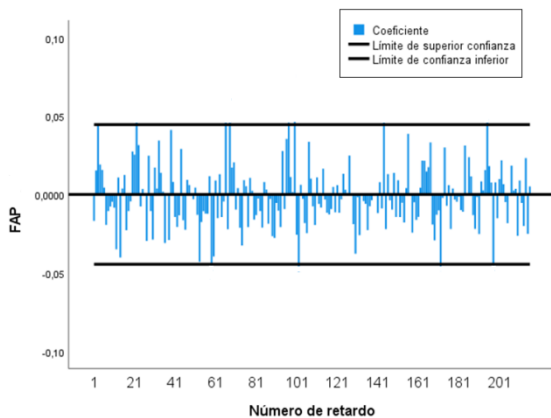
Idealmente, un buen modelo estadístico es aquel en el que el o los indicadores de conjunto son significativos, y cada uno de los coeficientes de las variables del modelo también son significativos. Como indicadores de ajuste de conjunto de los distintos modelos se tuvo en cuenta el valor del parámetro F del ANOVA de Fisher (razón entre la suma cuadrática de los valores explicados por el modelo y la suma cuadrática de los errores de pronóstico), y también el valor del parámetro  $R^2$ , que es el cuadrado del coeficiente de correlación múltiple de Pearson de cada ecuación de regresión, se suele multiplicar por el valor 100 (y se da en %), indicando el % de la variación en la VD (ingesta) que está explicado por las VIs. En un mismo análisis, los valores de F y de  $R^2$  tienen la misma probabilidad de significación (p), pero la ventaja de la  $R^2$  es que sus valores oscilan entre 0 y 1, haciendo relativamente comparables dos resultados diferentes.

El modelo de regresión en general predice la ingesta significativamente bien (puesto que la mayoría de las ANOVAs de la regresión salen significativas). Se ha tomado como valor de significación  $\alpha$  para cualquier modelo analizado, el de  $\alpha = 0.05$ , siendo este valor la magnitud crítica para el rechazo de la hipótesis de nulidad o, dicho de otro modo, como valor para admitir la significación estadística de que hay relación entre las variables, tanto en los estadísticos de conjunto de la ecuación ( $R^2$ ,  $F$  o  $t$ ), como para la significación de cada una de los distintos coeficientes de las variables del modelo ( $B_j$ ); es decir un modelo (o un parámetro) será significativo cuando se obtenga una probabilidad  $p < .05$ .

Para comprobar si una ecuación temporal era correcta, se realizó un análisis de los residuales. Para ello, se han calculado y se han hecho las figuras de las FASs y las FAPs, pero así como para modelizar se debían considerar los valores significativos, para comprobar que los residuales son aceptables, deben estar dentro de los límites de confianza superior e inferior de dicha gráfica, y del mismo modo, se comprobó en cada caso el valor del estadístico Q (Ljung y Box, 1978), considerándose que son “ruido blanco”. Esto implica que los residuales no poseen dependencia temporal, siendo correcta la ecuación inicialmente planteada (Figura 11 y 12).



**Figura 11.** Función de Autocorrelación Simple de los residuos (FAS).



**Figura 12.** Función de Autocorrelación Parcial de los residuos (FAP).

En el experimento 2 se analizaron los parámetros morfoanatómicos (SGR: Tasa de crecimiento específico) y de alimentación (VFI: Consumo voluntario; FCR: Factor de conversión de alimento) usando las fórmulas escritas a continuación.

$$\text{SGR} = \left( \frac{\ln(\text{peso final}) - \ln(\text{peso inicial})}{t} \right) * 100$$

$$\text{VFI} = \left[ \frac{\text{consumo/pez} * 100}{\text{peso inicial} + \text{peso final} / 2} \right] / t$$

$$\text{FCR} = (\text{consumo/pez}) / (\text{peso final} - \text{peso inicial})$$



# **CAPÍTULO I**

## **Estimación de los niveles de ingesta mediante sistemas de auto-demanda en la dorada**





### 3.1. Introducción

La evaluación de los niveles de ingesta en el medio acuático es compleja, debido principalmente al hábitat. El desarrollo de los sistemas de alimentación a demanda representa una forma muy versátil para el estudio del comportamiento alimenticio y la cuantificación del alimento ingerido en especies acuáticas, particularmente en los peces (Attia et al., 2012). En experimentos con animales terrestres, la cuantificación del nivel de ingesta puede obtenerse mediante la diferencia de peso entre la cantidad de alimento facilitado al inicio del experimento y el restante al final del periodo experimental. En el caso de los peces, el medio dificulta este proceso ya que el alimento no puede permanecer en el agua hasta ser cuantificado debido a su disolución/degradación. Este debe de ser, por tanto, suministrado, bien a demanda o de forma discrecional. El suministro discrecional, bien de forma manual o automática, es el elegido en muchos diseños experimentales, aunque presenta limitaciones evidentes. La primera reside en el tiempo y frecuencia de la ingesta. Ambas variables son pre-estipuladas por el investigador. La segunda, y quizás la más importante, reside en la subjetividad de la cuantificación. Normalmente, la mayor parte de estudios refieren una alimentación “*ad libitum*” que se determina en función de la saciedad aparente de los animales. Es decir, el suministro de alimento a los peces cesa cuando estos pierden interés por los pellets y empiezan a caer al fondo del tanque. Este sistema se utiliza incluso en los cultivos en jaulas marinas donde se instalan cámaras submarinas para monitorizar la actividad alimenticia de los animales. La tercera limitación refiere la interacción del investigador con los animales experimentales que siempre genera una modificación comportamental del animal asociando su presencia con los eventos de alimentación. En resumen, es el

investigador el que define la temporalidad, la frecuencia y de forma subjetiva, la cantidad de alimento suministrado además de crear un condicionamiento comportamental con su interacción con los animales.

Todas estas limitaciones pueden ser superadas mediante la utilización de sistemas de auto-demanda en los que el animal acciona un sistema de activación o sensor, que provoca la liberación controlada de alimento. Normalmente, estos sistemas permiten la modificación de la cantidad de alimento liberado, así como el registro temporal del evento de activación mediante un software asociado, lo que permite establecer el perfil temporal o ritmo de alimentación del animal. Este software puede además incluir diferentes herramientas experimentales entre las cuales destacan la limitación de la ingesta a ventanas temporales definidas por el investigador, el retraso en la liberación de alimento con referencia al tiempo de la demanda y el distanciamiento físico entre el sensor y el lugar de liberación del alimento. Estas características permiten una gran complejidad experimental cuando se requiere. Bajo estos sistemas, los animales son capaces de auto-regular su ingesta desde el punto de vista energético (Leal et al., 2013), nutricional (revisado por Fortes da Silva et al., 2016) y temporal (Sánchez-Vázquez et al., 1998) y minimizar el alimento no utilizado en sistemas de producción (Attia et al., 2012). Estos sistemas son incluso válidos en los estudios de selección de dietas donde los peces deben discriminar entre dos o más tipos de alimento en función de la composición nutricional o de su palatabilidad (Millot et al., 2012; revisado por Fortes da Silva et al., 2016). Su funcionalidad experimental se ha comprobado en diversas especies de peces incluyendo el pez cebra (del Pozo et al., 2011), la lubina (Leal et al., 2011), el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) (Oliveira et al., 2013), la perca europea (*Perca fluviatilis*) (Stejskal et al.,

2020), la tenca (*Tinca tinca*) (Herrero et al., 2005) la trucha arcoíris (Roy et al., 2020), el besugo (*Pagellus bogaraveo*) (Figueiredo-Silva et al., 2005), el carpín dorado (Sánchez-Vázquez et al., 1998), la tilapia (Toguyeni et al., 1997), el bacalao (*Gadus morhua*) (Millot et al., 2012) y la dorada (Paspatis et al., 2000; Velázquez et al., 2004; 2006; López-Olmeda et al., 2009; Montoya et al., 2012). Evidentemente, el sistema de auto-demanda no está exento de inconvenientes entre los que pueden destacarse, principalmente, la necesidad de estudios grupales, ya que muchas especies no son capaces de alimentarse en aislamiento social. Esta necesidad de interacción social para la alimentación conlleva problemas de competencia por el alimento y las jerarquías sociales que se establecen. Este es, quizás, el tendón de Aquiles del sistema de auto-demanda desde el punto de vista experimental, puesto que, en ocasiones, es difícil concretar si estamos evaluando el comportamiento alimenticio de el/los individuos dominantes, al que se adhieren en resto de congéneres por sumisión, o en realidad, evaluamos el comportamiento de todos ellos en conjunto (Millot et al., 2012). En grupos pequeños de peces solamente uno o pocos animales son los que activan el dispositivo mientras que el resto se alimenta de forma acorde/parasítica a las demandas alimenticias de los peces activos. Es decir, los peces no activos se benefician de la destreza/aprendizaje de los activos para encontrar el alimento. La competencia por el alimento puede llevar, además, a comportamientos de tipo agonísticos que deriva en agresiones (mordiscos, pérdida de escamas, daños en la cola) por la defensa del recurso (Attia et al., 2012). Este tipo de comportamiento es dependiente de la especie, así, por ejemplo, no se aprecia en grupos poco numerosos de lubinas (n=50) (Covès et al., 2006) pero sí es evidente en salmónidos (Alanärä y Brännäs, 1993; 1996).

El sistema requiere, además, de un aprendizaje que se basa en un condicionamiento operante o instrumental, en el que una determinada conducta sirve para obtener un fin concreto o recompensa. En este caso, el estímulo no condicionado será el alimento liberado tras la activación, mientras que el estímulo condicionado es el sensor. El animal realiza la asociación entre el estímulo no condicionado y condicionado de manera casual/fortuita (ensayo/error) en virtud de su interés, probablemente derivado del hambre, por un objeto flotante. Se diferencia de un condicionamiento clásico “pavloviano” en que el estímulo incondicionado (alimento) depende de la respuesta o conducta. Es decir, el animal tiene que activar el sensor, no es la mera presencia del sensor la que genera la liberación de alimento. En este tipo de condicionamiento o aprendizaje asociativo no se asocian dos estímulos como en el “pavloviano” sino que se asocia una conducta con el estímulo no condicionado, entre una respuesta y las condiciones que se derivan de ellas, es decir, las consecuencias de una respuesta determinan la probabilidad de que esta (el comportamiento) se repita (revisado por Blaser y Vira, 2014).

Nuestros estudios previos han demostrado que el sistema es perfectamente válido para la cuantificación de la ingesta y el análisis del comportamiento alimenticio en la lubina. Mediante la alimentación por auto-demanda se ha podido evaluar el efecto de los esteroides sexuales (Leal et al., 2009), el efecto del estrés y los corticoesteroides exógenos, así como el rol de la dopamina en la ingesta de la lubina (Leal et al., 2013). Aunque existen experimentos previos que demuestran la utilidad del sistema en la dorada (ver antes), quisimos corroborar la funcionalidad de nuestro sistema particular con esta especie, conocida por su voracidad.

Las últimas tendencias en la nutrición en acuicultura conllevan la sustitución de las fuentes de proteína y aceites de origen animal, derivados fundamentalmente de harinas y aceites de pescado, por proteína y aceites vegetales en la composición de los piensos de cultivo (Montoya-Camacho et al., 2019; revisado por Roques et al., 2020). Sin embargo, esta estrategia puede conllevar la inclusión de sustancias anti-nutricionales que reduzcan la palatabilidad de los piensos. En otras palabras, es muy posible que la palatabilidad conferida por las fuentes proteicas y lipídicas vegetales sea reducida y pueda provocar un descenso de los niveles de ingesta en los animales, coaccionando así, el crecimiento óptimo de la especie. Una posible solución es la inclusión de aditivos o saborizantes que hagan más atractivos los piensos vegetales, desde el punto de vista gustativo, evitando así estas reducciones en los niveles de ingesta. En vertebrados, la percepción del gusto se media, principalmente, a través de dos familias principales de receptores (T1R y T2R) pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a la proteína de guanidinio (G) que se expresan fundamentalmente en las papilas gustativas. Estas subunidades actúan de forma dimérica para formar un receptor funcional. La combinación T1R1/T1R3 forma el receptor umami que se activa por unión de L-aminoácidos y ácidos nucleicos. El heterodímero T1R2/T1R3 responde a azúcares naturales y artificiales y es, por tanto, el receptor del dulce. Por el contrario, la familia T2R se encarga de detectar los sabores amargos (revisado por Morais, 2016). En mamíferos solamente existe una copia de la subunidad T1R2, sin embargo, diferentes estudios han demostrado la existencia de diversos parálogos T1R2 en diferentes especies. Nuestros estudios desarrollados en la dorada han demostrado la existencia de 1 sola copia de T1R1 y T1R3 y seis copias de T1R2 (a-f) (Angotzi et al., 2020). En peces esta especialización no es tan evidente desde que el dímero

T1R1/T1R3 es capaz de responder a diferentes azúcares mientras que los dímeros T1R2(a-f)/T1R3 son capaces de responder eficientemente a su estimulación con diferentes L-aminoácidos (Angotzi et al., 2020). El conjunto de receptores gustativos T1R también se expresa en tejidos considerados no gustativos, como el tracto gastrointestinal y el cerebro. Su expresión intestinal ha generado lo que en inglés se conoce como “gut sensing”. Este concepto integra la regulación de la función/secreción intestinal en función de la detección gastrointestinal de diferentes macromoléculas, como son los azúcares y los aminoácidos, o mejor en función de la activación de los receptores gustativos (revisado por Morais, 2016). Nuestros estudios no publicados han demostrado la expresión de la subunidad común (T1R3) en diferentes células enteroendocrinas (colecistoquinina, grelina, etc.) sugiriendo el control nutricional de la secreción enteroendocrina vía receptores gustativos. Si los aditivos alimenticios o saborizantes, naturales o artificiales, son capaces de activar los receptores de la familia T1R es suposible que puedan regular también la función endocrina, mejorando los procesos de absorción y regulando la función central vía humoral (hormonal) o nerviosa (nervio vago).

Con el propósito de validar el sistema de control de ingesta que el grupo de investigación ha utilizado durante los últimos años, pero en esta nueva especie, desarrollamos un experimento inicial en el que comparábamos el efecto de dos fuentes diferentes de ácido butírico sobre el nivel de ingesta. Este experimento sirvió para adaptar técnicamente el sistema a la dorada y comprobar que efectivamente se podían estimar diferencias en el nivel de ingesta de esta especie. Una vez comprobado, diseñamos un nuevo experimento para evaluar el efecto de dos saborizantes sobre la ingesta y dinámica de crecimiento de los animales. Al finalizar esta experiencia, recogimos muestras tisulares para evaluar el

efecto de los saborizantes sobre la expresión oral e intestinal de los diferentes receptores gustativos.

### **3.2. Material y Métodos**

**Experimento 1.** En primer lugar, se realizó un experimento piloto diseñado para el acoplamiento de la especie, la dorada, al funcionamiento del sistema de auto-demanda, es decir, para saber si esta especie era capaz de autoalimentarse utilizando nuestro sistema de demanda y si el sistema era adecuado al comportamiento alimenticio de la especie. Para este caso, se usaron dos lotes de pienso impregnados con los compuestos 292 y 295, respectivamente. Se introdujeron 6 peces por tanque en un total de 6 tanques de 500L. Los tanques fueron sometidos a los dos tratamientos a razón de 3 tanques por tratamiento ( $n=3$  por tratamiento). El periodo experimental fue de 13 días. En el inicio del experimento, el peso medio de los peces fue de  $486,9 \pm 68,53$  g y la longitud media de  $272,7 \pm 0,96$  cm. Este experimento se realizó en circuito abierto con una temperatura media del agua de  $25,6^{\circ}\text{C}$ .

**Experimento 2.** Para el diseño del segundo experimento se usaron 12 tanques de 500 L. El peso medio de las doradas fue de  $134,43 \pm 1,39$  g y la longitud media de  $18,2 \pm 0,55$  cm. A cada dieta le fueron asignados aleatoriamente cuatro tanques (Tabla 5). La duración del ensayo fue de 23 días con una temperatura media de  $19,1^{\circ}\text{C}$ .



**Tabla 5.** Tratamientos y dosis utilizados en el ensayo y asignación de tanques experimentales.

TRATAMIENTO	PRODUCTO Y DOSIS (g/ton)	TANQUES
Basal	-	3, 7, 8, 11
Dieta A	MP09699: 2 g/kg	2, 4, 9, 10
Dieta B	MP10063: 3 g/kg	1, 5, 6, 12

Al finalizar el experimento se realizó un muestreo siendo el peso medio  $148,6 \pm 10,97$  g (dieta A  $150,50 \pm 9,15$  g; dieta B  $149,8 \pm 13,07$  g; basal  $146,3 \pm 10,7$  g) y la longitud media  $18,4 \pm 0,46$  cm (dieta A  $19,15 \pm 0,52$  cm; dieta B  $17,07 \pm 0,45$  cm; basal  $19 \pm 0,4$  cm). Se llevó a cabo la extracción de 1 ml de sangre en 10 peces por tratamiento. Dicha sangre fue combinada con 20  $\mu$ l de EDTA (ácido etilendiaminatetraacético 0.1M), para evitar su coagulación y se centrifugó durante 30 minutos a 4°C y una velocidad de 3000 revoluciones por minuto. El plasma se almacenó a -20°C. Además, se realizó la disección de diferentes tejidos (labios, paladar, branquias, intestino anterior, medio y posterior), siendo almacenados a -80°C para el posterior análisis del nivel de expresión de los receptores del gusto (T1R).

### **Análisis de expresión génica de receptores gustativos.**

Mediante PCR cuantitativo en tiempo real (PCR CFX384 de Biorad) se determinaron los niveles de expresión de los T1R (T1R1, T1R2a, T1R2b, y T1R3). Se extrajo el ARN total de los tejidos mediante el Maxwell® 16 LEV simplyRNA Tissue Kit (Promega) tal como indica el proveedor. Posteriormente se precipitó el RNA, añadiendo 1/10 de volumen total de acetato de sodio y 2,5 X del volumen total de etanol 100%. Tras permanecer toda la noche a -80°C, se volvió a lavar con etanol 80% y se disolvió el pellet en 30  $\mu$ l de agua. Posteriormente se sometió a un

tratamiento con DNAsa I mediante TURBO DNA-*free*<sup>TM</sup> Kit (Invitro) donde tras incluir 1  $\mu$ l de DNase enzyme e incubar 30 minutos a 37°C se añadieron 3  $\mu$ l DNase Inactivation Reagent tal y como indica el proveedor.

Para la transcripción inversa, partimos de 1  $\mu$ g de RNA total al que se añadió la transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen) y los oligo (dT) 12-18 (Invitrogen).

Los ADNc fueron almacenados a -20°C para el análisis de qPCR. Cada reacción comprendía 12.5  $\mu$ l 2xSYBR Green PCR Master Mix (Thermo-Fisher), 2  $\mu$ l cebadores, 10  $\mu$ l ADNc y 0.5  $\mu$ l de agua libre de nucleasas con un volumen final de 25  $\mu$ l.

Las condiciones de la qPCR fueron las siguientes: 50°C durante 2 minutos; 95°C durante 10 minutos; 95°C durante 15 segundos; 60°C durante 1 minuto; 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos; Curva de Melting de 60°C a 92°C con un incremento de 0.2°C cada segundo. El gen de referencia EF2.2 (“elongation factor” 2.2) fue usado para normalizar la expresión de nuestros genes. Los niveles de expresión fueron calculados mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak et al., 2001) donde la Ct nos indica a partir de que ciclo se detecta la fluorescencia por encima del ruido de fondo,  $\Delta Ct$  marca la diferencia entre el Ct del gen estudiado y del gen de normalización y, finalmente,  $\Delta\Delta Ct$  muestra la diferencia entre el  $\Delta Ct$  de nuestro grupo experimental y el grupo de referencia. Cada muestra fue analizada por duplicado.

**Tabla 6.** Secuencia de los cebadores usados en la amplificación de los receptores del gusto.

NOMBRE	SECUENCIA (5' - 3')
<b>T1R1-QPCR (F)</b>	GGAATGCAAAGCTTAACCACGC
<b>T1R1-QPCR (R)</b>	ACTGAATTTTTTCCTTGCTGGAGAA
<b>T1R2a-QPCR (F)</b>	AGGAGTGATTGTTGAGATCATTCTGC
<b>T1R2a-QPCR (R)</b>	ACTCAATGAGAGCTTCAGCAGTCAAT
<b>T1R2b-QPCR (F)</b>	CACTTACATAAGCACTGAAACACGGACTG
<b>T1R2b-QPCR (R)</b>	CATCTATGTTAAGGAAAGAAACCCAGCG
<b>T1R3-QPCR2 (F)</b>	GGAGACATTATCCTCGGAGGGCTCT
<b>T1R3-QPCR2 (R)</b>	TTCCGAGCTATAAGGACCGATCACGGCT
<b>EF2-QPCR (F)</b>	TGCACAAAAGTACCGTTGTGACCTG
<b>EF2-QPCR (R)</b>	CGATGTTACCACATGGCACATCTC

T1R (Taste Receptor), EF2 (elongation factor 2), F (forward) y R (reverse).

### 3.3. Resultados

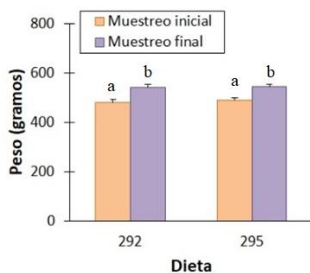
#### 3.3.1. Puesta a punto usando fuentes alternativas de ácido butírico 292 y 295.

En esta experiencia, 36 doradas de distribuyeron en 6 tanques de forma que cada unidad experimental quedó compuesta por un tamaño poblacional de 6 individuos. Durante 13 días se alimentó a los animales con dos dietas diferentes (292 y 295), como previamente ha sido descrito (ver material y métodos general).

Los análisis estadísticos y las figuras fueron realizadas, tanto con las demandas como con la ingesta (gramos), para corroborar que ambas medidas son iguales a la hora de obtener los resultados experimentales. Millot (2012) reportó que una mayor actividad en un comedero implica una preferencia por un alimento.

Se realizaron dos muestreos para estimar el peso de los animales, uno al inicio y otro al finalizar el periodo experimental. En la

tabla 7, se muestran los datos recogidos y de los que se puede concluir que las dietas experimentales no indujeron diferencias significativas en peso tras el periodo experimental.



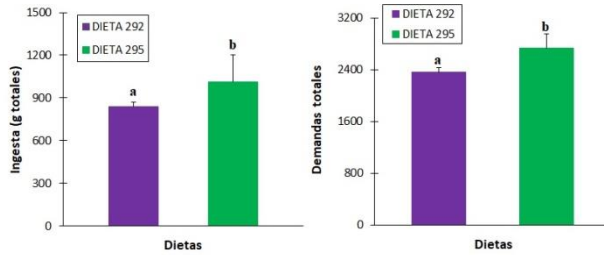
**Figura 13.** Muestreo inicial y final de las dietas experimentales, mostrando diferencias significativas (representadas con las letras a y b para  $p < 0.05$ ), analizado mediante una t-Student.

**Tabla 7.** Muestreo inicial y final del periodo de experimentación.

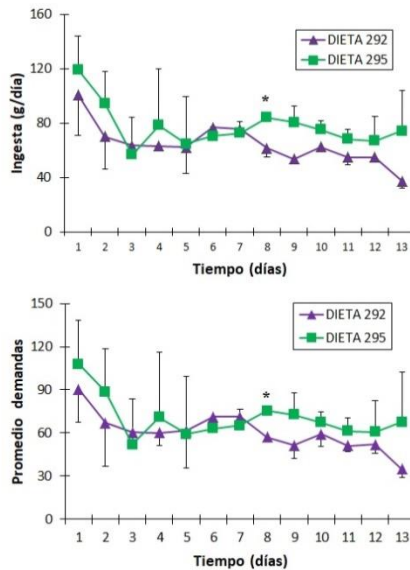
Dieta	Peso Inicial (g)	SEM	Peso Final (g)	SEM	Diferencia de peso (g)
292	482.1	10.8	543.2	11.9	61.1
295	491.7	8.8	546.9	9.3	55.2

SEM: Error estándar de la media

Sin embargo, los peces alimentados con la dieta 295 demandaron e ingirieron más alimento que aquellos alimentados con la dieta 292 (Fig. 14).



**Figura 14.** Ingesta y demandas totales de las dietas 292/295, analizado mediante una T-Student mostrando diferencias significativas (representadas con las letras a y b para  $p < 0.05$ ).

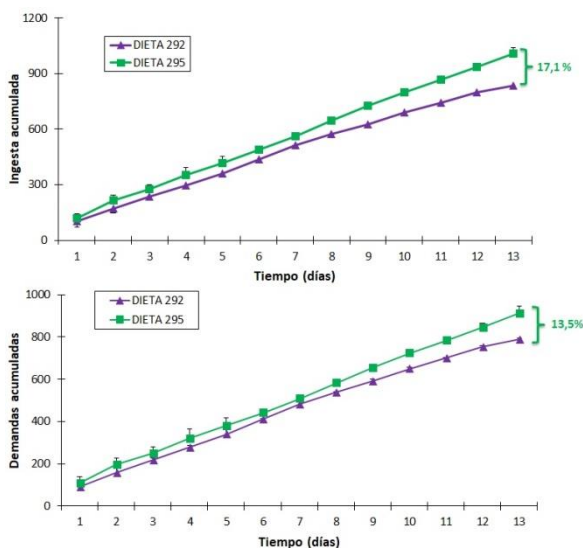


**Figura 15.** Evolución del consumo medio y demandas de las dos dietas experimentales a lo largo del periodo experimental.

El análisis diario de las demandas/ingesta revela que las diferencias significativas aparecen, principalmente, a partir del séptimo día (Fig. 15) aunque el análisis estadístico no reveló diferencias significativas para la interacción dieta x día. Estas

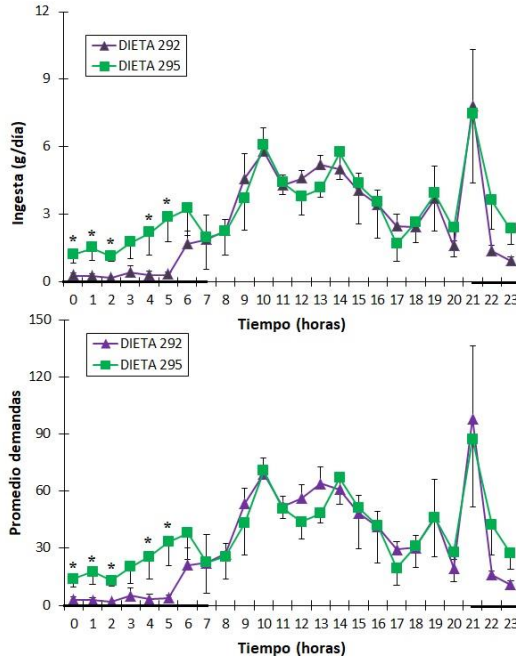
diferencias se producen realmente por una reducción en la ingesta de los peces alimentados con la dieta 292.

Las demandas acumuladas mostraron una progresión en paralelo durante la primera semana experimental, siendo la dieta 295 la que mayores demandas registró, no obstante, a partir del octavo día, las diferencias entre ambas dietas se incrementaron debido a una disminución de las demandas de los peces alimentados con la dieta 292. Este resultado es claramente visible en las gráficas de la figura 16.



**Figura 16.** Ingesta y demandas acumuladas a lo largo del periodo experimental.

La figura 17 muestra los ritmos diarios de alimentación. El análisis estadístico muestra la ausencia de diferencias significativas en la interacción dieta x hora, sin embargo es cierto que los peces alimentados con la dieta 295 muestran mayor actividad alimenticia durante el periodo nocturno.



**Figura 17.** Ritmo diario de ingesta en las doradas con las dietas 292 y 295. El área negra de la parte inferior representa la fase oscura del fotoperiodo.

Los datos del análisis aplicado, rindieron la siguiente ecuación para la dieta 292:

$$\begin{aligned}
 Y_h = & 0.014 + 0.163 Y_{h-1} + 0.272 Y_{h-24} + 0.039 Y_{h-48} + 0.029 Y_{h-72} \\
 & + 0.029 Y_{h-96} + 0.18 Y_{h-120} + 0.028 Y_{h-144} \\
 & + 0.065 Y_{h-168} - 0.063 Y_{h-192} + 0.099 Y_{h-216}
 \end{aligned}$$

La  $R^2$  fue de 0.437, lo que significa que las variables introducidas (demandas) en la regresión representan el 43.7 % de la variación de la ingesta.

La ecuación resultante para la dieta 295 fue:

$$Y_h = 0.48 + 0.193 Y_{h-1} + 0.079 Y_{h-24} + 0.167 Y_{h-48} + 0.116 Y_{h-72} \\ - 0.056 Y_{h-96} + 0.002 Y_{h-120} + 0.042 Y_{h-144} \\ + 0.093 Y_{h-168} - 0.009 Y_{h-192} + 0.142 Y_{h-216}$$

Las variables introducidas, en este caso, representaban un 24.6 % ( $R^2= 0.246$ ) de la variación de la ingesta. En ambos casos, el consumo de las dietas se vio influenciado por lo que comieron hasta 9 días antes, por lo que ambos grupos tuvieron la misma memoria a nivel de ingesta. Pese a tener la misma memoria, la variable de la dieta 292 explicó un 20% más de la variación en la ingesta. Se comprobaron para las dietas que los residuales fueron ruido blanco tal como se menciona en el apartado 2.4. Mediante la aplicación del análisis GLM se encontraron diferencias significativas entre las variables estudiadas (dieta, día y hora), en cambio, para las interacciones estudiadas sólo resultó significativa la interacción día x hora (Tabla 8).

**Tabla 8.** Resultado del análisis de las variables de estudio y sus interacciones usando el análisis GLM.

	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	13039,29	347	37,58	2,92	,000
Intersección	16331,22	1	16331,22	1267,19	,000
Dieta	137,23	1	137,23	10,65	,001
Día	573,88	12	47,823	3,71	,000
Hora	5890,74	23	256,12	19,87	,000
Día * hora	5869,58	276	21,27	1,65	,000
Dieta * día	134,14	12	11,18	,87	,580
Dieta * hora	433,72	23	18,86	1,46	,072
Error	19640,84	1524	12,89		
Total	49011,36	1872			
Total corregido	32680,14	1871			

GLM (Modelo Lineal General), gl (grados de libertad), F (estadístico de la prueba) y Sig. (significación).



### 3.3.2. Estimación del efecto de diferentes saborizantes sobre la ingesta utilizando piensos de sustitución vegetal.

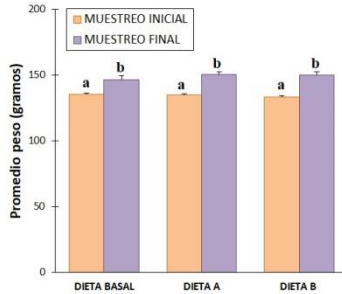
En esta experiencia, 9 peces se distribuyeron en los 12 tanques experimentales durante 23 días y se realizaron 4 réplicas por dieta experimental (Basal, Dieta A y Dieta B).

Para poder realizar el cálculo de los parámetros morfoanatómicos y de alimentación, se realizó un muestro al inicio del experimento y otro al final en los cuales se registraron los pesos y tallas de todos los animales (Tabla 9), mostrando diferencias entre los pesos iniciales y finales de cada una de las dietas (Fig. 18).

**Tabla 9.** Muestreo inicial y final del periodo de experimentación.

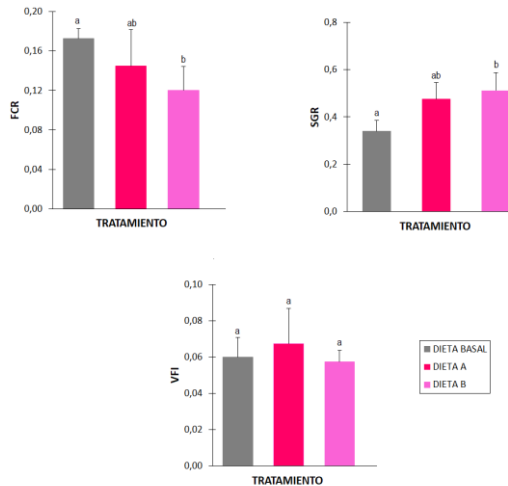
<b>Dieta</b>	<b>Peso Inicial (g)</b>	<b>SEM</b>	<b>Peso Final (g)</b>	<b>SEM</b>	<b>Diferencia de peso (g)</b>
Dieta basal	135.22	2.69	146.25	3.03	11.02
Dieta A	134.92	2.79	150.5	2.02	15.57
Dieta B	133.15	1.89	149.82	2.94	16.67

Los tres grupos experimentales partieron de unos pesos iniciales sin diferencias entre ellos. Al final del periodo experimental tampoco se registraron diferencias de peso entre los animales alimentados con las diferentes dietas experimentales.



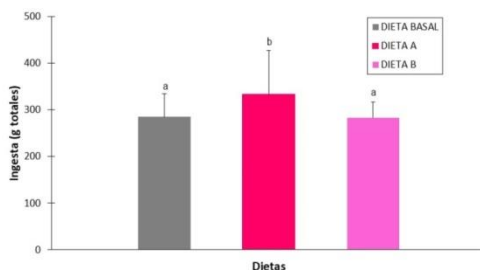
**Figura 18.** Gráfico obtenido de los muestreos inicial y final en cada una de las dietas.

Tras el cálculo de los diferentes parámetros morfoanatómicos y de alimentación, solamente se encontraron diferencias significativas en SGR y FCR entre los peces alimentados con dieta basal y a los que se les suministró la dieta B, sin embargo, dichas diferencias no existieron en el estudio del VFI (Fig. 19).



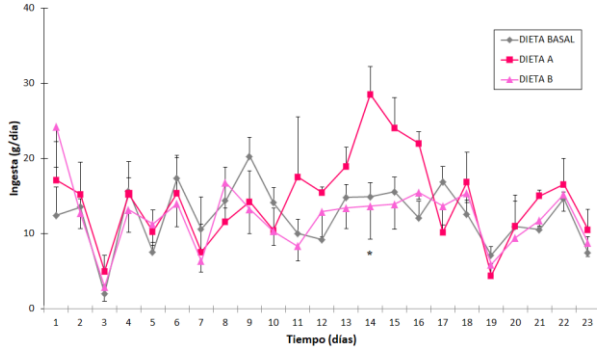
**Figura 19.** Parámetros morfoanatómicos y alimenticios. SGR (Tasa de crecimiento específico), VFI (Consumo voluntario) y FCR (Factor de conversión de alimento).

La figura 20, indica que los peces alimentados con la dieta A ingirieron significativamente más alimento que el resto de grupos experimentales, ya que entre la dieta basal y la dieta B no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas (mostrado en los resultados estadísticos de la tabla 10).



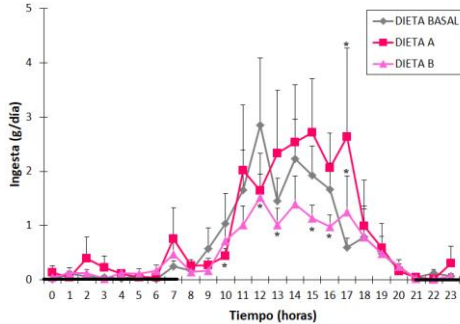
**Figura 20.** Diferencias (representadas con las letras a y b, para  $p < 0.05$ ) en la ingesta de las tres dietas, analizado mediante un análisis univariado usando Scheffé como *Post Hoc*.

Las demandas diarias quedaron registradas durante todo el periodo experimental, de forma que mediante la tasa de liberación de cada comedero pudimos calcular la ingesta diaria de cada tanque. La gráfica siguiente (Fig. 21) revela que mientras que los peces alimentados con la dieta B y la dieta basal ingirieron una media de (12.36 g/día), los peces alimentados con la dieta A elevaron significativamente los niveles de ingesta diaria alcanzando los (14.51 g/día). Además, en ella se observa una similitud en la ingesta diaria en todos los tratamientos, sin embargo, durante un periodo de 7 días que comprende desde el onceavo al dieciseisavo día de experimentación, los peces alimentados con la dieta A incrementaron notablemente su ingesta diaria con respecto a los otros dos grupos experimentales.



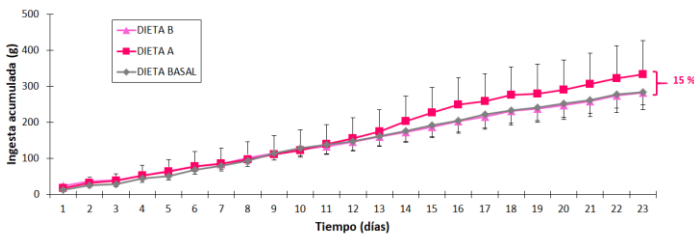
**Figura 21.** Evolución del consumo diario de las tres dietas a lo largo del experimento (días).

Teniendo en cuenta los ritmos circadianos de alimentación, se observó una preferencia de los peces por alimentarse durante la fase lumínica en todas las dietas empleadas. Durante el periodo de oscuridad se encontraron perfiles similares independientemente de la dieta proporcionada, sin embargo, en la fase luminosa se dio un aumento de la ingesta con una ligera diferenciación en el perfil de alimentación dependiendo de la dieta suministrada. Los peces alimentados con la dieta basal y la dieta B, presentaron perfiles similares observándose un pico de ingesta a las 11 horas, sin embargo, los peces alimentados con la dieta A registraron un retraso de dicho pico a las 15 horas, ampliándose el rango de mayor ingesta durante las horas (13-17), como muestra la figura 22.



**Figura 22.** Ritmo diario de ingesta de las tres dietas. El área negra de la parte inferior de la figura representa la fase oscura del fotoperiodo.

En la figura 23, se muestra la ingesta acumulada durante todo el periodo experimental, observándose que mientras los peces alimentados con la dieta basal y la dieta B siguieron el mismo patrón de ingesta en el tiempo, a partir del día 13 los peces alimentados con la dieta A comenzaron a incrementar su ingesta, consumiendo una mayor cantidad de alimento durante todos los días restantes hasta el final de la experiencia.



**Figura 23.** Niveles de ingesta acumulados entre las diferentes dietas durante todo el periodo experimental. Teniendo la dieta B y Basal un nivel de 283.5 gramos aproximadamente mientras que la dieta A llegaría a 333.7 gramos.

Tras analizar los niveles de ingesta durante todo el experimento, se realizó un estudio de las series temporales mediante regresión (ver material y métodos general). Así, se concluyó que, en el caso de la dieta basal, la cantidad de pienso que comían cada día dependía de lo que comían 2 horas antes y hasta 9 días antes, por tanto, la ecuación quedó como sigue:

$$\begin{aligned}
 Y_h = & 0.044 + 0.106 Y_{h-1} + 0.083 Y_{h-2} + 0.114 Y_{h-24} + 0.097 Y_{h-48} \\
 & + 0.03 Y_{h-72} + 0.147 Y_{h-96} + 0.077 Y_{h-120} \\
 & + 0.033 Y_{h-144} + 0.069 Y_{h-168} + 0.039 Y_{h-192} \\
 & + 0.047 Y_{h-216}
 \end{aligned}$$

Las variables introducidas para la dieta basal representaron un 28.9 % ( $R^2= 0.289$ ) de la variación de la ingesta. Para la dieta A, se obtuvo que la ingesta de cada día dependió de lo que habían comido desde 2 horas hasta 7 días antes, quedando la ecuación siguiente:

$$\begin{aligned}
 Y_h = & 0.049 + 0.381 Y_{h-1} + 0.06 Y_{h-2} + 0.113 Y_{h-24} + 0.024 Y_{h-48} \\
 & + 0.079 Y_{h-72} + 0.04 Y_{h-96} + 0.091 Y_{h-120} \\
 & + 0.04 Y_{h-144} + 0.094 Y_{h-168}
 \end{aligned}$$

Las variables explicaban un 39.1 % ( $R^2= 0.391$ ) de la variación de la ingesta. Finalmente, la dieta B, se vio influenciada por lo que habían comido desde 1 hora hasta 9 días antes.

$$\begin{aligned}
 Y_h = & 0.035 + 0.097 Y_{h-1} + 0.199 Y_{h-24} + 0.134 Y_{h-48} + 0.047 Y_{h-72} \\
 & + 0.151 Y_{h-96} + 0.112 Y_{h-120} + 0.042 Y_{h-144} \\
 & + 0.112 Y_{h-168} + 0.078 Y_{h-192} - 0.056 Y_{h-216}
 \end{aligned}$$

En este caso, las variables explicaban un 42% ( $R^2= 0.42$ ) de variación de la ingesta.

Tras la realización de las tres series, se percibió que los peces alimentados con dieta A poseían una menor memoria a nivel de ingesta, ya que sólo llegaban a los 7 días y no a los 9 días como fue en la dieta B y la basal.

Una vez realizado el análisis estadístico, se vio que tanto las variables principales como sus interacciones fueron estadísticamente significativas, como se muestra en la siguiente tabla 10.

**Tabla 10.** Resultados del análisis univariado para las variables principales y sus interacciones.

	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	3771,95	643	5,86	4,64	,000
Intersección	1967,25	1	1967,25	1556,11	,000
Día * hora	1036,25	506	2,04	1,62	,000
Día * dieta	78,56	44	1,78	1,41	,038
Hora * dieta	213,63	46	4,64	3,67	,000
Día	170,73	22	7,76	6,13	,000
Hora	2260,95	23	98,31	77,75	,000
Dieta	11,81	2	5,91	4,67	,009
Error	7559,97	5980	1,26		
Total	13299,18	6624			
Total corregido	11331,92	6623			

Tras la realización del análisis estadístico, se procedió a realizar los *Post Hoc*, donde se pudo ver entre qué dietas exactamente existían esas diferencias estadísticas (tabla 11). Dicho test concluyó que la dieta A es la única que obtuvo diferencias significativas a nivel de ingesta respecto a las otras dos dietas.

**Tabla 11.** Resultados del análisis de los *Post Hoc* (Scheffé).

Dietas	Dietas	Diferencias de medias	Desv. Error	Sig.
Basal	Dieta a	-,087	,0338	,034
	Dieta b	,003	,0338	,995
Dieta a	Basal	,087	,0338	,034
	Dieta b	,091	,0338	,027
Dieta b	Basal	-,003	,0338	,995
	Dieta a	-,091	,0338	,027

Desv. (desviación).

### 3.3.3. Expresión de receptores gustativos

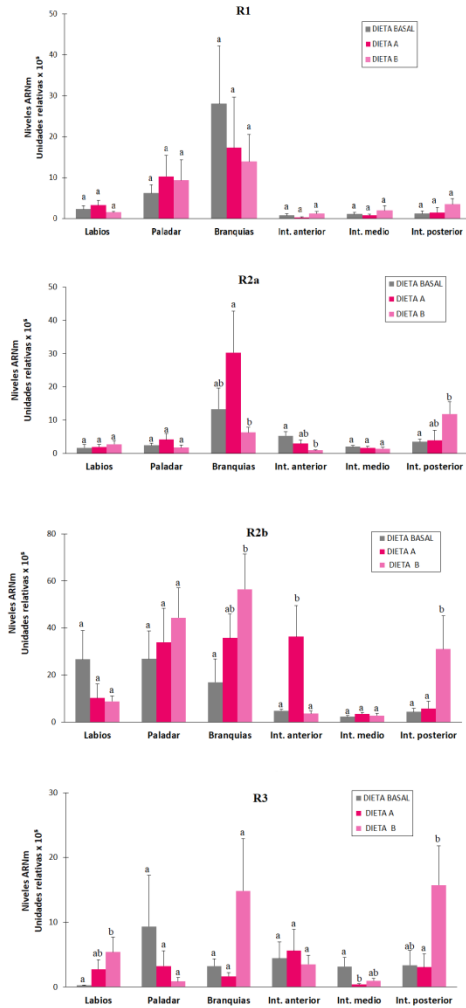
Una vez obtenidas diferencias significativas en la ingesta entre las dietas experimentales, procedimos al estudio de la expresión génica de algunos receptores del gusto (T1R1, T1R2a, T1R2b y T1R3) en diversos tejidos con el objetivo de comprobar el efecto de los saborizantes sobre la expresión tisular de estos receptores.

El gen T1R1 se expresó con mayores niveles en el paladar y las branquias en todas las dietas testadas, aunque como consecuencia de la dispersión de los datos, no se obtuvieron diferencias significativas entre los datos. No obstante, hubo diferencias entre las dietas, siendo la mayor expresión del T1R1 en las branquias. Los niveles de expresión del gen T1R2b, presentaron diferencias tanto en los tejidos como en las dietas. En los labios, los peces alimentados con la dieta basal expresaron mayores niveles de este gen que los peces a los que se suministraron las otras dos dietas. Tanto en el paladar como en las branquias, las dietas experimentales elevaron los niveles de ARNm de dicho gen con respecto a la dieta basal. Es importante remarcar que mientras que en el intestino anterior la dieta A fue capaz de incrementar la expresión génica de T1R2b, en el intestino posterior fue la dieta B la causante de dicho efecto. T1R2a se expresó débilmente en



todos los tejidos, no habiendo diferencias entre los tejidos. Sin embargo, si hubo diferencias significativas entre las dietas. La dieta B fue capaz de incrementar los niveles de expresión de dicho gen el intestino posterior.

Finalmente, el gen T1R3 se expresó de manera diferente dependiendo tanto de la dieta como de los tejidos analizados. Así, la dieta basal presentó mayores niveles en el paladar e intestino medio respecto a las otras dos dietas, mientras que en el intestino anterior todas las dietas presentaron similares valores de expresión de dicho gen. Se observó un incremento muy acusado en la expresión de dicho gen en las branquias e intestino posterior como consecuencia del suministro de la dieta B, sin embargo, dicho efecto se obtuvo de forma menos abrupta en los labios, en los que la dieta A también indujo un incremento más débil pero que fue significativo con respecto a los basales.



**Figura 24.** Expresión génica mediante PCR en tiempo real para los receptores del gusto (T1R1, T1R2a, T1R2b y T1R3). Tejidos usados para la expresión génica: labios, paladar, branquias, Int. Anterior (Intestino Anterior), Int. Medio (Intestino Medio) e Int. Posterior (Intestino Posterior).

### 3.4. Discusión

El desarrollo de piensos funcionales cuyos ingredientes pueden mejorar la fisiología del organismo, además de cubrir los aspectos nutricionales específicos de cada especie, es un campo activo de investigación y desarrollo comercial. El acercamiento de la acuicultura hacia la sostenibilidad ambiental ha llevado a la inclusión de materias primas alternativas, principalmente de carácter vegetal, en la formulación de los piensos. Estas alternativas pueden modificar la palatabilidad de los piensos generando un rechazo gustativo que conlleva una disminución de la tasa de ingesta y por extensión un detrimento en la tasa de crecimiento que se traduce en una menor eficiencia productiva (revisado por Gatlin et al., 2007). El uso de saborizantes que puedan superar estos efectos negativos de la sustitución sobre la palatabilidad de las dietas se propone como una solución al problema. Estos compuestos son también de gran utilidad en el desarrollo de piensos medicamentosos, que generalmente producen un rechazo en los peces debido a sus sabores amargos (revisado por Kasumyan y Doving, 2003). De todos es conocida la adición de aditivos por las empresas farmacéuticas a los diferentes medicamentos líquidos, o jarabes, que intentan mejorar su sabor y aceptabilidad por el público.

Nuestro primer objetivo fue validar las instalaciones disponibles en el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal para el desarrollo de la metodológica experimental mediante el uso de dos fuentes diferentes de butirato. Nosotros utilizamos los sistemas que previamente testamos en el estudio del comportamiento alimenticio de la lubina (Leal et al., 2009; 2011; 2013). Estudios previos realizados en otros laboratorios ya habían demostrado que la dorada puede adaptarse fácilmente a sistemas de auto-demanda (Paspatis et al., 2000; Velázquez et al., 2004; 2006; Montoya et

al., 2011) y esto no fue una excepción en nuestro sistema. A diferencia de la lubina, pudimos constatar la mayor agresividad de la dorada en sus demandas, lo que nos obligó a mejorar la resistencia de los sensores a la rotura. Los resultados demuestran la validez del sistema de ingesta, en función de la detección de diferencias significativas de ingesta entre las dos dietas, 292 y 295, incluso en periodos experimentales reducidos (13 días). Los animales mostraron un perfil de alimentación diurno con el mayor porcentaje de las demandas realizadas durante la fase luminosa. El tratamiento (292 vs 295) no modificó los perfiles de alimentación. El carácter diurno de la dorada ha sido ya reportado en diferentes estudios (Paspatis et al., 2000; Velázquez et al., 2004; López-Olmeda et al., 2009; Montoya et al., 2012), aunque parece presentar modificaciones sensibles acordes a la época del año (Velázquez et al., 2004). En nuestros experimentos iniciales detectamos un pico de alimentación, en ambos grupos experimentales, coincidiendo con el apagado de las luces.

La mejora en las tasas de ingesta y crecimiento promovidas por diferentes saborizantes o atrayentes, de carácter natural o químico, se ha demostrado en diferentes especies de peces. Los peces cebra son capaces de aumentar su ingesta tras la adición de un fruto (*Citrus tachibana*) pulverizado en el pienso (Yamada et al., 2020) Algo similar a lo que ocurre en salmón atlántico (*Salmo salar*) tras la inclusión de extractos de un alga marrón (Kamunde et al., 2019). En la lubina europea, la adición de una mezcla de aminoácidos basada en la composición de un extracto tisular del manto de cefalópodos mejora significativamente la ingesta voluntaria de animales alimentados con dietas ricas en soja (Dias et al., 1997). De forma similar, los hidrolizados de carne de pescado estimularon la ingesta en el lenguado senegalés, pero no así los hidrolizados de poliqueto, mejillón y manto de cefalópodo (Barroso et al., 2013). En la lubina americana (*Morone saxatilis*)

una mezcla de aminoácidos y nucleótidos también fue capaz de estimular la ingesta y mejorar el crecimiento de animales alimentados con piensos de base vegetal (Papatryphon et al., 2001). Nuestros resultados muestran que los aditivos A y B estimulan la ingesta y la tasa de crecimiento, respectivamente en la dorada. Parece paradójico que el aditivo B pueda promocionar el crecimiento sin aumentar la tasa de ingesta de los animales, sin embargo, resultados similares se han publicado en juveniles de cobia (*Rachycentron canadum*) donde la inclusión de un hidrolizado proteico comercial no estimuló la ingesta de animales alimentados con dietas basadas en soja, pero sí mejoró el crecimiento y la conversión alimenticia (Trushenski et al., 2011). Paralelamente, nuestros resultados muestran que los animales alimentados con la dieta B mejoraron su tasa de conversión alimenticia y la tasa de crecimiento. Los autores sugirieron que la mejora en la conversión alimenticia se produce gracias a una reducción en el gasto energético asociado a las mejoras inducidas por la administración de betaína, presente en el atrayente comercial, de la osmorregulación que resulta en un excedente energético que se traslada a crecimiento. Alternativamente, esta mejora puede producirse también por una mejora en las reacciones bio-sintéticas incluyendo las implicadas en el metabolismo de los aminoácidos (Trushenski et al., 2011). Por motivos de confidencialidad empresarial, nosotros no conocemos la composición de estos aditivos y las comparaciones con otras especies desde el punto de vista químico o quimiosensorial son, por lo tanto, difíciles, así como la consecución de conclusiones de carácter más básico.

Por el contrario, la dieta A fue capaz de estimular la ingesta sin mejorar en el crecimiento, de hecho, la tasa de conversión alimenticia fue la más elevada de las tres dietas. Podemos sugerir que bien la extensión del experimento no fue suficiente para

traducir esas mejoras de ingesta en crecimiento, o bien, que algún componente del aditivo provoca un aumento de la tasa o desregulación metabólica que genera un gasto energético extra en detrimento del crecimiento. Es decir, desde el punto de vista de la acuicultura, lo realmente importante es estimular el crecimiento disminuyendo o manteniendo las tasas de conversión. Aumentar los niveles de ingesta sin traducción en mejoras de crecimiento, como en el caso de la dieta A, es, de hecho, contraproducente para el sistema productivo.

Como en el experimento anterior, todos los grupos mantuvieron un comportamiento de ingesta diurno y la composición de la dieta no modificó, a grandes rasgos, el perfil de ingesta diario. A diferencia del experimento previo, no apareció un pico de ingesta coincidiendo o cercano al apagado de las luces lo que viene a corroborar la existencia de sensibles modificaciones del patrón de ingesta durante la fotofase que pueden estar asociadas al periodo experimental o a algún parámetro ambiental (Velázquez et al., 2004) que no ha sido debidamente controlado. El mayor número de demandas estuvo concentrado en el intervalo 11.00-16.00 h. La ausencia de demandas nocturnas en nuestros experimentos y en otros desarrollados por otros grupos de investigación (Paspatis et al., 2000; Velázquez et al., 2004; 2006; López-Olmeda et al., 2009; Montoya et al., 2012) revela el carácter estrictamente diurno de la ingesta que dota a la especie de excelentes propiedades para el cultivo desde el punto de vista empresarial, ya que no es necesario invertir recursos en la alimentación nocturna de los animales. Otras especies como la lubina presentan un comportamiento dual, es decir, los animales pueden cambiar su comportamiento alimenticio de diurno a nocturno y viceversa sin un motivo conocido (Sánchez-Vázquez et al., 1995).

Experimentos realizados en cultivo extensivo sugirieron que la lubina mantiene un patrón de alimentación nocturno durante el invierno que cambia a diurno durante el periodo estival (Sánchez-Vázquez et al., 1998). A diferencia de la dorada, su correcta alimentación, ajustándose a sus ritmos circa-anales, debería restringirse al periodo nocturno durante el invierno. La alimentación fuera de sus fases fisiológicas podría provocar descensos en la efectividad de crecimiento.

Por tanto, la mejora de las características organolépticas de los piensos que potencien la ingesta debe ir de la mano con mejoras en el crecimiento y la tasa de conversión alimenticia. En esas condiciones, la caracterización de sustancias que mejoren esa calidad organoléptica de los piensos puede ser crucial para la acuicultura.

La detección del gusto en vertebrados en mediada, en parte, a través de los receptores gustativos de la familia 1 (T1R). Nuestros trabajos no incluidos en esta tesis doctoral, han caracterizado, desde el punto de vista molecular y farmacológico, los diferentes receptores gustativos de la dorada (Angotzi et al., 2020). La modulación de la expresión funcional de estos receptores es capaz de adaptar la respuesta del animal a los diferentes sabores, es decir, es capaz de ajustar el umbral sensorial que presenta el animal frente a los estímulos de tipo gustativo y olfatorio. Experimentos desarrollados en *Drosophila* han demostrado que el estado nutricional y energético del animal es capaz de modular la potencia de la percepción quimiosensorial de los estímulos alimenticios. Así, las señales olfatorias y gustativas de los alimentos preferidos son potenciadas en los animales hambrientos y disminuidas en animales saciados (Guo et al., 2021). Este mecanismo se media a través del control neural, vía neuronas colecistoquinina (CCK), de la expresión de receptores gustativos. En vertebrados también se ha descrito la regulación de la

sensibilidad gustativa, fundamentalmente por sistemas hormonales implicados paralelamente en la regulación energética de la ingesta, como la leptina y los endocannabinoides (Yoshida et al., 2013). Bajo este escenario es lógico pensar que uno de los mecanismos de acción de los saborizantes pueda ser la regulación de los receptores gustativos, y bajo esta hipótesis, medimos su expresión en diferentes tejidos de la cavidad oral y del tracto gastrointestinal. Los experimentos de qPCR demostraron que la dieta B estimula de expresión de los receptores R2b (branquia) y R3 (labios) en la cavidad oral mientras que la dieta A no tiene efecto sobre la expresión de receptores en la cavidad oral. Por el contrario, la dieta A estimula la expresión de R2b en el intestino anterior, pero reduce la de R3 en la sección media de este. La dieta B estimula consistentemente la expresión de R2a, b y R3 en el intestino posterior. Sugerentemente la dieta B no induce mayores niveles de ingesta, pero mejora la tasa de conversión y SGR y este efecto podría ser mediado por el efecto consistente sobre la expresión de receptores gustativos en el intestino posterior. De hecho, nuestros estudios morfológicos, mediante hibridación *in situ*, han revelado la presencia de receptores gustativos a lo largo de todo el tracto gastrointestinal de la dorada y su co-expresión con diferentes sistemas neuroendocrinos (Angotzi R, Puchol S, Morais S y Cerdá-Reverter JM, datos no publicados). Por tanto, podríamos especular que los aditivos presentes en la dieta B modifican la actividad de los sistemas entero-endocrinos mediante la estimulación de la expresión de receptores gustativos en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, los aumentos de expresión de receptores gustativos en la cavidad oral no conllevan modificaciones en la ingesta. En función de la farmacología de los receptores gustativos uno podría pensar que son los sabores dulces, a través del dímero R2/R3, los que median los efectos de la dieta B, sin embargo, nuestros experimentos han



demostrado la mayor promiscuidad de activación de los receptores de la dorada, y en general de peces, en los que no solamente los compuestos “dulces” estimulan el receptor dimérico R2/R3, sino que los compuestos umami son también capaces de regular la expresión funcional de estos receptores. Finalmente, si la modificación de la expresión de receptores por la dieta A debe explicar el aumento de ingesta experimentado tras su administración está debería medirse a nivel intestinal ya que únicamente induce cambios en el intestino anterior e intermedio. Una hipótesis es que estos receptores potenciasen la expresión de hormonas orexigénicas como la grelina (Unniapann et al., 2002) o inhibiesen la expresión y/o liberación de hormonas gastrointestinales anorexigénicas como la CCK (revisado por Volkoff et al., 2005).



# **CAPÍTULO II**

## **Sistema de selección alternativa de piensos (dual-choice)**



## 4.1. Introducción

El condicionamiento operativo/instrumental, también denominado aprendizaje instrumental, se ha utilizado para diversos tipos de estudios en varias especies que incluyen la actividad alimenticia en lubina (Sánchez-Vázquez et al., 1995) y dorada (capítulo 1), entre los que se encuentran, la habilidad de aprendizaje operativo (Nilsson y Torgersen, 2010), la dinámica de grupos (Milot y Bégout, 2009), e incluso también para explorar las preferencias alimenticias (Sánchez-Vázquez et al., 1998; Aranda et al., 2000; 2001; Montoya et al., 2011; Milot et al., 2012). En este caso, los animales tienen acceso a dos comederos simultáneamente que contienen diferentes tipos de alimento. El animal no solamente debe aprender a activar el sensor, en busca de la recompensa, sino que debe, además, aprender a asociar cada sensor con un tipo de alimento. La mayor tasa de activación de un comedero se infiere como preferencia por el tipo o tipos de alimento presentes (Aranda et al., 2000). Sin embargo, esta afirmación no es exactamente cierta ya que en ocasiones los peces pueden mostrar preferencias por un comedero cuando ambos contienen exactamente el mismo alimento (Aranda et al., 2000; Geurden et al., 2005). Evidentemente, estos experimentos se desarrollan generalmente con grupos de peces, por tanto, debemos asumir que todos los peces usan los sensores con una asiduidad similar o al menos que los individuos más activos tienen unas preferencias similares al resto de la población. Esta no es la pauta general, ya que diversos estudios con varias especies, han demostrado que solamente uno o pocos animales son los encargados de activar el sensor. Normalmente, el rango social del animal está correlacionado positivamente con el número de activaciones realizadas. Por ejemplo, en trucha, lubina y bacalao solamente uno o dos animales dominantes son los que realizan la mayor parte de

las activaciones, mientras que el resto de animales se someten a los ritmos y preferencias de los animales dominantes (Alanärä y Brännäs, 1993; 1996; Brännäs y Alanärä, 1993; 1994; Millot et al., 2008; Millot y Bégout, 2009; Millot et al., 2012).

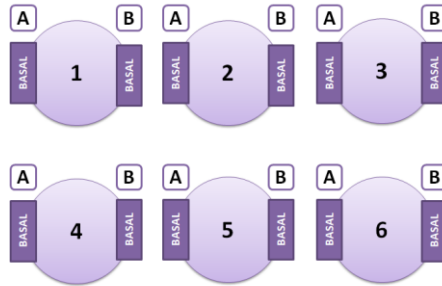
Como hemos demostrado previamente en el capítulo 1, la dorada se adapta bien a los comederos de auto-demanda gracias a un aprendizaje o condicionamiento operacional rápido. Es, por tanto, una especie potencialmente óptima para la aplicación de métodos de discriminación alimenticia basados en estos sistemas de auto-demanda. De hecho, experimentos previos demostraron que la dorada es capaz de detectar el grado de oxidación lipídica en los piensos y alimentarse de forma preferencial, bajo sistemas de discriminación o “dual-choice” desde el comedero provisto con alimento en perfectas condiciones en contraposición a una dieta oxidada (Montoya et al., 2011). En este capítulo quisimos corroborar que la dorada puede discriminar entre dos piensos desde el punto de vista sensorial/gustativo, y puede utilizar un sistema de discriminación dual para seleccionar el pienso más conveniente. Desde el punto de vista práctico, el objetivo fue desarrollar un sistema de monitorización de los piensos rápido, incluso pudiendo establecer unas poblaciones/grupos de peces que pudiesen funcionar a modo de panel gustativo, para monitorizar si los diferentes aditivos podían ser susceptibles de posterior análisis e investigación. Es decir, un método rápido para testar los diferentes componentes y establecer si estos son, *a priori*, del gusto de los animales. Este desarrollo cubrió diferentes etapas/fases (ver material y métodos). Brevemente, en la primera fase evaluamos la preferencia indeterminada de los animales por alguno de los dos comederos. Durante la segunda fase retiramos el sensor de aquellos comederos que habían experimentado mayor número de demandas durante la fase 1. En la fase tres reintroducimos nuevamente el sensor retirado en fase 2. Durante la

fase 4 administramos dos piensos diferentes, control y quinina vaporizada. En fase 5, aumentamos el contenido de quinina vaporizada en el pienso experimental. Los animales utilizados en las 5 fases fueron los mismos. Finalmente, desarrollamos un experimento con un pienso control y dos experimentales, uno positivo (supuestos efectos positivos sobre la ingesta) y otro negativo (quinina 1.5% incorporada en la matriz).

## **4.2. Material y Métodos**

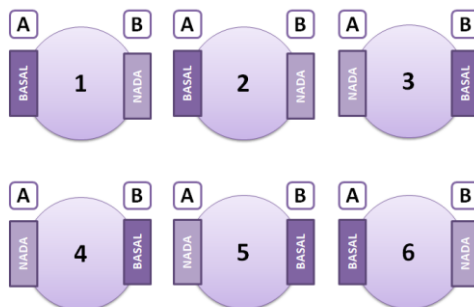
**Experimento 1.** Este ensayo se compuso de 5 fases de experimentación, con un procedimiento experimental concreto en cada uno de ellas. En esta ocasión cada tanque estaba provisto de dos comederos para ofrecer al animal la posibilidad de seleccionar entre dos piensos diferentes. Se realizó sólo un muestreo al inicio del experimento para saber el peso ( $268,8 \pm 19.14$  g) y la talla media ( $23,19 \pm 0.82$  cm) de los animales.

***Fase 1.*** El desarrollo de la fase 1 tenía como objetivo estudiar la potencial preferencia de los animales por alguno de los comederos experimentales. Para ello se introdujeron, de manera aleatoria, 10 peces por tanque en un total de 6 tanques (Fig. 25) provistos de dos comederos cada uno (denominados como A y B). En esta fase se añadió pienso basal en ambos comederos durante un periodo de 15 días. La temperatura media durante esta fase fue de  $23,6^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 25.** Distribución de las dietas usadas en la fase 1.

**Fase 2.** Tras el análisis de la fase 1, se determinó el comedero por el cual los peces tenían preferencia en cada tanque en función del número de activaciones del sensor. Con el fin de que los peces no exhibieran preferencia por ningún comedero, se anularon los comederos (Fig. 26) que tenían un mayor número de tirones, extrayendo del agua el cable que activa el sensor y por tanto, obligando a los peces a usar aquel comedero por el mostraban menor interés. Durante 7 días los animales se alimentaron con pienso basal y la temperatura media del agua fue de 23,5°C.

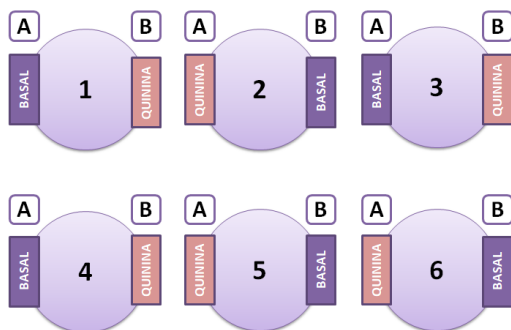


**Figura 26.** Distribución de las dietas usadas en la fase 2.



**Fase 3.** Tras la fase 2 se activó otra vez el comedero anulado con el fin de comprobar, de nuevo, si existía preferencia por algún comedero (Fig.25). Durante 14 días los animales tuvieron libre acceso a ambos comederos cargados con pienso basal. La temperatura experimental media fue de 23,4°C.

**Fase 4.** Durante esta fase quisimos comprobar la capacidad de los animales para discriminar entre dos dietas diferentes añadiendo un aversivo a la dieta basal que inhibiera su demanda. Así, en cada uno de los tanques llenamos un comedero con dieta basal y el otro con dieta basal más quinina vaporizada al 1.5% (Fig. 27). La duración de la fase experimental fue de 18 días con una temperatura media del agua de 17,6°C.

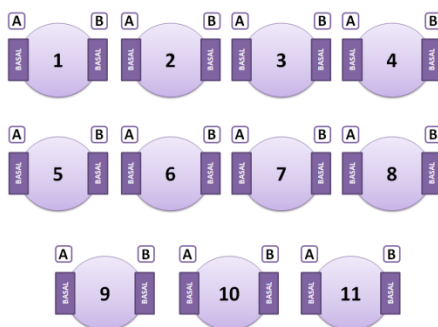


**Figura 27.** Distribución de las dietas usadas en la fase 4.

**Fase 5.** En la quinta fase experimental únicamente se aumentó la dosis de quinina vaporizada (7.5%) en los comederos pertinentes de cada tanque durante 7 días adicionales. En esta fase se registró una temperatura media del agua de 16,3°C.

**Experimento 2.** El tamaño poblacional designado para el experimento fue de 15 animales por tanque con un rango de peso de 25-50 g y, como en el caso anterior, constó de 4 fases sucesivas.

**Fase 1.** Durante la primera fase del experimento, o fase de acomodación, se añadió dieta basal a los dos comederos de los 11 tanques experimentales (Fig. 28) permitiendo a los animales demandar alimento durante 18 días siendo la temperatura media del agua de 26°C.



**Figura 28.** Distribución de las dietas usadas en la primera fase.

**Fase 2.** Durante la segunda fase, o fase experimental propiamente dicha, se añadieron tres piensos diferentes en los comederos, descritos en la sección 2.2.3. Uno de los piensos, el denominado negativo, contenía quinina al 1.5% incorporada en la matriz, mientras que el otro, denominado positivo, contenía un elevado contenido de proteína marina derivada de harinas de pescado, calamar y krill. El tercer pienso fue basal. Los tres piensos se distribuyeron en los diferentes comederos de forma aleatoria (Fig. 29). La fase tuvo una duración de 7 días con una temperatura media del agua de 25,6°C.

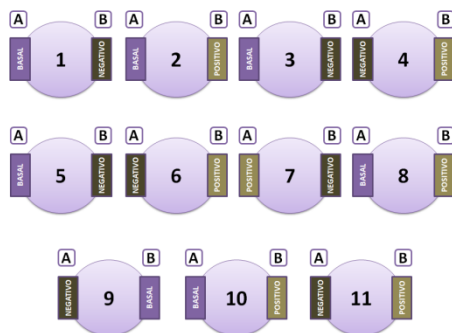


Figura 29. Distribución de las dietas usadas en la fase 2.

**Fase 3.** Durante la tercera fase, siendo la temperatura media del agua 24,9°C, se invirtieron las dietas en los comederos de cada tanque (Fig. 30). Esta etapa se extendió durante 18 días.

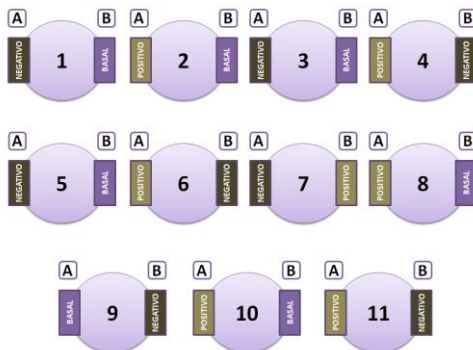


Figura 30. Distribución de las dietas usadas en la fase 3.

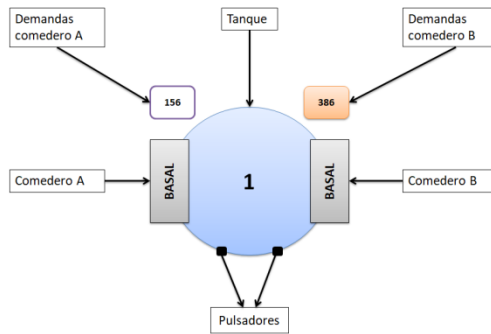
**Fase 4.** Finalmente, introdujimos nuevamente dieta basal en todos los comederos y registramos la actividad alimenticia durante 13 días. En este periodo el agua se encontraba a una temperatura media de 24,3°C.

**Experimento 3.** En esta fase experimental quisimos comprobar que, realmente, los animales comían menos pienso tratado con quinina (negativo). Con este fin, 4 de los tanques del experimento fueron alimentados exclusivamente con pienso negativo (quinina), mientras que otros 4 fueron alimentados con pienso basal. El experimento duró 28 días y la temperatura media del agua fue de 13.6°C.

**Índices alimenticios.** Con el fin de establecer una relación entre las demandas de los dos comederos presentes en un mismo tanque, dividimos las demandas del sensor que activa el comedero A frente a las demandas del sensor que activa el comedero B (A/B). Un número mayor que 1 indica mayor número de demandas en el comedero A, mientras que un número menor que 1 indica mayor número de demandas en el comedero B. Evidentemente, 1 representa la igualdad de demandas entre los dos comederos. Las variaciones en la magnitud del índice, pueden además ofrecer una tendencia a disminuir o aumentar la preferencia por uno de los dos comederos cuando se compara en diversas fases experimentales.

### 4.3. Resultados

El esquema presentado en la figura 31 se ha seguido durante todos los experimentos planteados en este capítulo. El círculo representa el tanque de cultivo y en el centro de este aparece su número experimental. En el interior de cada comedero situados a izquierda y derecha (A y B) se muestra el tipo de alimento administrado y sobre estos, dos cuadros con el número de demandas totales en cada comedero. El color naranja indica el comedero con mayor número de demandas totales.



**Figura 31.** Esquema general de la representación de los resultados. Pulsadores o sensores de activación.

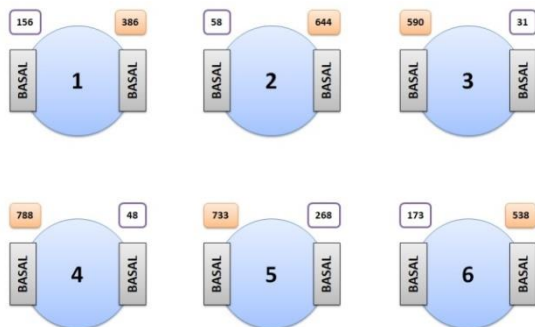
## Experimento 1

Tras el reparto aleatorio de los animales se realizó un muestreo para comprobar que no existían diferencias significativas en peso y talla entre los tanques experimentales como muestra la tabla 12.

**Tabla 12.** Muestreo inicial del periodo de experimentación (gramos).

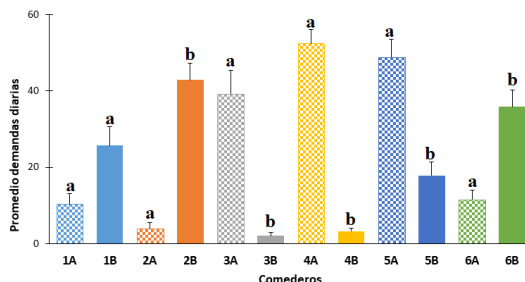
Tanque	Peso Inicial (g)	SEM	Talla Inicial (g)	SEM
1	266.2	24.6	23.2	0.7
2	270.9	10.1	23.3	0.3
3	269.1	18.7	23.2	0.4
4	271.5	22.7	23.3	2.4
5	265.6	20.3	23.1	0.4
6	269.8	18.4	23.3	0.5

**Fase 1.** La primera fase se extendió durante 15 días, en los cuales todos los comederos contenían dieta basal. Nuestros resultados muestran elevadas diferencias en las demandas entre los dos comederos de un mismo tanque, sugiriendo una preferencia indefinida por uno de los comederos del tanque independientemente del alimento que contuviese, ya que durante esta fase fue el mismo.



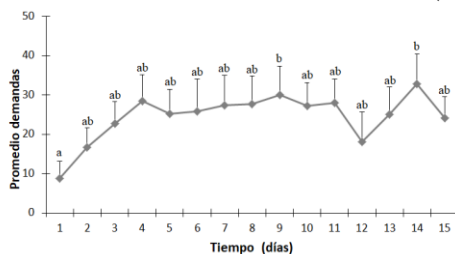
**Figura 32.** Resultado del número de demandas para cada comedero en la fase 1.

Cuando analizamos en número de demandas medias diarias, los análisis estadísticos revelaron esta diferencia y solamente los animales del tanque 1 comieron indistintamente de cada comedero.



**Figura 33.** Promedio demandas diarias en los diferentes comederos de cada tanque (A y B) durante la fase 1. Las letras indican diferencias significativas entre el número de demandas/día de cada comedero tras el análisis univariado y el test de comparaciones múltiple de Scheffé ( $p < 0.05$ ).

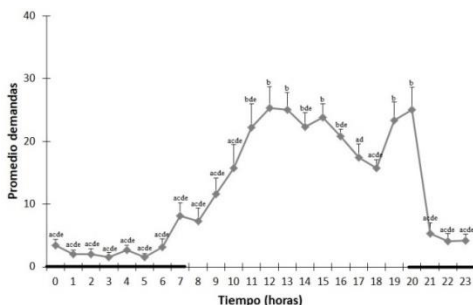
El promedio de demandas diarias de todos los tanques analizados conjuntamente experimentó un aumento progresivo a lo largo de los cuatro primeros días, tras los cuales, la ingesta se estabilizó manteniéndose a un nivel relativamente constante (Fig. 34).



**Figura 34.** Promedio de demandas a lo largo de la fase experimental 1 considerando todos los comederos experimentales, tras el análisis univariado y el test de comparaciones múltiple de Scheffé ( $p < 0.05$ ).

Por otra parte, el análisis de la actividad promedio diaria, como ya observamos en los experimentos del capítulo 1, mostró que las

horas de mayor ingesta coinciden con la fase luminosa del fotoperiodo siendo máxima entre las 12h y las 16h, con un segundo pico a las 20h coincidiendo con la proximidad al apagado de las luces (Fig. 35).



**Figura 35.** Perfil circadiano del promedio de demandas diarias computadas para todos los comederos experimentales durante la fase experimental 1, cuyas diferencias se marcan tras el análisis univariado y el test de comparaciones múltiple de Scheffé ( $p < 0.05$ ). Las barras negras indican la fase oscura del fotoperiodo.

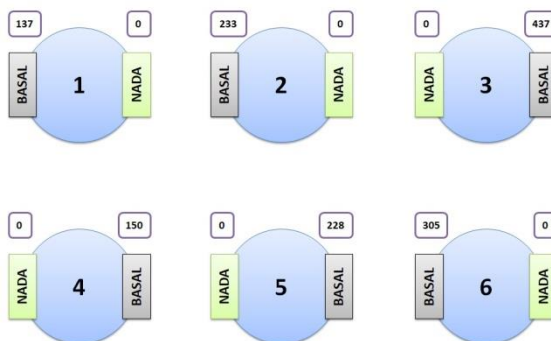
Los datos estadísticos de la tabla 13, nos revelaron que todas las variables principales del análisis univariado (tanques, horas y días) muestran diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 13.** Resultados generales del análisis univariado para las variables.

	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	5161,71	48	107,53	25,46	,000
Intersección	4508,01	1	4508,00	1067,67	,000
Tanque	2414,85	11	219,53	51,99	,000
Día	252,47	14	18,03	4,27	,000
Hora	2494,38	23	108,45	25,68	,000
Error	18033,29	4271	4,22		
Total	27703,00	4320			
Total corregido	23194,99	4319			

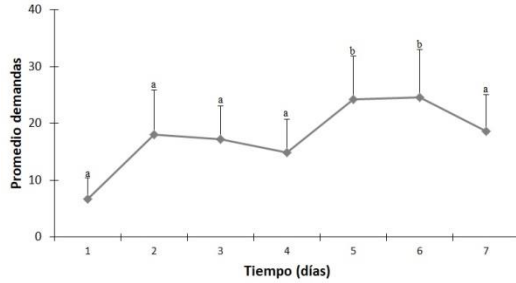


**Fase 2.** Para la realización de esta fase, se extrajo el sensor de uno de los comederos, concretamente, el que poseía un mayor número de demandas, con el fin de obligar a los peces a usar el comedero por el que no mostraron preferencia, en un principio. Con esta acción se buscó mostrar a los peces que ambos comederos les proporcionaban el pienso que demandaban. En la siguiente figura, se muestra el número de demandas totales de cada tanque durante la fase 2.



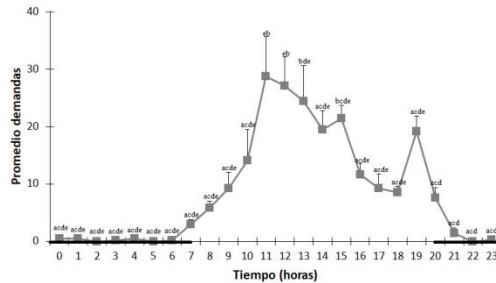
**Figura 36.** Número de demandas totales de los diferentes comederos a lo largo de la fase 2.

Como se puede observar el número de demandas totales disminuyó con respecto a la fase 1, sin embargo, los datos no permiten comparación, *a priori*, ya que el número de días experimentales fue mucho menor. Las demandas promedio fueron relativamente estables desde el inicio de la fase 2, mostrando máximos durante el quinto y sexto día (Fig. 37).



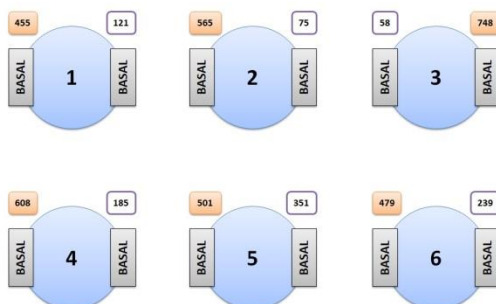
**Figura 37.** Promedio de demandas a lo largo de la fase experimental 2. Marcando las diferencias tras el análisis univariado y el test de comparaciones múltiple de Scheffé ( $p < 0.05$ ).

La distribución circadiana de las demandas promedio de todos los comederos fue muy similar a las exhibidas durante la fase 1, donde la alimentación fue primordialmente diurna.



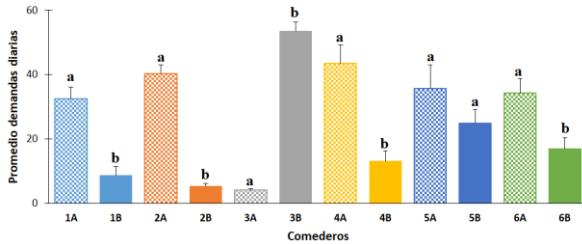
**Figura 38.** Perfil circadiano del promedio de demandas diarias computadas para todos los comederos experimentales durante la fase experimental 2. Las barras negras indican la fase oscura del fotoperiodo, mientras que las letras marcan las diferencias tras el análisis univariado y el test de comparaciones múltiple de Scheffé ( $p < 0.05$ ).

***Fase 3.*** Durante la fase 3 introdujimos, otra vez, el sensor que había sido retirado en la fase 2, con el fin de analizar si los animales habían perdido su preferencia por este y demandaban indistintamente de ambos comederos.



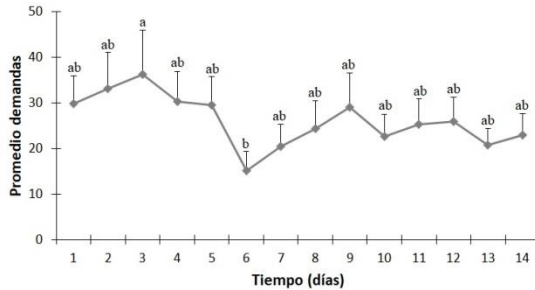
**Figura 39.** Número de demandas totales en los diferentes comederos a lo largo de la fase experimental 3.

Los resultados obtenidos fueron ambiguos, solamente dos tanques mantuvieron su preferencia inicial (4 y 5), es decir demandaron principalmente, otra vez, del sensor que fue retirado en fase 2 y por el que mostraron preferencia en fase 1. El resto de los tanques (1, 2, 3 y 6) invirtieron su preferencia demandando, ahora, mayoritariamente del sensor que estuvo disponible en fase 2. Es decir, en estos 4 tanques conseguimos intercambiar la preferencia, mientras que en los tanques 4 y 5, los peces mantuvieron su preferencia inicial, independientemente de haber pasado por fase 2. Desafortunadamente, en esta ocasión solamente el tanque 5 demandó indistintamente de ambos comederos (Fig. 40). Mientras que el resto de los tanques encontramos diferencias significativas entre las demandas efectuadas en cada comedero.



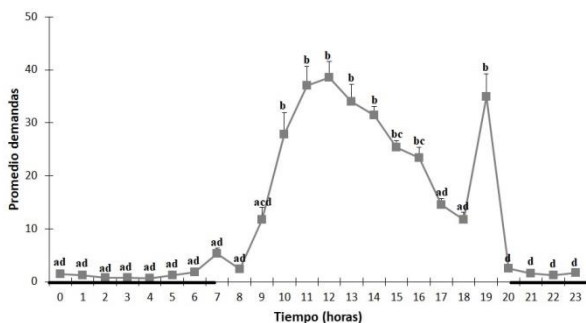
**Figura 40.** Promedio demandas diarias en los diferentes comederos de cada tanque (A y B) durante la fase 3. Las letras indican las diferencias significativas entre las demandas de cada comedero tras el análisis univariado y el test de comparaciones múltiple de Scheffé ( $P < 0.05$ ).

Durante esta tercera fase, los animales mostraron una gran estabilidad alimenticia a largo del tiempo, que se inició desde el comienzo de la fase. Solamente se detectaron pequeñas variaciones significativas entre los días 3 y 6 (Fig. 41).



**Figura 41.** Promedio de demandas a lo largo de la fase experimental 3 considerando todos los comederos experimentales. Analizado mediante el análisis univariado y el test de comparaciones múltiple de Scheffé ( $P < 0.05$ ).

De nuevo, el patrón temporal de ingesta fue similar al exhibido durante las fases experimentales anteriores.



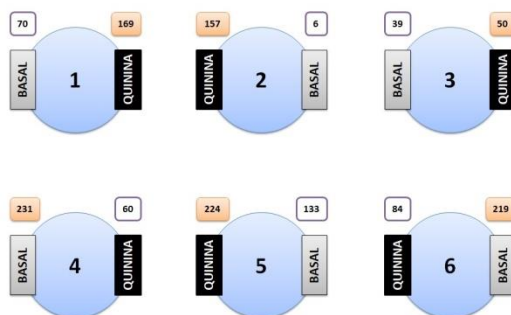
**Figura 42.** Perfil circadiano del promedio de demandas diarias computadas para todos los comederos experimentales durante la fase experimental 3. Las barras negras indican la fase oscura del fotoperíodo, mientras que las letras representan las diferencias tras el análisis univariado y el test de comparaciones múltiple de Scheffé ( $P < 0.05$ ).

Reiteradamente, los test estadísticos encontraron diferencias significativas entre las tres variables consideradas: tanque, hora y día (Tabla 14).

**Tabla 14.** Resultados del análisis univariado ( $P < 0.05$ ).

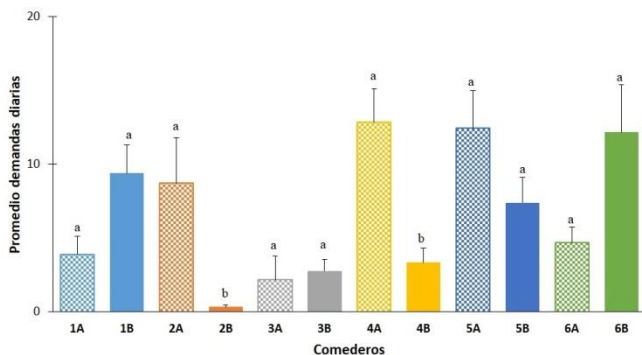
	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	7336,25	47	156,09	39,76	,000
Intersección	4768,90	1	4768,90	1214,80	,000
Tanque	1701,44	11	154,68	39,40	,000
Día	206,04	13	15,85	4,04	,000
Hora	5428,77	23	236,03	60,13	,000
Error	15639,85	3984	3,93		
Total	27745,00	4032			
Total corregido	22976,09	4031			

***Fase 4.*** Una vez comprobado que los animales exhibían preferencias de origen indefinido por los comederos, quisimos comprobar si eran capaces de discriminar los sensores gracias a un condicionamiento negativo, es decir, asociando uno de los sensores a la liberación de un alimento aversivo. Para ello, preparamos un pienso con quinina (sabor amargo) aplicada en spray sobre la superficie de pienso basal. La figura 43 representa el número de demandas totales registradas durante 18 días en cada comedero de los diferentes tanques.



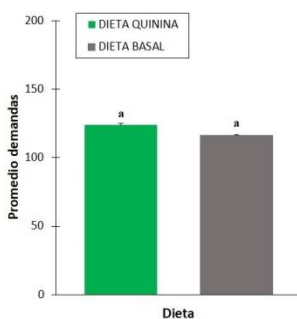
**Figura 43.** Número de demandas totales en los diferentes comederos a lo largo de la fase experimental 4.

Como se observa en los resultados, solamente un tanque parecía mostrar preferencia por los piensos sin quinina (Fig. 44). Así, los animales de los tanques 1, 3, 5 y 6 no mostraron distinciones por ninguno de los comederos, mientras que los tanques 2 y 4 mostraron predilección por el sensor que liberaba alimento con o sin quinina, respectivamente.



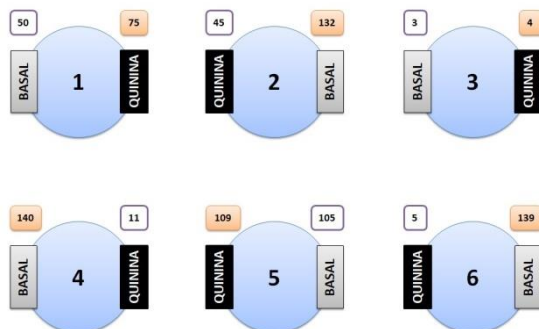
**Figura 44.** Promedio demandas diarias en los diferentes comederos de cada tanque (A y B) durante la fase 4. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre el número de demandas de cada comedero tras del análisis univariado y test de comparaciones múltiple de Scheffé ( $P < 0.05$ ).

Sin embargo, al analizar los niveles medios de ingesta observamos que la inclusión de la quinina no tuvo efecto alguno sobre el nivel de demandas, sugiriendo que bien la dosis suministrada o la forma de aplicación eran incorrectas (Fig.45).



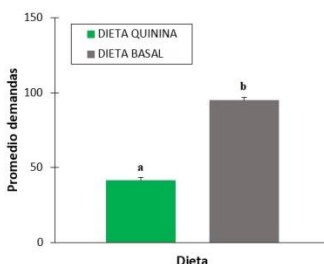
**Figura 45.** Promedio de demandas totales comparando comederos que liberan pienso basal vs pienso implementado con quinina durante la fase experimental 4.

**Fase 5.** En base a los resultados de la fase 4, decidimos aumentar la dosis de quinina utilizando la misma forma de aplicación (spray). La figura 46 representa las demandas totales de cada comedero según el pienso suministrado.



**Figura 46.** Número de demandas totales en los diferentes comederos a lo largo de la fase experimental 5.

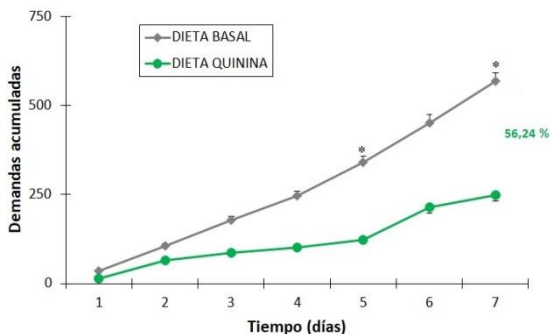
El aumento de la dosis de quinina generó una aversión por el pienso que se tradujo en un menor número del promedio de demandas diarias (Fig. 47).



**Figura 47.** Promedio de demandas totales comparando comederos que liberan pienso basal vs pienso implementado con quinina durante la fase experimental 5. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las demandas de ambas dietas, mediante el análisis univariado (GLM) para  $p < 0.05$ .

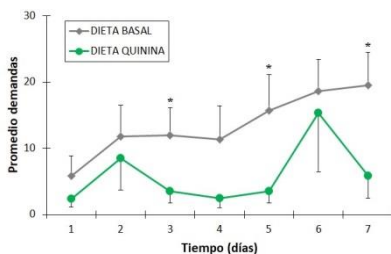


Así mismo, las demandas acumuladas a lo largo del periodo experimental (Fig. 48) presentaron diferencias significativas a partir del quinto día de experimentación.



**Figura 48.** Demandas acumuladas en cada tratamiento a lo largo del periodo experimental.

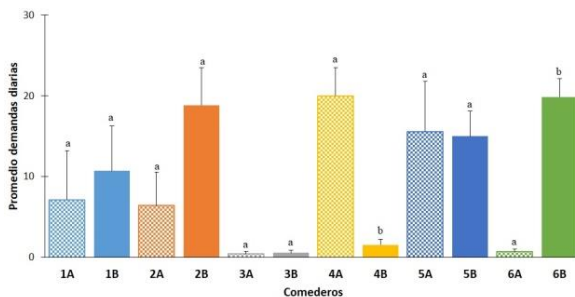
Estas diferencias no fueron detectadas de forma continuada dada la variabilidad de los niveles de demandas.



**Figura 49.** Promedio de demandas a lo largo de la fase experimental 5 considerando todos los comederos de cada grupo experimental.

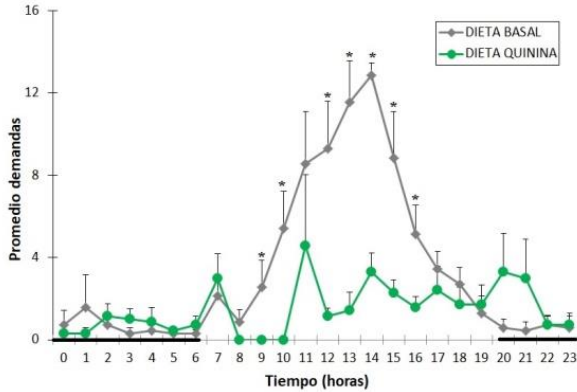
Este efecto negativo de la quinina nos permitió progresar con el análisis de los datos, observando que solamente dos tanques (4 y 6) mostraron diferencias significativas en el número de demandas de cada comedero (Fig. 50). En este caso, los peces demandaron

menos de los sensores que activaban los comederos que liberaban pienso implementados con quinina (4B y 6A). En el resto de tanques los peces no mostraron preferencia por ninguno de los dos comederos.



**Figura 50.** Promedio de las demandas diarias en los diferentes comederos de cada tanque (A y B) durante la fase 5. Letras diferentes indican diferencias significativas entre el número de demandas de cada comedero tras del análisis univariado y test de comparaciones múltiple de Scheffé ( $P < 0.05$ ).

El análisis temporal de las demandas mostró, que los animales alimentados con quinina incluso perdieron el patrón temporal de ingesta debido a la disminución de demandas durante la fase luminosa del fotoperiodo. Sin embargo, los animales alimentados con la dieta basal mostraron el típico patrón de demandas diario observado en casos anteriores con máximos durante la fase lumínica (Fig. 51).



**Figura 51.** Perfil circadiano del promedio de demandas diarias computadas para todos los comederos experimentales de las diferentes dietas durante la fase experimental 5. Las barras negras indican la fase oscura del fotoperíodo. Los asteriscos indican diferencias significativas a una hora determinada entre los dos tratamientos  $p < 0.05$ , tras un análisis univariado.

El análisis de series temporales indica que en el caso de la dieta basal, la cantidad de pienso demandada dependía de las demandas realizadas 2 horas antes y hasta 4 días. La ecuación que describe la temporalidad de la serie es la siguiente:

$$Y_h = 0.241 + 0.290 Y_{h-1} + 0.031 Y_{h-2} + 0.293 Y_{h-24} + 0.023 Y_{h-48} - 0.048 Y_{h-72} + 0.224 Y_{h-96}$$

Las variables introducidas para la dieta basal representaron un 34 % ( $R^2 = 0.34$ ) de la variación de la ingesta. La adición de quinina provocó una disrupción de la serie temporal no encontrándose ajuste significativo.

El análisis univariado mostró diferencias significativas en las tres variables principales (día, hora y dieta) entre los tratamientos (Tabla 15), e interacciones positivas entre las variables hora y dieta, es decir la dieta indujo diferencias en las horas de demanda como también corroboran los estudios temporales.

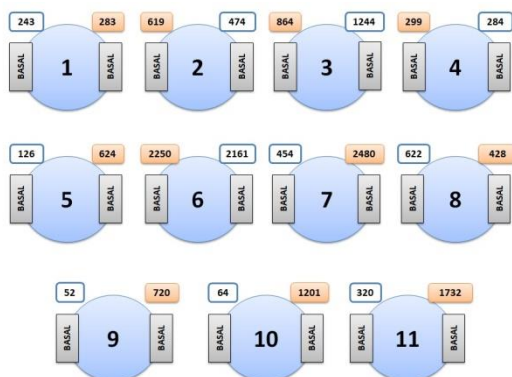
**Tabla 15.** Resultados de la variable día usando el Post Hoc (Scheffé).

	<b>Tipo III de suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
Modelo corregido	811,55	197	4,12	2,90	,000
Intersección	331,91	1	331,91	234,01	,000
Día	52,70	6	8,78	6,19	,000
Hora	280,33	23	12,19	8,59	,000
Dieta	50,79	1	50,79	35,81	,000
Día * hora	237,22	138	1,72	1,21	,053
Día * dieta	14,15	6	2,36	1,66	,126
Hora * dieta	176,35	23	7,67	5,41	,000
Error	2578,54	1818	1,42		
Total	3722,00	2016			
Total corregido	3390,09	2015			

## Experimento 2

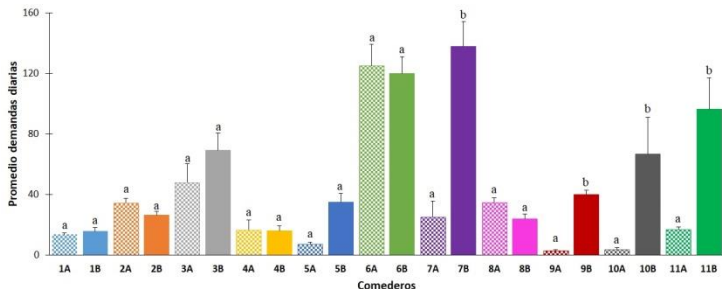
En el segundo experimento introdujimos una dieta positiva con un elevado contenido de proteína marina, y modificamos la forma de inclusión de la quinina en los piensos, de modo que fue incorporada en la matriz de composición del pienso. En esta ocasión, distribuimos 15 animales por tanque en un total de 11 tanques provistos de dos comederos cada uno.

***Fase 1.*** La figura 52 representa el número de demandas totales en los comederos de cada tanque suplidos con pienso basal.



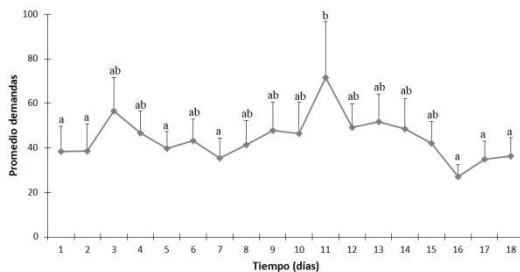
**Figura 52.** Número total de demandas durante la fase 1 en cada comedero.

En esta ocasión solamente 4 tanques exhibían diferencias significativas en el número de demandas de cada comedero (9, 10, 11) siendo el tanque 6 el que presentó un mayor nivel de demandas.



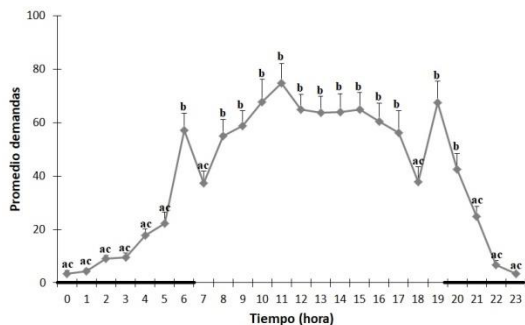
**Figura 53.** Promedio de demandas diarias en los diferentes comederos de cada tanque (A y B) durante la fase 1. Letras diferentes indican diferencias significativas entre el número de demandas de cada comedero, tras del análisis univariado y test de comparaciones múltiple de Scheffé ( $P < 0.05$ ).

El promedio de demandas fue constante desde los primeros momentos del experimento y solamente se registraron diferencias significativas durante el día 11 con respecto a los dos primeros y tres últimos días de la fase experimental (Fig. 54).



**Figura 54.** Promedio de demandas a lo largo de la fase experimental 1 considerando todos los comederos experimentales. Letras diferentes indican diferencias significativas en las demandas, tras el análisis univariado y el test de comparaciones múltiple de Scheffé ( $P < 0.05$ ).

Al igual que en las diferentes fases del experimento 1, los animales exhibieron un marcado comportamiento diurno (Fig. 55).



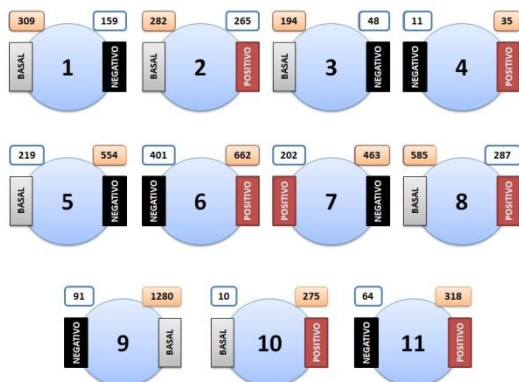
**Figura 55.** Perfil circadiano del promedio de demandas diarias computadas para todos los comederos experimentales durante la fase experimental 1. Las barras negras indican la fase oscura del fotoperiodo. Las diferencias tras el análisis univariado y el test de comparaciones múltiple de Scheffé ( $P < 0.05$ ), fueron marcadas con letras diferentes.

Tras el análisis univariado los niveles de significación indican diferencias entre todas las variables consideradas (Tabla 16).

**Tabla 16.** Resultados del análisis estadístico.

	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	92322,63	1292	71,46	5,250	,000
Intersección	32337,54	1	32337,54	2376,03	,000
Comedero	26593,18	21	1266,34	93,04	,000
Día	1603,52	17	94,32	6,93	,000
Hora	12058,31	23	524,27	38,52	,000
Error	111750,83	8211	13,61		
Total	236411,00	9504			
Total corregido	204073,46	9503			

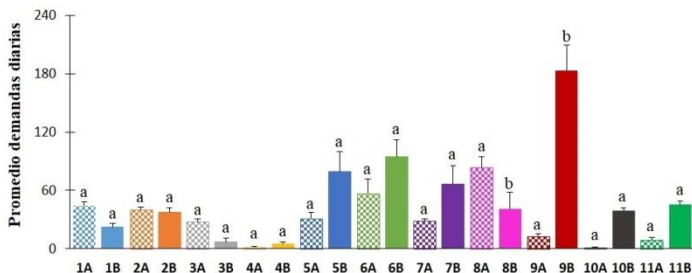
***Fase 2.*** Durante la segunda fase se incorporaron los tratamientos experimentales (basal, positivo y negativo). La distribución de piensos y comederos se representa en la figura 56, así como el número de demandas totales en cada comedero.



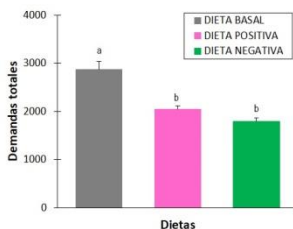
**Figura 56.** Número total de demandas durante la fase 2 en cada comedero.

El análisis de los promedios diarios de demandas alimenticias, reveló que solamente los tanques 8 y 9 mostraron diferencias significativas entre los tanques (Fig. 57). Cuando analizamos los niveles de ingesta de cada dieta conjuntando todos los comederos a lo largo del periodo experimental, vimos que la dieta más demandada fue la basal mientras que las demandas de las dietas positiva y negativa fueron significativamente menores (Fig. 58), un efecto que se observó también en la cantidad de demandas acumuladas (Fig. 59) y en los niveles medios de demandas diarias (Fig. 60).

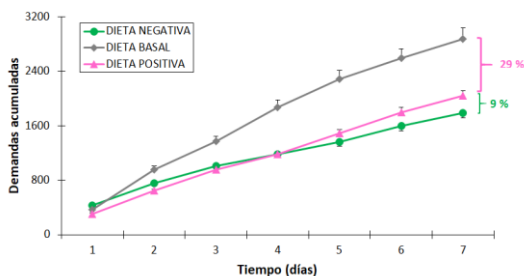




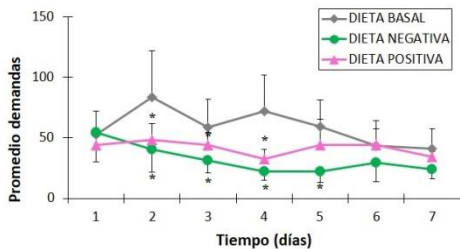
**Figura 57.** Promedio de demandas diarias en los diferentes comederos de cada tanque (A y B) durante la fase 2. Letras diferentes indican diferencias significativas entre el número de demandas de cada comedero tras del análisis univariado y test de comparaciones múltiple de Scheffé ( $P < 0.05$ ).



**Figura 58.** Promedio de demandas totales comparando comederos que liberan pienso basal, pienso positivo y pienso implementado con quinina (negativo) durante la fase experimental 2. Letras diferentes indican diferencias significativas tras análisis univariado y posterior test de comparaciones múltiple de Scheffé ( $P < 0.05$ ).

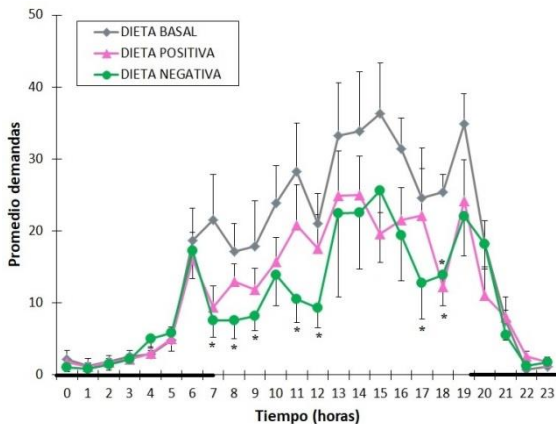


**Figura 59.** Demandas acumuladas a lo largo de la fase experimental 2.



**Figura 60.** Promedio de demandas a lo largo de la fase experimental 2 considerando todos los comederos experimentales. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ) tras el análisis univariado y el test de comparaciones múltiple de Scheffé.

A pesar de existir una reducción en el nivel de demandas en los tratamientos experimentales, la distribución temporal de estas demandas (Fig. 61) no fue diferente, como así indica la ausencia de diferencias significativas en la interacción tiempo x dieta (Tabla 17).



**Figura 61.** Perfil circadiano del promedio de demandas diarias computadas para todos los comederos experimentales durante la fase experimental 2. Las barras negras indican la fase oscura del fotoperiodo. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ), mediante el análisis univariado.

**Tabla 17.** Resultados de la variable día usando el Post Hoc (Scheffé).

	<b>Tipo III de suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
Modelo corregido	12294,36	227	54,16	4,14	,000
Intersección	12168,29	1	12168,29	929,27	,000
Día	342,22	6	57,04	4,36	,000
Hora	5848,82	23	254,3	19,42	,000
Dieta	806,40	2	403,20	30,79	,000
Día * hora	4299,52	138	31,16	2,38	,000
Día * dieta	405,47	12	33,79	2,58	,002
Hora * dieta	704,04	46	15,30	1,17	,203
Error	45411,81	3468	13,09		
Total	69628,00	3696			
Total corregido	57706,18	3695			

El estudio de las series temporales mostró que los peces alimentados con dieta basal obtuvieron una menor memoria que las otras dos dietas. Las demandas diarias dependían de las ejercidas 2 horas antes y hasta los 2 días previos, por tanto, la ecuación con los resultados quedó la siguiente forma:

$$Y_h = 0.903 + 0.128 Y_{h-1} + 0.143 Y_{h-2} + 0.05 Y_{h-24} + 0.078 Y_{h-48}$$

Las variables introducidas para la dieta basal explican un 6.4 % ( $R^2= 0.064$ ) de la variación de las demandas. Los niveles de demanda de la dieta positiva por las demandas previas desde 2 horas hasta 6 días antes.

$$Y_h = 0.446 - 0.082 Y_{h-1} + 0.143 Y_{h-2} + 0.022 Y_{h-24} + 0.017 Y_{h-48} \\ + 0.306 Y_{h-72} + 0.045 Y_{h-96} + 0.075 Y_{h-120} \\ + 0.093 Y_{h-144}$$

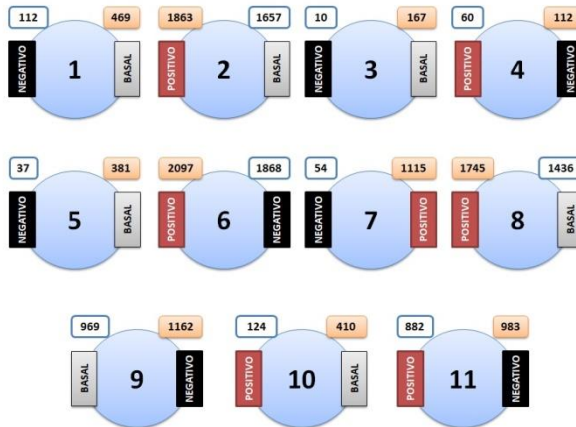
Las variables explicaban un 32.6 % ( $R^2= 0.326$ ) de la variación de las demandas. Finalmente, para la dieta negativa se obtuvo una

dependencia de 1 hora hasta 6 días antes, quedando la ecuación siguiente:

$$Y_h = 0.031 + 0.457 Y_{h-1} + 0.033 Y_{h-24} - 0.045 Y_{h-48} + 0.251 Y_{h-72} + 0.184 Y_{h-96} - 0.002 Y_{h-120} + 0.043 Y_{h-144}$$

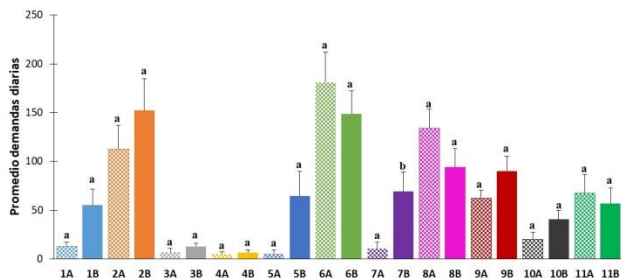
En este caso, las variables explicaban un 48.8% ( $R^2= 0.488$ ) de variación de la ingesta. La dieta negativa indujo mayor memoria y las variables del análisis explicaban casi el 50% del comportamiento de demanda.

**Fase 3.** Durante la fase tres invertimos los piensos en los comederos de un mismo tanque. Las demandas totales son representadas en la figura 62.



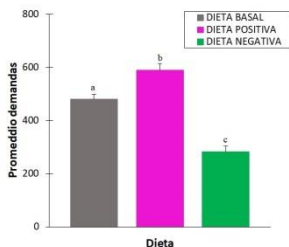
**Figura 62.** Número total de demandas durante la fase 3 en cada comedero.

Como muestra la figura 63, solo el tanque 7 mostró diferencias significativas entre el promedio de demandas diarias de sus comederos. En el resto de tanques, los peces demandaron indistintamente de ambos comederos.



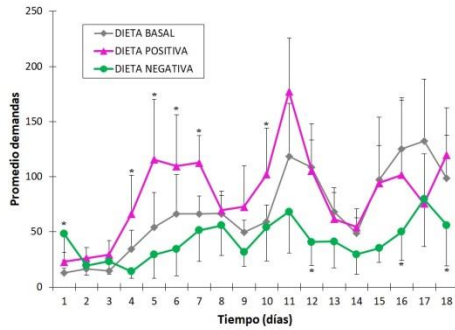
**Figura 63.** Promedio de las demandas diarias en los diferentes comederos de cada tanque (A y B) durante la fase 3. Letras diferentes indican diferencias significativas entre el número de demandas de cada comedero tras del análisis univariado y test de comparaciones múltiple de Scheffé ( $P < 0.05$ ).

Los niveles totales medios de demandas mostraron diferencias significativas siendo más elevados e inferiores con referencia a la dieta basal en la dieta positiva y negativa, respectivamente.

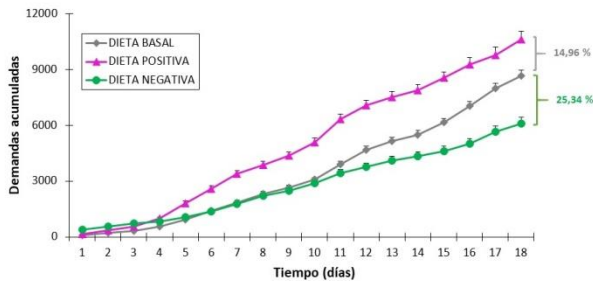


**Figura 64.** Promedio de las demandas totales comparando comederos que liberan pienso basal, pienso positivo y pienso implementado con quinina (negativo) durante la fase experimental 3. Letras diferentes indican diferencias significativas tras análisis univariado y posterior test de comparaciones múltiple de Scheffé ( $P < 0.05$ ).

Estas diferencias fueron evidentes tanto a nivel diario (Fig. 65), como en el acumulado (Fig. 66).

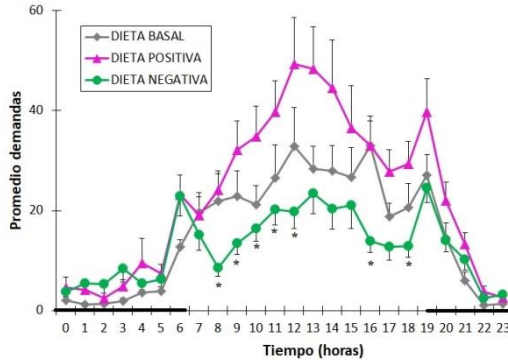


**Figura 65.** Promedio de demandas a lo largo de la fase experimental 3 considerando todos los comederos experimentales. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ), tras el análisis univariado y el test de comparaciones múltiple de Scheffé.



**Figura 66.** Demandas acumuladas a lo largo de la fase experimental 3.

Nuevamente, los ritmos de demanda alimenticia quedaron invariables independientemente de la dieta, y los peces siguieron siendo diurnos en lo que respecta a su comportamiento alimenticio.



**Figura 67.** Perfil circadiano del promedio de demandas diarias computadas para todos los comederos experimentales durante la fase experimental 3. Las barras negras indican la fase oscura del fotoperiodo. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo de control ( $p < 0.05$ ), tras el análisis univariado y el test de comparaciones múltiple de Scheffé.

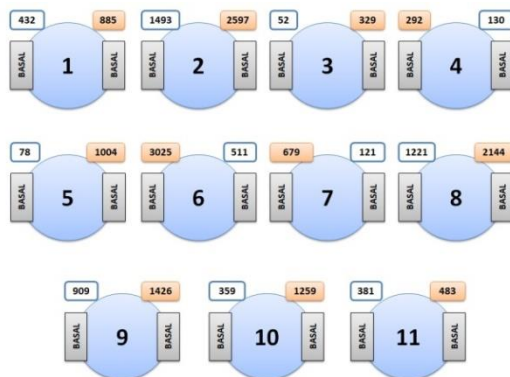
La tabla 18, muestra los resultados del análisis univariado, donde encontramos diferencias significativas en todas las variables consideradas, así como para las interacciones entre ellas.

**Tabla 18.** Resultados del análisis univariado usando el Post Hoc (Scheffé).

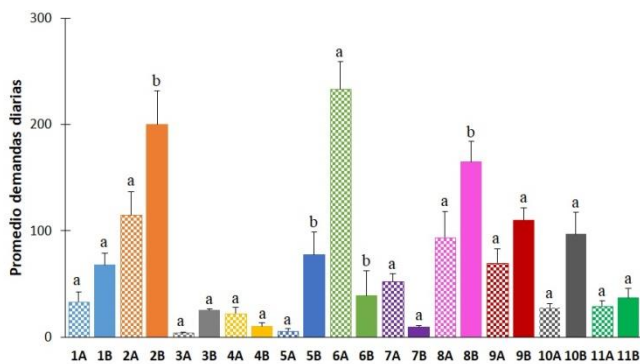
	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	73911,02	513	144,07	4,23	,000
Intersección	71436,47	1	71436,47	2098,30	,000
Día	13652,99	17	803,12	23,59	,000
Hora	29841,3	23	1297,45	38,11	,000
Dieta	6369,94	2	3184,97	93,55	,000
Día * hora	15427,08	391	39,45	1,16	,018
Día * dieta	4544,89	34	133,67	3,93	,000
Hora * dieta	5958,81	46	129,54	3,80	,000
Error	306063,12	8990	34,04		
Total	449335,00	9504			
Total corregido	379974,14	9503			

**Fase 4.** Finalmente, en la última fase experimental todos los comederos fueron suplidos con dieta basal. La figura 68 muestra

los niveles de demandas totales durante la fase experimental. En este caso los tanques 2, 5, 6, 8 y 9 mostraron preferencias de carácter indefinido por alguno de los comederos del tanque (Fig.69).



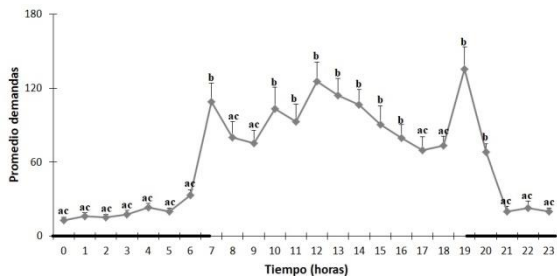
**Figura 68.** Número total de demandas durante la fase 4 en cada comedero.



**Figura 69.** Promedio de demandas diarias en los diferentes comederos de cada tanque (A y B) durante la fase 4. Letras diferentes indican diferencias significativas entre el número de demandas de cada comedero tras del análisis univariado y test de comparaciones múltiple de Scheffé ( $P < 0.05$ ).



Los ritmos diarios de demanda fueron similares a los exhibidos en fases anteriores (Fig. 70), con demandas principalmente durante la fase luminosa del fotoperiodo.



**Figura 70.** Perfil circadiano del promedio de demandas diarias computadas para todos los comederos experimentales durante la fase 4. Las barras negras indican la fase oscura del fotoperiodo. Letras diferentes indican diferencias significativas respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ) usando el análisis univariado explicado en el punto 2.4.

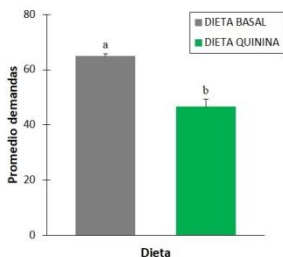
Reiteradamente, volvimos a encontrar diferencias significativas en todas las variables estudiadas (Tabla 19).

**Tabla 19.** Resultados de la variable día usando el Post Hoc (Scheffé).

	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	149942,19	1067	140,53	6,18	,000
Intersección	57069,24	1	57069,24	2511,48	,000
Comedero	45641,11	21	2173,39	95,64	,000
Día	3674,95	12	306,24	13,48	,000
Hora	22810,72	23	991,77	43,64	,000
Error	131704,57	5796	22,72		
Total	338716,00	6864			
Total corregido	281646,76	6863			

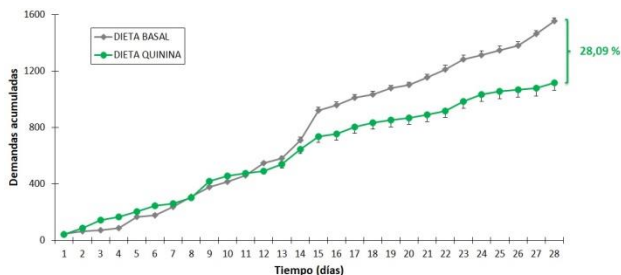
**Experimento 3.** Este experimento fue diseñado para corroborar el efecto de la inclusión de quinina en la matriz de composición de

la ingesta, sobre el comportamiento alimenticio de la dorada utilizando tanques independientes provistos de un solo comedero. Como muestra la figura 71, el número de demandas en los tanques provistos de dieta con quinina fue significativamente menor tras análisis estadístico univariado.



**Figura 71.** Demandas totales promedio para la dieta basal y quinina. Las letras diferentes indican que hay diferencias significativas después del análisis univariado ( $p < 0.05$ ).

Tras analizar las demandas acumuladas se observó que las diferencias surgieron a mitad del periodo experimental, es decir, a partir del día 15.



**Figura 72.** Demandas acumuladas a lo largo de la fase experimental.

**Índice de demandas.** La siguiente tabla representa los índices alimenticios de las diferentes fases de los experimentos 1 y 2.

**Tabla 20.** Índices alimenticios de las diferentes fases experimentales.

Tanque	Exp 1 Fase 1	Exp 1 Fase 3	Exp 1 Fase 4	Exp 1 Fase 5	Exp 2 Fase 1	Exp 2 Fase 2	Exp 2 Fase 3	Exp 2 Fase 4
1	0,40	3,76	0,41	0,67	0,859	1,943	0,239	0,488
2	0,09	7,53	0,04	2,93	1,306	1,064	1,112	0,575
3	19,03	0,08	0,78	0,75	0,695	4,042	0,060	0,158
4	16,42	3,29	3,85	12,73	1,053	0,314	0,536	2,246
5	2,74	1,43	0,59	0,96	0,202	0,395	0,097	0,078
6	0,32	2,00	2,61	27,80	1,041	0,606	1,123	5,920
7					0,183	0,436	0,048	5,612
8					1,453	2,038	1,221	0,569
9					0,072	0,071	0,834	0,637
10					0,053	0,036	0,302	0,285
11					0,185	0,201	0,897	0,789

Los índices alimenticios muestran la relación de demandas entre los dos comederos de un mismo tanque. Exp (experimento). La fase 2 del experimento 1 no tiene índice ya que los animales solo pudieron activar uno de los dos comederos del tanque.

#### 4.4. Discusión

El sistema de alimentación mediante auto-demanda se ha utilizado en diversas especies de peces para el diseño de dietas balanceadas, atendiendo a las preferencias nutricionales de los animales (Aranda et al., 2000). Para ello, los animales deben de ser capaces de discriminar su diferente composición basándose principalmente en pistas, bien de carácter organoléptico o bien de carácter post-ingestivo, es decir basadas en la detección gastrointestinal de macronutrientes (lípidos, carbohidratos y proteína). Aunque se han realizado estudios previos en la dorada demostrando su capacidad en la selección de dietas bajo sistemas de auto-demanda (Montoya et al., 2011; 2012), nosotros quisimos re-evaluar estos estudios utilizando nuestros dispositivos de auto-demanda y las condiciones experimentales propias. En primer lugar, quisimos evaluar la potencial aparición de preferencias indefinidas por un comedero determinado, de los dos accesibles en cada tanque. Esta eventualidad se ha descrito previamente en diversas especies incluyendo lubina y la propia dorada. La lubina mostró preferencias por uno de los dos comederos (62 / 38 %) cuando ambos comederos contenían la misma dieta, y estas diferencias no fueron superadas por la inclusión de las dietas experimentales que presentaban una diferente composición de macronutrientes (Aranda et al., 2000). Resultados muy similares fueron obtenidos en experimentos desarrollados con bacalao (Millot et al., 2012), es decir tras 1 a 6 días los bacalao desarrollaban preferencias por uno de los dos comederos disponibles. Sin embargo, cuando este comedero fue vaciado de alimento, aunque el sensor permanecía accesible, los animales desarrollaron preferencias por aquel comedero que proporcionaba una recompensa. Nosotros hemos observado una respuesta muy similar en la dorada durante la primera fase experimental del experimento 1, donde vimos que

efectivamente los peces rápidamente establecieron preferencias por un comedero y solamente los animales de 1 de los 6 tanques experimentales, demandaron alimento indistintamente de los dos comederos. Encontrar una explicación a esta preferencia que hemos catalogado como indefinida es difícil. El aprendizaje instrumental depende del procedimiento de aprendizaje, es decir, de desarrollar la habilidad para ejecutar el comportamiento recompensado. Las acciones comportamentales que no obtienen recompensa porque no se realizan correctamente, por ejemplo, empujar el sensor en lugar de tirar de él o fallos eventuales de algún sensor, pueden desviar la atención de los peces o del pez dominante hacia el otro sensor. Incluso, no podemos desestimar la existencia de diferencias en la propia sensibilidad de activación de los sensores. Estas actuaciones erróneas hacen disminuir las oportunidades para adquirir esas competencias, e incluso hacen disminuir la curiosidad por el sensor en pocas horas (Nilsson y Torgenssen, 2010), lo que puede conllevar la aparición de preferencias por el dispositivo alternativo. En la segunda fase del experimento 1, intentamos solventar la disparidad retirando uno de los sensores, forzando así, a los animales a la adquisición de esa destreza operacional sobre el sensor que exhibía menor número de demandas. Durante la segunda fase, el número de demandas diarias medio disminuyó significativamente ( $49,03 \pm 4,86$  vs  $35,48 \pm 7,09$ ), sugiriendo que los animales no fueron capaces de superar la falta de un sensor, y sugiriendo que realmente habían adquirido previamente esa capacidad operacional. Es decir, esas diferencias no fueron inducidas por la falta de aprendizaje operacional sobre los sensores. De hecho, en la tercera fase los animales recuperaron los niveles de demandas observados en la fase 1 ( $49,03 \pm 4,86$  vs  $48,72 \pm 3,17$ ). Es decir, la opción de introducir un sensor adicional aumenta significativamente el número de demandas. La razón de este

incremento en el número de demandas puede tener una razón jerárquica, incluso relacionada con el comportamiento agonístico o de defensa del alimento. Se ha demostrado, en diversas especies, que el mayor número de demandas alimenticias es ejecutado por el/los individuos dominantes de la población (Millot y Begout, 2009; Millot et al., 2012). La inclusión del segundo sensor podría dotar de opciones alternativas a individuos no dominantes de la población, que encontrarían una opción para demandar alimento en ausencia del individuo dominante, conllevando a mostrar un comportamiento agonístico. El individuo dominante ya no podría defender, con tanta eficiencia, los sensores de demanda. Si el animal dominante muestra preferencias sobre un sensor, y, además, no puede defender tan eficientemente los sensores, es lógico pensar que se produzca un incremento de demandas al introducir el segundo sensor, e incluso podría dar explicación a la aparición de un número de demandas desbalanceado entre los sensores. La aparición de un comportamiento agonístico asociado a la alimentación se ha descrito en la dorada, de hecho, las interacciones agonísticas en ausencia de alimento son bastante raras y es, por tanto, la presencia de alimento su principal inductor (Goldan y Poper, 2003). Es lógico pensar que pueda existir un comportamiento agonístico asociado al estímulo condicionado (sensor), y que el pez dominante defienda territorialmente el sensor. La diferencia en el número de demandas observadas en función del número de sensores cuestiona, si el sistema de auto-demanda refleja realmente las necesidades energéticas del grupo o las necesidades del/los individuos dominantes. Una posible solución para evitar esta controversia sería introducir varios sensores posibilitando la activación/demanda a todos los animales dominantes o no. El éxito de esta opción dependería de la capacidad de aprendizaje de los individuos no dominantes.

Tras introducir nuevamente el sensor, el desbalance en el número de demandas entre los sensores persistió y solamente los individuos de un tanque, diferente del de la fase 1, demandaron indiferentemente de ambos comederos. Los índices de demanda muestran que durante la fase 3, los animales de 4 tanques cambiaron su preferencia por el sensor contrario al preferido en fase 1, los otros dos tanques siguieron mostrando esa preferencia, aunque disminuyó considerablemente (16,42 vs 3,29 y 2,74 vs 1,43), indicando menor preferencia por el comedero favorito en fase 1. Esta disminución llevó al tanque 5 (2,74 vs 1,43) a no exhibir diferencias significativas en el número de demandas de los dos sensores. Es decir, gracias a la fase 2, fuimos capaces de cambiar la preferencia por el sensor contrario, o al menos de reducirla sustancialmente, pero no pudimos eliminar el desbalance en el número de demandas entre ambos sensores.

La introducción de un elemento aversivo que genere un condicionamiento negativo sobre uno de los sensores, puede desvelar si los animales realmente pueden discriminar entre los dos sensores en función de las características de la recompensa. Para ello introdujimos quinina aplicada mediante spray en la superficie de los pellets. La quinina es un alcaloide antimalárico con un fuerte sabor amargo, que es generalmente, aversivo para la mayoría de los peces (Kasumyan y Doving, 2003). Estudios previos en dorada, donde se utilizó la quinina como agente antiparasitario incluido en la matriz del pienso, comunicaron la ingesta normal del alimento durante los cinco primeros días de tratamiento, un descenso en su consumo durante el sexto y séptimo día y un completo rechazo durante los tres últimos días experimentales (Rigos et al., 2013). En nuestro primer experimento con quinina (fase 4) la dosis (1,5%, similar a la utilizada en tratamientos antiparasitarios (Rigos et al., 2013) no indujo una reducción en las demandas de alimento, por lo que

aumentamos la dosis hasta un 7,5% (fase 5). La carencia de efectos de las dosis más bajas, pudo deberse probablemente a que el método de incorporación de la quinina sobre la superficie (“coating”) que empleamos, no fue correcto. Es posible que la quinina que recubre el pellet se disuelva rápidamente en contacto con el agua de mar y no dote del esperado sabor amargo al pienso experimental. El aumento de la dosis (1,5 vs 7,5) conllevó una disminución significativa de los niveles de demanda, cuando comparamos las activaciones ejecutadas sobre el conjunto de comederos conteniendo pienso con quinina y basal. Durante la fase 5, los comederos suministrados con pienso basal, obtuvieron el mismo número de demandas que las recibidas durante la fase 4 ( $116,3 \pm 42$  vs  $94,83 \pm 25,23$ ) aun cuando la fase 4 fue más extendida (18 vs 7 días, respectivamente), sin embargo, los suministrados con quinina redujeron significativamente su número de demandas totales diarias ( $124 \pm 31,1$  vs  $41,50 \pm 19,35$ ). Estos datos sugieren que, efectivamente, los animales son capaces de asociar el sensor con la presencia de quinina en los piensos y demandar menor cantidad de alimento, es decir, de discriminar los estímulos no condicionados aversivos (piensos con quinina) asociados a los condicionados (sensores). Sin embargo, cuando analizamos los índices alimenticios en fase 5 vemos que solamente tres de los tanques presentan índices  $>1$ , es decir demandan más pienso basal que pienso con quinina. Algunos tanques no pudieron superar las preferencias previas indefinidas, un hecho que en cierta forma enmascara los resultados obtenidos. Sin embargo, cuando se estudian conjuntamente se constata una disminución significativa de las demandas de quinina. Montoya y colaboradores (2011) publicaron resultados similares tras exponer a las doradas a dos dietas con diferente grado de oxidación. En una primera fase experimental los animales seleccionaron una de las dietas, pero tras invertirlas en los comederos solamente el 50%



de los grupos experimentales (3 de 6) siguieron la pauta comportamental inicial. Un efecto similar se ha observado en experimentos de selección de dietas en lubina (Aranda et al., 2000), y en estudios de auto-demanda en bacalao (Milot et al., 2012).

Nuestra siguiente pregunta fue si los animales podían discernir condicionamientos positivos, además de los ya demostrados negativos (experimento 1, fase 5). Por esto, incorporamos en el diseño experimental un nuevo pienso que denominamos positivo, que incorpora mayor porcentaje de harinas de origen marino, lo que se traduce en mayor cantidad de aceite y proteína marina, siendo, a priori, mucho más apetecible que el pienso control basado fundamentalmente en harinas vegetales. Además, la quinina fue incorporada en la matriz de los piensos para evitar el potencial problema de disolución en el medio. En esta ocasión, los animales fueron de menor tamaño que en el experimento 1 (aproximadamente 50 vs 250 g), pero ambos experimentos fueron desarrollados durante el periodo estival con temperaturas alrededor de 25°C. Evidentemente, el tamaño de los animales podría cambiar su comportamiento alimenticio y su adaptación a los sistemas de auto-demanda. Durante el periodo experimental, independientemente del pienso suministrado, el número de demandas medias por día no mostró diferencias significativas durante las 4 fases experimentales (fase 1=88,6±20,1; fase 2=87,2±16,8; fase 3=89,6±23,7 y fase 4=138,5±30,7). Es decir, los peces independientemente del pienso seleccionado, mantienen el número de demandas y probablemente sus requerimientos energéticos. Sin embargo, durante la fase 2 demandan menos cantidad de los piensos experimentales. Esto puede ser debido a la novedad organoléptica o nutricional de los piensos experimentales y especialmente, al corto periodo de acomodación al que fueron sometidos (7 días). Durante la fase 3, en la que invertimos los

comederos, se detectaron diferencias entre los piensos, de forma que los piensos positivos y negativos fueron demandados con mayor o menor frecuencia, respectivamente. Es probable que la aparición de diferencias en los niveles de demanda durante la fase tres, se debiera al periodo experimental más extenso de esta fase, así como a una mejor acomodación a los piensos experimentales. Nuevamente, cuando consideramos los tanques de forma global, los animales fueron capaces de discernir entre los piensos positivos y negativos diferenciándolos de un tercer pienso basal. Sin embargo, cuando analizamos los tanques individualmente en función de sus índices alimenticios estas diferencias fueron tan evidentes como ocurrió durante la fase 5 del experimento 1. Sugerentemente, si comparamos las medias de esos niveles de demanda totales durante la fase 3 (dietas experimentales), con los niveles de demandas de esos mismos peces en fase 1 (ambas fases con una extensión de 18 días) cuando comieron toda la dieta basal, encontramos diferencias significativas en los peces alimentados con quinina ( $823 \pm 263$  vs  $542,3 \pm 249,4$ ;  $p < 0,05$ ), pero no en los peces alimentados con pienso positivo ( $950,6 \pm 373,3$  vs  $1127,9 \pm 311,7$ ) o basal ( $615,1 \pm 170,5$  vs  $786,7 \pm 220,1$ ). Esta diferencia fue demostrada también en el experimento 3, en el cual los animales fueron provistos únicamente con un sensor que activaba un único comedero cargado bien con pienso basal (4 tanques), o bien quinina incorporada en la matriz de composición (4 tanques). A diferencia del experimento 2, los animales no tuvieron opción de selección. En resumen, estos resultados sugieren que los peces pueden aprender con mayor facilidad los condicionamientos aversivos o negativos que los positivos.

Durante la fase 1, y a diferencia del experimento anterior, observamos que la mayor parte de los tanques (7 de 11), no exhibieron diferencias significativas en el número de demandas

ejecutadas sobre cada sensor. La principal diferencia biológica entre ambos experimentos es el tamaño de los peces (250 g en experimento 1 vs 50 g en experimento 2). Siguiendo nuestra hipótesis anterior en la que las diferencias agonísticas debidas a la presencia de uno o dos individuos dominantes pueden causar el desbalance en las demandas entre comederos, es lógico pensar que estos comportamientos agonísticos surjan con mayor frecuencia en animales juveniles y que se desarrollen más consistentemente en adultos. La dependencia de la edad en las interacciones agonísticas de los peces ha sido publicada recientemente (Dominguez-Castanedo, 2021). En estos experimentos realizados con peces almirantes mexicanos (*Millerichthys robustus*), se obtuvo que aquellos que tenían 24 semanas fueron más agresivos que los de 5 semanas.

En todos los experimentos realizados, las doradas mostraron un ritmo circadiano de demandas alimenticias estrictamente diurno. No pudimos encontrar ningún efecto de las diferentes dietas, ni del tamaño de los animales. Hasta nuestro conocimiento, aunque existen diversas publicaciones sobre los ritmos de actividad locomotora (Fortes-Silva et al., 2018), endocrinos (Cerdá-Reverter et al., 1996), genes reloj (Vera et al., 2013), metabolismo lipídico (Paredes et al., 2014) y digestión ácida (Yúfera et al., 2014) entre otros, y su sincronización con los tiempos de alimentación, hay muy poca información sobre los propios ritmos de ingesta de esta especie. López-Olmeda y colaboradores (2009) demostraron que la dorada puede adaptar sus ventanas de ingesta a los periodos nocturnos o diurnos, en función de la aplicación de restricciones horarias en la alimentación. En sus experimentos cuando la ventana de ingesta fue restringida al periodo nocturno, los animales concentraron su ingesta en las tres primeras horas de la fase oscura, o mejor dicho, de la disponibilidad de alimento. Cuando la disponibilidad fue trasladada a la fase luminosa del

fotoperiodo los animales tardaron entre 5 y 7 días en modificar su comportamiento alimenticio, para demandar principalmente en las primeras horas de la disponibilidad de alimento coincidiendo con las horas iniciales del fotoperiodo. Sin embargo, bajo periodos de luz continua perdieron su ritmicidad alimenticia. Nuestros experimentos sugieren, que bajo condiciones normales la dorada muestra un ritmo circadiano de alimentación sincronizado fundamentalmente por la luz, aunque los estudios de López-Olmeda y col. (2009) sugieren también un comportamiento dualístico. Es decir, que las doradas tienen capacidad para trasladar su actividad alimenticia del día a la noche y viceversa en función de las condiciones ambientales o fisiológicas.



# **CAPÍTULO III**

## **Efecto de los esteroides sobre el nivel de ingesta de la dorada**



## 5.1. Introducción

El control de la ingesta incluye un conjunto de complejos sistemas neuronales hipotalámicos y su interacción con otros sistemas, que transportan dicha información a los sistemas neuronales centrales (revisado por Volkov et al., 2005). En mamíferos, numerosos estudios han demostrado que la información endocrina periférica procedente del tejido reproductivo está involucrada en el control fisiológico del apetito (revisado por Eckel, 2004). Sin embargo, en peces existen contradicciones en el efecto de los esteroides sexuales sobre el control de la ingesta y el crecimiento. Mientras que en salmónidos (McBride et al., 1982) y ciprínidos (Lone, 1989 y referencias del propio artículo) se ha demostrado que los andrógenos, tanto sintéticos como gonadales, actúan como anabolizantes cuando se suministran en la dieta, en el pargo japonés, la testosterona no produce efecto alguno sobre ambos parámetros (Woo et al., 1993). Por el contrario, estudios realizados en tilapia sugieren que los andrógenos endógenos, testosterona y 11-ceto testosterona (11KT) son responsables del crecimiento diferencial en machos exhibido por la especie (Toguyeni et al., 1997); sin embargo, se han observado efectos opuestos en el pez gato y perca (Simone, 1990; Mandiki et al., 2004,). Dichas controversias, no sólo se producen con los andrógenos, sino que también han sido descritas tras el tratamiento con estrógenos (Cowey et al., 1973; Davis y Ludwig, 2004; Tzchori et al., 2004; Mandiki et al., 2005). Nuestro grupo elaboró un estudio en lubina para conocer el efecto de implantes de esteroides ( $\beta$ -estradiol y testosterona) en la ingesta de la lubina, demostrando que ambos esteroides, pero no los de androstenediona, reducen de manera dosis dependiente la ingesta y crecimiento (Leal et al., 2009). Las implicaciones en la producción de acuicultura pueden ser comprometidas, desde que



las estrategias de sustitución proteica y lipídica enfocan la inclusión de materias primas de origen vegetal. Dependiendo de la fuente vegetal, el contenido en fitoestrógenos puede ser elevado con las consecuentes implicaciones en el crecimiento y la eficiencia reproductora (Quesada-García et al., 2012).

El objetivo de este trabajo era conocer si el efecto anorexigénico de los esteroides sexuales que habíamos constatado en la lubina (Leal et al., 2009), se extendía a otras especies, particularmente la dorada. Para ello utilizamos implantes de 17- $\beta$  estradiol y androstenediona, como fuente no aromatizable de andrógenos. Tras basarnos en las dosis utilizadas en estudios previos en la lubina (Leal et al., 2009) y obtener una elevada mortalidad como consecuencia de las dosis utilizadas de estradiol, realizamos un segundo experimento reduciendo dichas dosis, en el que obtuvimos una reducción de la ingesta y crecimiento como consecuencia de la administración de los esteroides implantados.

## 5.2. Material y Métodos

La liberación de esteroides se realizó mediante implantes de silicona (Dowing) conteniendo  $17\beta$ -estradiol y 11 ceto-androstenediona (11K androstenediona) en diferentes dosis (Leal et al., 2009). Para la fabricación de los implantes se utilizó un molde estriado de acero, en el que cada estría tiene las siguientes dimensiones: 5 cm de largo por 2 mm de alto por 2 mm de ancho (Fig. 73). Por tanto, cada una de las estrías tiene un volumen de 200  $\mu$ l. Asumiendo una densidad de la silicona cercana a  $1\text{g/cm}^3$ , se utilizaron 200 mg de silicona para rellenar el contenido de una estría de 5 cm de longitud.

En función del tamaño de los peces y la dosis requerida se fabricaron los implantes, de forma que pudimos calcular la longitud necesaria del implante, para alcanzar una determinada dosis de liberación. A los implantes utilizados para los animales control no se les agregó esteroide alguno.

Tras pesar la cantidad necesaria de esteroide y los dos componentes de la silicona (matriz y catalizador), se mezclaron sobre una placa Petri, se esparció sobre las estrías del molde y se colocó a  $150^\circ\text{C}$  durante 2 horas para su polimerización. Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se extrajeron las tiras de silicona polimerizada y se lavaron mediante un pase rápido por etanol al 100% (Panreac). Este proceso de lavado pretendió retirar el esteroide más superficial para que no se produjera una liberación súbita tras la implantación, al igual que la esterilización del implante. Después de un secado al aire libre, los implantes fueron mantenidos en el interior de placas Petri a  $4^\circ\text{C}$  hasta su implantación.

Para la colocación de los implantes, los peces fueron anestesiados y colocados sobre una cuna exhibiendo su parte ventral. Con ayuda de un bisturí de pequeñas dimensiones, se practicó una

pequeña incisión en la zona abdominal del animal a través de la cual, se deslizó el implante con ayuda de unas pinzas esterilizadas previamente con etanol. Seguidamente la herida se untó con crema de povidona iodada para evitar infecciones, y el animal fue devuelto al tanque de recuperación. El porcentaje de mortalidad tras la operación de implantación fue nulo.



**Figura 73.** Plantillas usadas para la fabricación de los implantes de silicona.

**Experimento esteroides 1.** El primer ensayo fue orientado hacia la evaluación de los efectos de los esteroides sexuales sobre la ingesta de la dorada. Los peces tuvieron un peso y talla media de  $356,46 \pm 59,16$  g y  $25,7 \pm 13,7$  cm, respectivamente. El estudio integró 4 tratamientos experimentales: un grupo control implantado con silicona sin esteroides (CNTL), dos grupos implantados con 17- $\beta$  estradiol en dosis de 50 (E50) y 10 (E10)  $\mu\text{g/g}$  de pez y un grupo implantado con androstenediona (Steraloids) a dosis de 10  $\mu\text{g/g}$  de pez (ANDRO). Estos tratamientos fueron desarrollados por cuadruplicado ( $n=4$ ). En cada tanque se repartieron 10 animales de tallas y pesos similares no existiendo diferencias significativas en ambos parámetros al inicio del experimento. Cada animal fue implantado con segmentos de 1.5 cm de silicona, a través de la incisión abdominal, con la cantidad de esteroide necesaria para alcanzar las dosis experimentales anteriores, en función del peso de los

peces estimado a partir del muestreo previo de reparto de animales. La temperatura media del agua durante el experimento fue de 14,2°C.

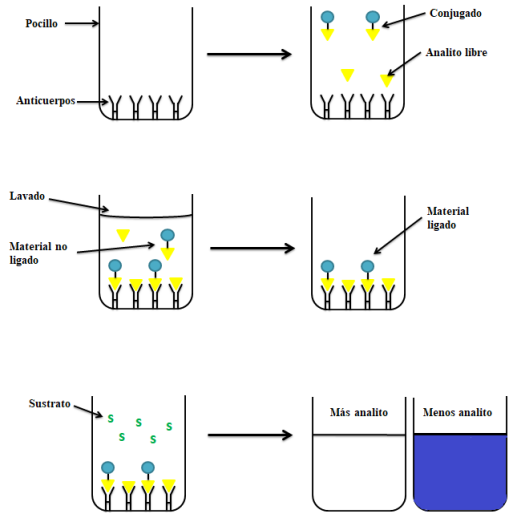
La ingesta de los animales fue registrada durante 25 días consecutivos utilizando los sistemas de auto-demanda descritos previamente. Los niveles de ingesta fueron calculados como se ha descrito anteriormente. Tras el periodo experimental, los animales de todos los tanques fueron pesados y medidos para estimar las variaciones en peso/talla impuestas por los tratamientos. Además, se extrajo sangre, mediante punción caudal, de 10 animales por tratamiento para estimar los niveles de esteroides inducidos por la implantación. Las muestras de sangre, dispuestas en tubos “ependorf” conteniendo 10 µl de EDTA 100 mM como anticoagulante, fueron centrifugadas a 4°C durante 30min a 3000 rpm. Una vez separado el plasma de la fracción celular y dispuesto en tubos limpios, se congeló a -20°C hasta su análisis.

**Experimento esteroides 2.** Las dosis utilizadas en el ensayo 1 fueron las mismas que las ensayadas por Leal et al., (2009) en la lubina europea. A diferencia de esta última especie, la mortalidad inducida por la implantación de estrógenos en la dorada fue muy superior, por lo que decidimos repetir el experimento utilizando dosis menores de esteroides.

En este caso, los peces tuvieron un peso y talla media de  $502.65 \pm 47.43$  g y  $28.62 \pm 1.01$  cm respectivamente, y las dosis de esteroides que recibieron fueron de 2 y 5 µg/g de 17-β estradiol y 10 µg/g de androstenediona. El diseño experimental fue idéntico al descrito anteriormente para el ensayo 1, pero el número de peces fue reducido a 8 por tanque experimental. Los niveles de ingesta diarios se registraron durante 30 días y la temperatura media del experimento fue de 17°C. Al final del experimento se extrajo sangre de 15 animales por tratamiento y se pesaron y

midieron todos los individuos, para estimar el efecto de los esteroides sobre el crecimiento/engorde de la dorada. La sangre fue procesada siguiendo el procedimiento descrito para el ensayo 1.

***Determinación de los niveles de 17  $\beta$ -estradiol.*** Para el análisis de los niveles de 17  $\beta$ -estradiol se usó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) siguiendo las instrucciones del proveedor (Neogen). Este ensayo se basa en la competencia existente entre el conjugado enzimático y el estradiol presente en la muestra, para un número limitado de lugares de unión presentes en la placa recubierta de anticuerpo (Fig. 74). Se establece una correlación inversa entre el desarrollo del color enzimático obtenido al añadir el sustrato y la cantidad de hormona presente en la muestra. Mediante la medición de la absorbancia en el lector de placas (Tecan) se evaluó el desarrollo del color. Los datos obtenidos son transformados mediante la función “logit”, para poder evaluar por interpolación los niveles de antígeno/hormona (Cerdá-Reverter et al., 1996).



**Figura 74.** Esquema del Elisa de 17  $\beta$ -estradiol. El anticuerpo anti-17  $\beta$ -estradiol se encuentra adherido a las paredes el pocillo. Se añade una cantidad de hormona y la muestra con 17  $\beta$ -estradiol. Ambas hormonas compiten por unión al anticuerpo. Tras varios lavados se elimina el antígeno que no se ha unido. Se incuba para desarrollar el color y poder medirlo por espectrofotometría a 650nm.

### 5.3. Resultados

**Experimento esteroides 1.** Acorde a nuestros experimentos previos desarrollados en la lubina (Leal et al., 2009), utilizamos dosis de 10 y 50  $\mu\text{g}$  de estradiol por gramo de peso corporal. La dosis de antrostenediona fue de 10  $\mu\text{g/g}$ , similares a las empleadas en la lubina. Los tratamientos fueron aplicados por triplicado sobre poblaciones de 10 animales (ver material y métodos) durante 25 días consecutivos. Los peces fueron seleccionados por talla y peso al inicio del ensayo, con la finalidad de que no existiesen diferencias significativas en ambos parámetros al inicio del experimento. Como se muestra, esta selección se realizó correctamente no detectándose diferencias iniciales en el peso de los animales (Tabla 21).

**Tabla 21.** Pesos iniciales de los tratamientos.

<b>Tratamiento</b>	<b>Peso Inicial</b>	<b>SEM</b>
Control	36.4	1.3
Andro	34.99	1.52
E10	35.01	0.68
E50	36.13	0.21

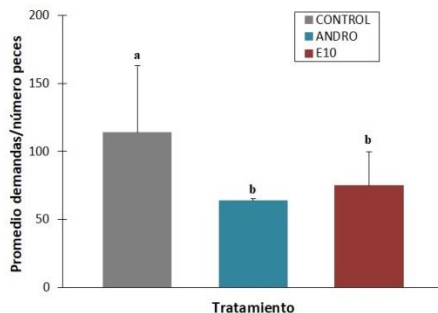
A diferencia de lo ocurrido en los experimentos con la lubina (Leal et al., 2009), las doradas implantadas con las mismas dosis de estrógenos mostraron una mortalidad elevada, especialmente en el grupo implantado con dosis más altas (E50), y moderada en el grupo E10. Esta mortalidad fue negligible en los grupos control o aquellos implantados con andrógenos sintéticos (Tabla 22).

**Tabla 22.** Mortalidad experimental.

Tratamiento	Peces iniciales	Peces finales	Porcentaje muertes (%)
Control	30	29	3
Andro	30	30	0
E10	30	26	13
E50	30	14	53

Número de peces al inicio y final del experimento 1, tras 25 días consecutivos de tratamiento con esteroides. La columna de la derecha representa el porcentaje de muertes para cada tratamiento.

En base a estos resultados decidimos eliminar el grupo E50 de los análisis posteriores. El análisis del promedio de demandas diarias/número de peces muestra que ambos tratamientos (ANDRO y E10), exhiben una menor actividad alimenticia a lo largo del periodo experimental (Fig. 75).



**Figura 75.** Promedio demandas/ número de peces de los tres grupos experimentales. Las letras iguales indican que no hay diferencias entre esos grupos tras realizar el análisis univariado con el test de Scheffé ( $P < 0.05$ ). Andro (androstenediona) y E (estradiol).

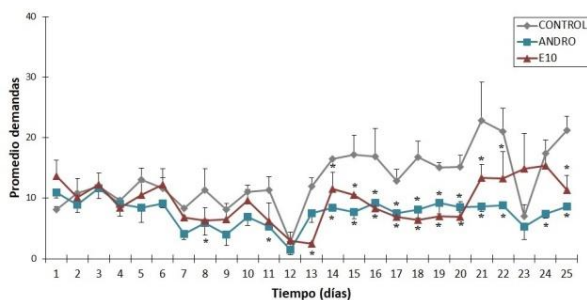


Como muestra el análisis univariado, no existieron diferencias en el número promedio de demandas entre los tratamientos experimentales, pero sí de ambos tratamientos respecto del control.

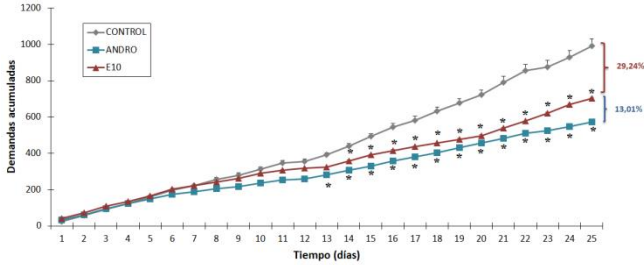
**Tabla 23.** Resultados del análisis univariado usando Scheffé como Post Hoc.

Tratamiento	Tratamiento	Diferencia de medias	Desv. Error	Sig.
Control	Andro	2,33	,18	,000
	E10	2,26	,18	,000
Andro	Control	-2,33	,18	,000
	E10	-,06	,18	,940
E10	Control	-2,26	,18	,000
	Andro	,06	,18	,940

La figura 76 muestra la evolución de las demandas medias diarias en cada tratamiento, mientras que la figura 77 muestra las demandas acumuladas a lo largo del periodo experimental.



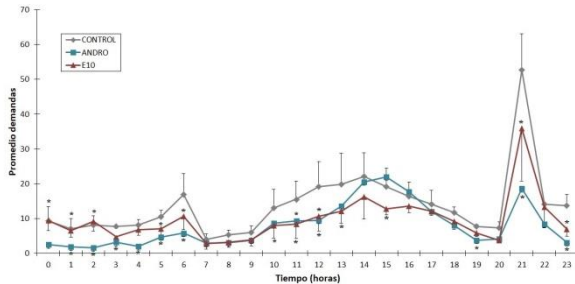
**Figura 76.** Promedio de demandas en los diferentes días experimentales para los tres tratamientos. El asterisco representa las diferencias significativas con respecto al control, tras el análisis univariado ( $p < 0.05$ ).



**Figura 77.** Demandas acumuladas de los tratamientos, mostrando el asterisco las diferencias entre la basal y los tratamientos, tras el análisis univariado  $p < 0.05$ ).

Como se observa en la figura 77, las diferencias empiezan a aparecer a partir del décimo tercer día de tratamiento en el grupo implantado con andrógenos, y sensiblemente más tarde (décimo cuarto) en el grupo implantado con estrógenos E10.

Los tratamientos no modificaron el perfil diario de alimentación si bien, a diferencia de resultados anteriores, encontramos un pico masivo muy elevado de demandas al final de la fase luminosa, al igual que cierta actividad nocturna preferentemente en los tratamientos control y E10.



**Figura 78.** Promedio de demandas a lo largo de las horas. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto al control, tras análisis univariado con Scheffé como Post Hoc ( $p < 0.05$ ).

Tras conocer que los esteroides produjeron diferencias en la ingesta respecto a los controles, se cuantificaron los niveles de estradiol en sangre, representados en la figura 79. Los resultados mostraron un incremento significativo de los niveles de estradiol en el grupo implantado con la mayor dosis de estradiol (E50), sin embargo, los peces pertenecientes al grupo E10 obtuvieron similares niveles a los controles.

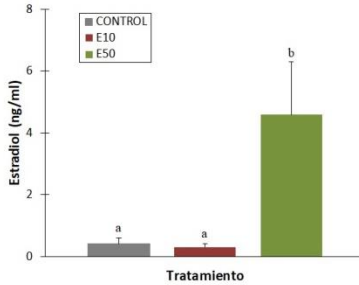
Estas modificaciones en los niveles de demandas no tuvieron una traducción a nivel de crecimiento, ya que no encontramos diferencias en el peso final de los peces tratados con esteroides (Tabla 24).

**Tabla 24.** Muestreo inicial y final del periodo de experimentación.

Tratamiento	Peso Inicial	SEM	Peso Final	SEM
Control	36,4 <sup>a</sup>	1,3	42,40 <sup>b</sup>	5,97
Andro	35,0 <sup>a</sup>	1,52	39,23 <sup>b</sup>	4,24
E10	35,01 <sup>a</sup>	0,68	43,38 <sup>b</sup>	8,36

Letras diferentes indican diferencias significativas respecto del peso.

Tras analizar los niveles de estrógenos, corroboramos que las dosis más elevadas de estrógenos (E50) indujeron una fuerte elevación en de los niveles de E2 en plasma, sin embargo, las dosis más bajas (E10) no llegaron a producir elevaciones significativas tras 25 días post-implantación (Fig. 79).



**Figura 79.** Niveles de estradiol en plasma de peces tratados con implantes silásticos con dosis de 50 (E50) y 10 µg/g (E10) tras 25 días experimentales. Las dosis más elevadas (E50) indujeron una fuerte mortalidad en los peces (53%). La diferentes letras muestran diferencias significativas entre los tratamientos obtenidas mediante el análisis univariado con Scheffé como Post Hoc ( $p < 0.05$ ).

Posteriormente, se realizó un estudio de las series temporales. En primer lugar, procedimos a analizar el tratamiento control donde se vio que la ingesta de cada día dependía de lo que comían 2 horas antes y hasta 7 días antes, quedando la ecuación:

$$Y_h = 0.116 + 0.263 Y_{h-1} + 0.097 Y_{h-2} + 0.118 Y_{h-24} + 0.121 Y_{h-48} + 0.172 Y_{h-72} + 0.047 Y_{h-96} + 0.04 Y_{h-120} + 0.038 Y_{h-144} + 0.128 Y_{h-168}$$

Las variables introducidas para el tratamiento control representaron un 35.5 % ( $R^2 = 0.355$ ) de la variación de la ingesta.

Para el tratamiento con Andro, se obtuvo que la ingesta sólo dependía de lo que habían comido desde 1 hora hasta 2 días antes, quedando la ecuación siguiente:

$$Y_h = 0.771 + 0.312 Y_{h-1} + 0.215 Y_{h-24} + 0.210 Y_{h-48}$$

Las variables explicaban un 31 % ( $R^2 = 0.31$ ) de la variación de la ingesta.

Finalmente, el tratamiento con E10, mostró que la influencia en la ingesta venía de 2 horas antes hasta 8 días antes.

$$Y_h = 0.108 + 0.269 Y_{h-1} + 0.134 Y_{h-2} + 0.056 Y_{h-24} + 0.121 Y_{h-48} \\ + 0.083 Y_{h-72} + 0.035 Y_{h-96} + 0.081 Y_{h-120} \\ - 0.006 Y_{h-144} + 0.106 Y_{h-168} + 0.056 Y_{h-192}$$

En este caso, las variables explicaban un 41.3% ( $R^2 = 0.413$ ) de variación de la ingesta.

Tras el análisis se advirtió que los peces tratados con E10 y control, fueron los que mayor memoria a nivel de ingesta poseían, hasta 8 y 7 días, respectivamente. Finalmente, fueron los tratados con Andro, los que obtuvieron la memoria más baja a nivel de ingesta, ya que solo fue de 2 días. Se procedió a realizar el análisis univariado con los *Post Hoc* de Scheffé donde se obtuvo que, tanto las variables principales como sus interacciones fueron estadísticamente significativas, como se muestra en la siguiente tabla.

**Tabla 25.** Resultados del análisis univariado ( $p < 0.05$ ).

	Tipo III de Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	93488,36	695	134,51	4,65	,000
Intercepto	85632,89	1	85632,89	2962,35	,000
Trat	6315,06	2	3157,53	109,23	,000
Día	6360,63	24	265,03	9,17	,000
Hora	36796,93	23	1599,86	55,34	,000
Día * hora	31297,98	552	56,69	1,96	,000
Día * trat	4545,91	48	94,70	3,27	,000
Hora * trat	8169,63	46	177,60	6,14	,000
Error	135949,86	4703	28,90		
Total	315040,00	5399			
Total corregido	229438,22	5398			

**Experimento esteroides 2.** Los niveles elevados de mortalidad en los peces tratados con los niveles más altos de estrógenos, nos llevaron a repetir el experimento reduciendo los niveles implantados para corroborar un efecto de dosis respuesta. En este caso, los animales fueron tratados con dosis de 2 y 5  $\mu\text{g/g}$  peso corporal y mantuvimos los niveles de andrógenos (10 $\mu\text{g/g}$  peso corporal) para corroborar sus efectos. Las nuevas dosis no indujeron mortalidad alguna, corroborando que las dosis del experimento anterior fueron las causantes de la mortalidad experimental observada.

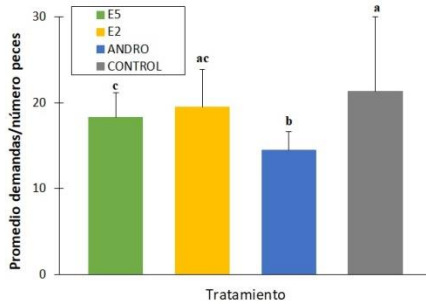
La tabla 1 muestra los efectos del tratamiento a nivel de las variaciones de peso de los animales experimentales. Tras el periodo experimental (30 días), solamente se observó una ligera ganancia de peso significativa en los animales tratados con las dosis más bajas de estrógenos (E2) con respecto a su peso inicial.

**Tabla 26.** Muestreo inicial y final del periodo de experimentación.

Tratamiento	Peso Inicial	SEM	Peso Final	SEM
Control	63.93 <sup>a</sup>	11.08	66.95 <sup>a</sup>	5.61
Andro	61.75 <sup>a</sup>	9.8	62.55 <sup>a</sup>	8.92
E2	63.14 <sup>a</sup>	1.31	67.94 <sup>b</sup>	4.14
E5	62.51 <sup>a</sup>	7.16	64.77 <sup>a</sup>	6.55

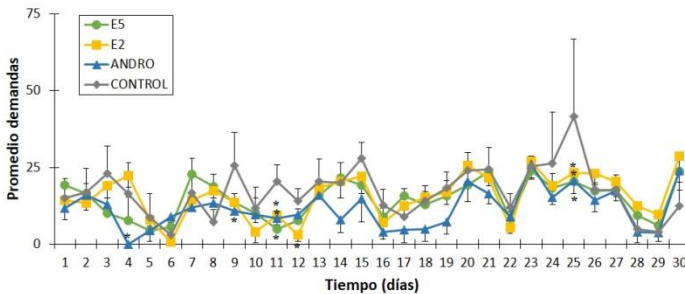
Letras diferentes indican diferencias significativas respecto del peso, tras una ANOVA.

Al analizar las demandas observamos, como en el experimento 1, que el tratamiento con andrógenos no aromatizables indujo una inhibición de la actividad alimenticia siendo esta, diferente del resto de los tratamientos (Control, E2 y E5) (Fig. 80). La dosis más elevada de estrógenos (E5) provocó también un descenso de las demandas que no llegó a ser significativo en el caso de las dosis más reducidas de (E2), mostrando una clara regulación del comportamiento alimenticio dosis dependiente.



**Figura 80.** Promedio de demandas diarias en los diferentes tratamientos experimentales. Las letras diferentes indican diferencias significativas tras análisis univariado con Scheffé como Post Hoc ( $p < 0.05$ ).

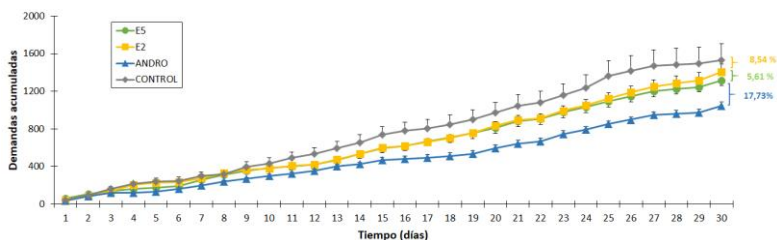
La figura 81, muestra los niveles promedio diarios de ingesta en los 4 tratamientos indicando la variabilidad de la ingesta diaria de los animales.



**Figura 81.** Evolución del promedio de demandas en los 4 tratamientos a lo largo de los días. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a los valores del control, tras el análisis univariado.

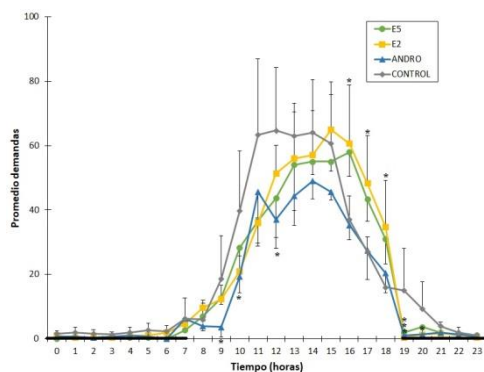
Al estudiar las demandas acumuladas, observamos que las diferencias significativas en el número de demandas aparecen en los días para los tratamientos Andro y E5, respectivamente. El tratamiento E2 no indujo diferencias significativas, aunque la

reducción del número de demandas superó el 5% al final del periodo experimental (Fig. 82).



**Figura 82.** Demandas acumuladas en los diferentes tratamientos a lo largo del periodo experimental. Los asteriscos indican diferencias respecto al control. Los porcentajes indicados son siempre respecto al tratamiento control, tras el análisis univariado.

El patrón diario de ingesta fue estrictamente diario, con máximos en el segmento central del periodo lumínico. Ninguno de los tratamientos indujo diferencias en el patrón circadiano. A diferencia del experimento anterior no observamos una actividad alimenticia tan elevada al final del periodo de luz (Fig. 83).



**Figura 83.** Ritmo diario de demandas (promedio) en las doradas con los diferentes tratamientos. El área negra de la parte de la figura representa la fase oscura del fotoperiodo. Los asteriscos muestran diferencias significativas respecto a los valores del control, después de realizar un análisis univariado.



Tras analizar la ingesta durante todo el experimento, se realizó un estudio de las series temporales mediante regresión. Así, se concluyó que, en el caso del tratamiento control, la cantidad de pienso que comían cada día dependía de lo que comían 2 horas antes y hasta 9 días antes, por tanto, la ecuación con los resultados quedó la siguiente:

$$\begin{aligned}
 Y_h = & 0.067 + 0.363 Y_{h-1} + 0.061 Y_{h-2} + 0.198 Y_{h-24} + 0.101 Y_{h-48} \\
 & + 0.014 Y_{h-72} + 0.078 Y_{h-96} - 0.019 Y_{h-120} \\
 & - 0.001 Y_{h-144} + 0.019 Y_{h-168} + 0.011 Y_{h-192} \\
 & + 0.079 Y_{h-216}
 \end{aligned}$$

Las variables introducidas para la dieta control representaron un 43.2 % ( $R^2= 0.432$ ) de la variación de la ingesta.

Para los implantados con androstenediona (Andro), se obtuvo que la ingesta de cada día dependía de lo que habían comido desde 2 horas hasta 7 días antes, quedando la ecuación siguiente:

$$\begin{aligned}
 Y_h = & 0.119 + 0.174 Y_{h-1} + 0.104 Y_{h-2} + 0.097 Y_{h-24} + 0.091 Y_{h-48} \\
 & + 0.021 Y_{h-72} + 0.078 Y_{h-96} + 0.043 Y_{h-120} \\
 & + 0.083 Y_{h-144} + 0.114 Y_{h-168}
 \end{aligned}$$

Las variables explicaban un 19.3 % ( $R^2= 0.193$ ) de la variación de la ingesta.

En cuanto a los implantados con E5, se obtuvo que estaban influenciados por lo ingerido desde 2 horas hasta 9 días antes.

$$\begin{aligned}
 Y_h = & 0.109 + 0.215 Y_{h-1} + 0.086 Y_{h-2} + 0.176 Y_{h-24} - 0.078 Y_{h-48} \\
 & + 0.02 Y_{h-72} + 0.098 Y_{h-96} + 0.085 Y_{h-120} \\
 & - 0.172 Y_{h-144} + 0.089 Y_{h-168} - 0.079 Y_{h-192} \\
 & + 0.073 Y_{h-216}
 \end{aligned}$$

En este caso, las variables explicaban un 38.2% ( $R^2= 0.382$ ) de variación de la ingesta.

Finalmente, en los implantados con E2, se percibió que se encontraban influenciados por lo ingerido desde 3 horas hasta 7 días antes.

$$Y_h = 0.065 + 0.360 Y_{h-1} + 0.076 Y_{h-2} - 0.051 Y_{h-3} + 0.135 Y_{h-24} \\ + 0.071 Y_{h-48} - 0.033 Y_{h-72} + 0.147 Y_{h-96} \\ + 0.109 Y_{h-120} + 0.05 Y_{h-144} + 0.082 Y_{h-168}$$

En este caso, las variables explicaban un 50.1 % ( $R^2 = 0.501$ ) de variación de la ingesta. Se observó que los animales control y E5 poseían una memoria de hasta 9 días, mientras que la memoria a nivel de ingesta de los Andro y E2 sólo alcanzó hasta los 7 días. En este experimento se obtuvo que las variables del tratamiento con E2 fueron las que explicaron más sobre el nivel de ingesta (50%), mientras que las de Andro apenas llegaban a un 20%. Todas las figuras anteriores se ven corroboradas con la tabla 27, que muestra los resultados del análisis estadístico, en el cual todas las variantes analizadas salen con diferencias significativas.

**Tabla 27.** Resultados del análisis univariado con el SPSS.

	<b>Tipo III de suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
Modelo corregido	7675,78	878	8,74	7,57	,000
Intersección	3251,29	1	3251,29	2817,45	,000
Día * hora	2252,38	667	3,38	2,93	,000
Día * trat	213,45	87	2,45	2,13	,000
Hora * trat	255,71	69	3,71	3,21	,000
Día	519,29	29	17,91	15,52	,000
Hora	4373,66	23	190,15	164,78	,000
Tratamiento	59,47	3	19,82	17,18	,000
Error	8954,91	7760	1,15		
Total	19881,00	8639			
Total corregido	16630,69	8638			

## 5.4. Discusión

Los experimentos anteriores demuestran inequívocamente que tanto los estrógenos como los andrógenos no aromatizables, inducen una reducción de la actividad alimenticia en la dorada. Esta especie parece ser altamente sensible a los esteroides en función de la mortalidad asociada a los tratamientos de dosis más elevadas (E10 y E50). Estas mismas dosis se han utilizado en otras especies marinas, como en la lubina (Leal et al., 2009), y dulceacuícolas, como en el carpín dorado (Cerdá-Reverter et al., 2006), sin efectos sobre la mortalidad de los animales. Estos resultados sugieren que la fisiología de la dorada es especialmente sensible a los tratamientos con estrógenos, o por extensión, a la presencia de componentes estrogénicos en el medio o su alimento. Experimentos en ratas han descrito que el 2-methoxyestradiol, un producto del metabolismo del 17  $\beta$ -estradiol en el cerebro, genera neurotoxicidad (Picazo et al., 2003). Además, en algunas especies de mamíferos, se ha publicado que los estrógenos inducen cambios en la sinapsis del núcleo arcuato, un área clave en la regulación del balance energético (Hung et al., 2003). Por ello, nuestra elevada mortalidad observada en las dosis más elevadas de estradiol podría deberse a una neurotoxicidad, pero desafortunadamente no analizamos parámetros indicadores de la misma.

En acuicultura existe una clara tendencia hacia la sustitución de aceites y harinas de pescado por componentes vegetales reduciendo así el coste de los piensos, que suponen el principal gasto en la producción de peces. Esta estrategia puede ayudar, paralelamente, a la sostenibilidad del proceso de producción, ya que reduce la incidencia sobre los stocks pesqueros a nivel mundial. Sin embargo, la inclusión de materias primas vegetales no está exenta de problemas. Uno de ellos, es la incorporación en

las dietas de sustancias estrogénicas no esteroideas (Pelissero y Sumpter, 1992; Miyahara et al., 2003). Existen numerosas publicaciones describiendo los efectos estrogénicos de los fitoestrógenos en peces, aunque las publicaciones sobre el control del comportamiento alimenticio son más escasas. Los efectos fisiológicos de los fitoestrógenos no se medían exclusivamente a través de la unión a los receptores nucleares y de membrana de estrógenos (Miyahara et al., 2003), ya que las principales isoflavonas de la soja también son capaces de inhibir el metabolismo del estradiol (Ng et al., 2006) y la actividad del complejo aromataasa en los salmónidos (Pelissero et al., 1996). Se ha demostrado que la genisteína, una isoflavona presente en la soja, inhibe la ganancia de peso en la perca amarilla (*perca flavescens*) (Ko et al., 1999), aunque no se vieron efectos en anguila (Tzchori et al., 2004). En mamíferos, se ha demostrado el efecto de la genisteína en la reducción de la ingesta y del peso corporal (Kim et al., 2006; Cave et al., 2007), promoviendo, además, cambios en varias hormonas metabólicas (Szkudelska y Nogowski, 2007). Nuestros experimentos previos han demostrado la presencia de componentes estrogénicos en los piensos de acuicultura (Quesada-García et al., 2012). Utilizando un sistema *in vitro* basado en la transactivación del gen de la luciferasa dependiente del receptor de estrógenos  $\alpha$  de la lubina, demostramos que 11 de los 32 piensos comerciales testados (aproximadamente 1/3), presentaban actividad estrogénica, mientras que 18 de ellos presentaban actividad tiromimética. Nuestros resultados derivados de los efectos de los estrógenos sobre el nivel de ingesta, sumados a la sensibilidad de la dorada a estos componentes, sugieren que la presencia de componentes estrogénicos en los piensos de peces podría inhibir el comportamiento alimenticio, y por extensión la ingesta de los

animales, comprometiendo el crecimiento y la eficiencia de proceso productivo.

Sorprendentemente, esta disminución en el número de demandas nunca tuvo repercusiones negativas sobre el crecimiento de los animales. En la lubina las dosis inferiores aplicadas (E10) no tuvieron efectos negativos sobre la ingesta ni el crecimiento, pero sí aquellas más elevadas (E50), sugiriendo una vez más, esa mayor sensibilidad de la dorada a la exposición de esteroides. Las reducciones en las demandas acumuladas fueron aproximadamente del 13 y el 30 %, después de un periodo de 30 días para los tratamientos E5 y E10, respectivamente. Es probable que el periodo experimental sea demasiado corto para ver diferencias significativas en el peso asociadas a estas reducciones en las demandas.

Por el contrario, la dosis más baja de estradiol (E2), estimuló el crecimiento en peso de los peces, sin modificar el comportamiento de demandas alimenticias. Estos resultados sugieren, que el aumento moderado de los niveles de estrógenos puede tener efectos positivos sobre la conversión del alimento, o el propio crecimiento estructural de los animales. Se sabe que el estradiol puede estimular la síntesis y secreción de hormona de crecimiento en peces, y es probable que estas dosis más bajas puedan ejercer este efecto (Canosa et al., 2007).

En nuestros experimentos, también utilizamos 11K-androstenediona como fuente no aromatizable de andrógenos. Este andrógeno es el precursor inmediato en la síntesis de 11 ceto-testosterona (11K-testosterona), que es el principal andrógeno de peces (Borg, 1994). Nosotros ya hemos demostrado previamente que la implantación de este andrógeno se traduce en un incremento significativo de los niveles plasmáticos de 11K-testosterona en la lubina (Leal et al., 2009). La implantación de testosterona, presenta el inconveniente de su conversión endógena

a estradiol mediante aromatización, gracias a la acción de la aromatasa (González y Piferrer, 2003; Blázquez y Piferrer, 2004). A diferencia de lo ocurrido en lubina, donde las implantaciones de las mismas dosis de andrógenos no tuvieron efecto sobre la ingesta, en la dorada la 11K androstenediona, indujo una disminución significativa de los niveles de ingesta que pudo constatare en ambos experimentos. Dicha disminución no provocó diferencias significativas en el peso de los animales, si bien es cierto, que en ambos experimentos fueron los que exhibieron menor peso final, sugiriendo que efectivamente esta reducción en la ingesta tiene una consecuencia en el crecimiento de los animales. De forma similar, los tratamientos con andrógenos no aromatizables en la lubina atenuaron la ganancia de peso, aunque las diferencias en la tasa de crecimiento no llegaron a alcanzar diferencias significativas (Leal et al., 2009). Los agentes anabólicos se caracterizan principalmente por promover el crecimiento de la masa muscular y fortalecer las estructuras óseas, gracias a su capacidad de retener el nitrógeno procedente del alimento, acelerando la tasa de absorción de aminoácidos en el intestino. Asimismo, favorecen la eritropoyesis y son capaces de fomentar la retención del calcio y fósforo, elementos imprescindibles en el desarrollo del cartílago de los huesos, contribuyendo al incremento en el peso y la talla de los individuos (Weatherley y Gill, 1987; Wilson y Brigstocke, 1987; Mommsen y Moon, 2001). Ya en la década de los 70 se demostró que la administración de andrógenos anabólicos promueve el crecimiento en peces, aumentando la incorporación de aminoácidos en el músculo (Matty y Cheema, 1978). Estudios más tardíos en el pargo japonés, revelaron que la testosterona ejerce sus acciones anabólicas a través del incremento de la ingesta, la eficiencia en la conversión alimenticia y la actividad de las enzimas digestivas (Woo et al., 1993). No obstante, estos

efectos parecen ser dependientes de la especie, ya que el tratamiento de peces gato con 17- $\beta$ -metiltestosterona coartó el crecimiento de juveniles (Simone, 1990), y lo mismo ocurrió en percas euroasiáticas implantadas 17- $\beta$ -metiltestosterona, en la que una reducción en los niveles de ingesta y conversión del alimento fueron responsables de tal efecto (Mandiki et al., 2004). Sin embargo, la administración oral atenuó la ingesta sin reducir el crecimiento de los peces, con la supuesta mejora en la utilización del alimento (Mandiki et al., 2005). En base a nuestros resultados, la dorada se suma a ese grupo de especies, en las que la administración de andrógenos tiene consecuencias negativas sobre la fisiología de la ingesta y el crecimiento.





# **CAPÍTULO IV**

## **Efecto de los aditivos experimentales sobre el efecto de la ingesta inducido por el estrés**



## 6.1. Introducción

La definición de algo tan convencional en nuestras vidas como el estrés es realmente compleja, en realidad no es más que la respuesta fisiológica de un organismo a una variable ambiental o estresor. Una definición más exacta puede ser: la cascada de eventos fisiológicos que ocurren una vez el organismo intenta evadir la muerte o restablecer un equilibrio homeostático tras encarar una alteración ambiental interna o externa (Schrek y Tort, 2016). En vertebrados, esta respuesta fisiológica conlleva la activación de dos ejes principales, el eje hipotalámico-simpático-cromafín (HSC) y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), o su equivalente en peces hipotálamo-pituitaria-interrenal (HPI). Ambos sistemas se activan con diferente celeridad con el fin principal de movilizar reservas, para que el organismo disponga de energía con la que afrontar la demanda metabólica incrementada inducida por el estresor (revisado por Wenderlar, 1997). Cuando esta reubicación energética se mantiene en el tiempo durante el estrés crónico, puede llegar a comprometer muchas funciones vitales incluyendo el crecimiento. Las causas de este retardo en el crecimiento inducido por el estrés son diversas, pero una de las características más comunes es la disrupción del comportamiento alimenticio y la consecuente reducción de los niveles de ingesta (Bernier, 2006). Sin embargo, las condiciones de estrés también pueden inducir una reducción en la eficiencia de la conversión alimenticia que puede llevar a reducciones en el crecimiento, aun cuando los niveles de ingesta son similares (Leal et al., 2011). Esta reducción de la conversión alimenticia puede deberse a una tasa de actividad mayor de los animales o a una disrupción de la regulación metabólica, que conducen a un gasto energético mayor o incluso una reducción en

la absorción intestinal de los nutrientes. Además, los factores estresantes pueden modificar directamente la regulación del eje de crecimiento endocrino, incluyendo la secreción de la hormona del crecimiento pituitaria (GH) y la síntesis de factores de crecimiento hepáticos similares a la insulina (IGF) (Rotllant et al., 2001; revisado por Dean y Woo, 2009; Saera-Vila et al., 2009).

El producto de la activación del eje HPI es el cortisol, principal glucocorticoide en peces. La elevación de sus niveles séricos es, quizás, una de las características de la respuesta al estrés más conservadas a nivel evolutivo, y se utiliza habitualmente como un marcador de los niveles de estrés a los que está sometido el organismo (revisado por Wenderlar, 1997, revisado por Mommsen et al., 1999; Barton, 2002; Aluru y Vijayan, 2009). El cortisol parece mediar muchos de los efectos fisiológicos y conductuales del estrés. Su administración exógena conlleva reducciones del nivel de ingesta, de la tasa de conversión alimenticia y consecuentemente del crecimiento, comprometiendo, además, la tasa de absorción de nutrientes e incrementado el gasto energético (Bernier, 2006; Leal et al., 2011).

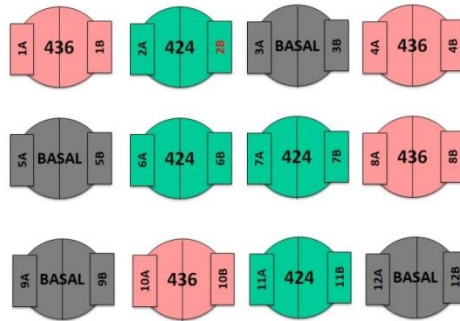
Desde el punto de vista productivo, el estrés al que están sometidos los peces en cultivo, es uno de los principales hándicaps de la acuicultura moderna. Mitigar sus efectos en función de diversas estrategias ha sido, y es, un área muy activa de investigación, en la que las empresas, tanto de cultivo como de manufacturado de piensos, están altamente interesadas. En la actualidad, el desarrollo de piensos funcionales es una de las estrategias más prometedoras y que ha revelado ya éxitos prometedores. Los piensos funcionales son aquellos que, con independencia de aportar nutrientes, han demostrado afectar a una o varias funciones del organismo proporcionando una mejora en su estado de salud y bienestar. En uno de nuestros experimentos

destinado a la evaluación de los aditivos 424 y 436 sobre la ingesta hubo diversos eventos meteorológicos relacionados con la tormenta “Gloria” que supusieron unos niveles de estrés elevados para los animales derivados de cambios bruscos en la temperatura y turbidez del agua, ambos conocidos a afectar la ingesta de los animales (Rubio et al., 2010; Leal, 2011; Upton y Riley, 2013; Naderi et al., 2019). Para nuestra sorpresa las dietas experimentales fueron capaces de sobrepasar la disminución de ingesta impuesta por las condiciones de cultivo, patente en la dieta basal. Los resultados de estos experimentos no se han incluido en esta tesis debido a las evidentes deficiencias técnicas inducidas por las condiciones ambientales, pero sí que nos alertaron sobre la posible funcionalidad de estos aditivos a nivel de la respuesta al estrés. Por ello, tras analizar los resultados, diseñamos un nuevo experimento en el que introdujimos una fase de estrés agudo experimental, para evaluar los efectos de los aditivos sobre la reducción de ingesta inducida por el estrés.

## **6.2. Material y Métodos**

Para este experimento los tanques fueron subdivididos al 50% de su volumen mediante la colocación de un panel opaco de fibra. Cada sección del tanque fue dotada de un grifo para el suministro de agua y de sistemas de aireación, así como de un comedero de auto-demanda. Este sistema de panelación nos permitió incrementar la potencia experimental disponiendo de 24 tanques con la precaución de introducir siempre el mismo tipo de pienso en las dos sub-mitades de un mismo tanque, para evitar contaminaciones sensoriales. Al inicio, distribuimos 5 peces de aproximadamente 450 g (Tabla 28) en cada unidad experimental y se mantuvo una temperatura media de 17°C. El experimento se dividió en 4 fases: una primera fase de acomodación de 28 días

donde los animales fueron alimentados con piensos comerciales de Biomar, seguida de una segunda fase experimental de 34 días donde alimentamos cuatro tanques, equivalentes a 8 unidades experimentales, con piensos, basal 2, 424 y 436 (n=8 por pienso) (Fig. 84). Proseguimos con una tercera fase de 7 días donde los animales fueron estresados diariamente. El protocolo de estrés se realizó acorde a lo descrito por Leal et al., (2011). Brevemente, cada día se vaciaron los tanques de agua a la vez que se limpiaban mediante escobado, intentando emular situaciones propias del cultivo de peces. Los peces fueron expuestos al aire durante 1 minuto e inmediatamente se permitió la entrada de agua en el tanque hasta el llenado total del volumen. Este protocolo se repitió diariamente en horas aleatorias para evitar que los animales se adaptasen al estrés o a su temporalidad. Durante la fase final, se permitió la recuperación de los animales, suprimiendo el estrés y manteniendo la distribución de piensos experimentales durante 14 días.



**Figura 84.** Representación del diseño experimental utilizado en el experimento de estrés.

### 6.3. Resultados

La tabla 29 muestra los pesos de los animales al inicio y final del experimento. Evidentemente los peces incrementaron su peso durante el periodo experimental, pero no encontramos diferencias significativas al final de la experiencia (fase 4), sugiriendo que las diferentes dietas no fueron capaces de provocar diferencias de crecimiento en peso.

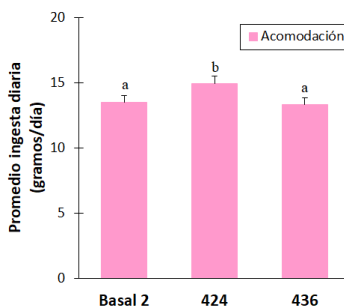
**Tabla 29.** Pesos iniciales y finales de las diferentes dietas.

Dieta	Peso Inicial (g)	SEM	Peso Final (g)	SEM
Basal 2	451.36 <sup>a</sup>	9.59	490.66 <sup>b</sup>	10.55
424	457.29 <sup>a</sup>	8.11	504.01 <sup>b</sup>	9.44
436	450.77 <sup>a</sup>	9.53	488.09 <sup>b</sup>	11.18

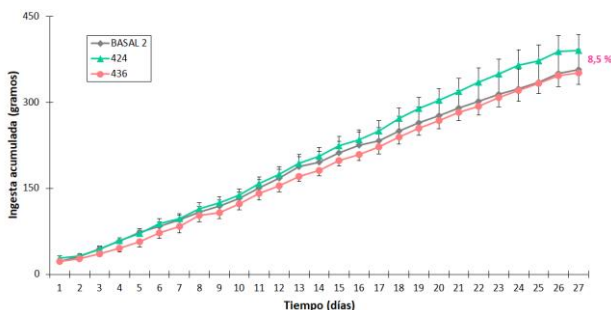
Las letras muestran diferencias tras una t-Student ( $p < 0.05$ ).

Durante la primera fase experimental los animales fueron alimentados con una dieta comercial para su acomodación. Sorprendentemente, tras 28 días encontramos que el grupo de tanques que después iba a ser alimentado con dieta 424 comía

significativamente más, a diferencia del grupo de tanques 436 (Fig. 85). Sin embargo, cuando analizamos la ingesta acumulada las diferencias no alcanzaron significación estadística (Fig. 86).



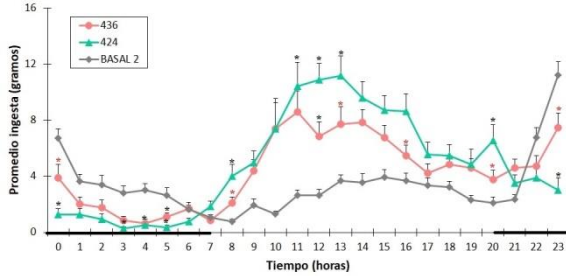
**Figura 85.** Ingesta media diaria de los grupos de tanques durante la fase de acomodación (Fase 1).



**Figura 86.** Ingesta acumulada de los grupos de tanques durante la fase de acomodación (Fase 1).

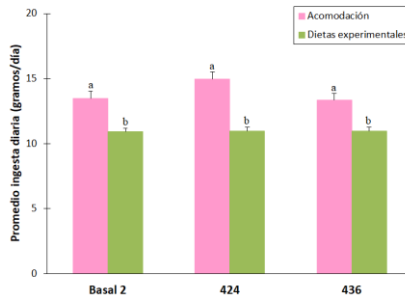
Tras analizar los ritmos de alimentación diarios, y a diferencia de los experimentos anteriores, los animales de los tres grupos experimentales mostraron una actividad nocturna que fue muy patente durante las primeras horas de la fase oscura, para reducirse durante el periodo hasta justo antes del amanecer donde volvieron a incrementar paulatinamente.





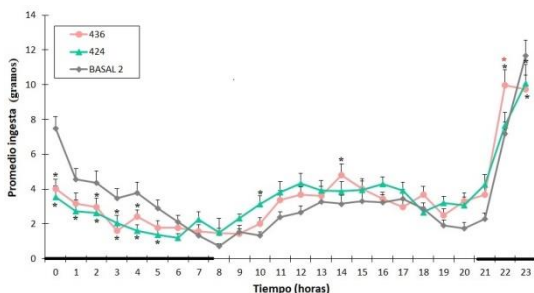
**Figura 87.** Ritmos diarios de alimentación de los grupos de tanques durante la fase de acomodación (Fase 1). Los asteriscos negros muestran las diferencias con respecto a la dieta basal 2 mientras que los asteriscos rojos muestran las diferencias con respecto a la dieta 424, tras el análisis univariado y los *post hoc* se Scheffé ( $p < 0.05$ ).

Durante la segunda fase experimental (Fase 2) los animales fueron alimentados con las dietas experimentales, y en las tres dietas observamos una reducción de los niveles medios de ingesta durante el periodo experimental respecto a los niveles de ingesta observados durante la fase de acomodación (Fig.88).



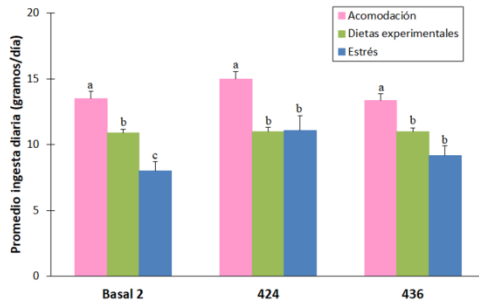
**Figura 88.** Ingesta media diaria de los grupos de tanques durante la fase de acomodación (Fase 1) y durante la fase experimental 2 en la que los animales ya fueron alimentados con las dietas experimentales. Las letras muestran las diferencias tras el análisis univariado ( $p < 0.05$ ).

Los perfiles de actividad diaria fueron similares a los observados durante la fase 1, es decir, con un elevado número de activaciones durante el periodo nocturno (Fig. 89).

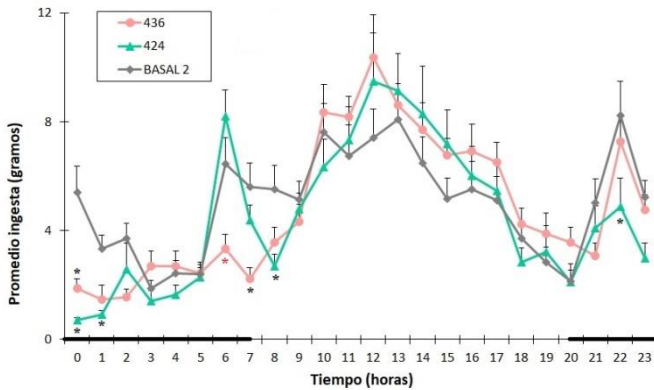


**Figura 89.** Ritmos diarios de alimentación de los grupos de tanques durante la fase experimental 2. Los asteriscos negros muestran las diferencias respecto a la dieta basal, mientras que los rojos son las diferencias frente a la dieta 424 tras el análisis univariado ( $p < 0.05$ ).

Durante la fase 3 aplicamos los protocolos de estrés, los cuales indujeron un descenso significativo de los niveles de ingesta respecto de los observados durante la fase 2, pero solamente en aquellos tanques que fueron alimentados con dieta basal 2. Por el contrario, el estrés no tuvo efecto sobre el nivel de ingesta en aquellos grupos de peces que fueron alimentados con las dietas experimentales 424 y 436.

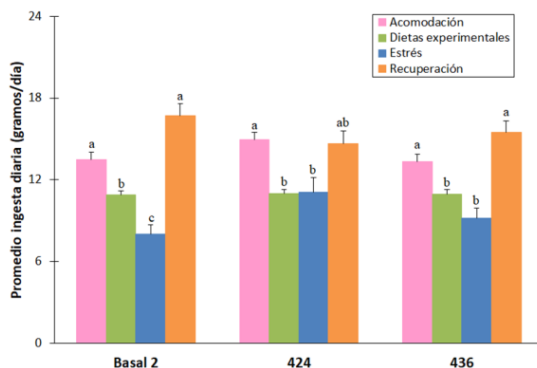


**Figura 90.** Ingesta media diaria de los grupos de tanques durante las fases experimentales 1, 2 y 3 en las que los peces fueron alimentados con una dieta comercial (Fase 1), con las dietas experimentales (Fase 2) y sometidos a protocolos de estrés y alimentados con las dietas experimentales (Fase 3). Las letras muestran las diferencias tras el análisis univariado.



**Figura 91.** Ritmos diarios de alimentación de los grupos de tanques durante la fase experimental 3. Los asteriscos negros muestran las diferencias respecto a la dieta basal, mientras que los rojos son las diferencias frente a la dieta 424 ( $p < 0.05$ ).

Una vez finalizados los protocolos de estrés los animales entraron en la fase de recuperación o fase 4, en la cual no observamos diferencias en el nivel de ingesta medio diario de los peces alimentados con las dietas experimentales (Figura 92).



**Figura 92.** Ingesta media diaria de los grupos de tanques durante las fases experimentales 1, 2, 3 y 4 en las que los peces fueron alimentados con una dieta comercial (Fase 1), con las dietas experimentales (Fase 2), sometidas a protocolos de estrés y alimentados con las dietas experimentales (Fase 3), y permitidos a recuperarse de la fase de estrés (Fase 4). Las letras indican las diferencias tras el análisis univariado.

## 6.4. Discusión

Uno de los motivos para iniciar esta línea de investigación aplicada en colaboración con LUCTA S.A., fue los posibles efectos negativos sobre la ingesta de las dietas de sustitución. La soja es la principal fuente vegetal presente en las dietas animales, aunque un elevado número de estudios han mostrado que su inclusión en altos porcentajes produce una disminución en la eficiencia de alimentación (revisado por Drew et al., 2007). Las sustancias estrogénicas no esteroideas están ampliamente

distribuidas entre los alimentos derivados de las plantas (Francis et al., 2001) y las propias dietas de peces (Pelissero y Sumpter, 1992; Matsumoto et al., 2004). Estas sustancias estrogénicas producen cambios comportamentales (Clofelter y Rodríguez, 2006) en los peces alimentados con estas dietas comerciales. Nuestros experimentos previos han demostrado que la elevación farmacológica de los niveles de estrógenos y andrógenos en la dorada inhiben la ingesta. Los resultados muestran que la dieta basal 2, la cual incorpora un porcentaje de sustitución vegetal considerable, induce un descenso de los niveles de ingesta en los grupos experimentales. Realmente nosotros no podemos concluir que los responsables de esta inhibición sean los componentes estrogénicos presentes en el componente vegetal de la dieta basal 2, ya que ambas dietas Biomar y basal 2 no fueron formuladas paralelamente, sin embargo, los resultados así lo sugieren. La incorporación de dos saborizantes específicos (424 y 436) en la dieta basal 2, no indujo diferencias en los niveles de ingesta, sugiriendo que, al menos, durante el periodo experimental la adición de ambos compuestos no pudo contrarrestar el efecto impuesto por la dieta basal 2.

Como esperábamos, los protocolos de estrés aplicados indujeron una inhibición de los niveles de ingesta. Estos protocolos de estrés crónico ya fueron utilizados anteriormente en la lubina generando resultados similares (Leal et al., 2011). Experimentos previos desarrollados también en la lubina, demostraron que los eventos de estrés puntual también afectan drásticamente los niveles de ingesta, aunque los animales tienen la capacidad de compensar su efecto una vez el estresor ha finalizado (Rubio et al., 2010). Sin embargo, cuando estas condiciones de estrés se tornan crónicas, los animales no pueden superar los efectos negativos sobre la ingesta y el crecimiento (Leal et al., 2011). Como muestran los resultados, la adición de los saborizantes experimentales fue capaz

de contrarrestar los efectos del estrés sobre la ingesta, siendo el compuesto 424 más efectivo, aunque no encontramos diferencias significativas con el efecto provocado por el compuesto 436. El desconocimiento de la composición química de estos compuestos hace difícil encontrar los mecanismos de acción de ellos. En principio, los efectos podrían ser mediados a dos niveles diferentes bien mediante mitigación del estrés, o bien, mediante estimulación de los sistemas que regulan la ingesta. Los resultados obtenidos en fase 2 en la que los animales fueron alimentados con los piensos experimentales, sugieren que los piensos no estimulan diferencialmente la ingesta, por lo que debemos suponer que los efectos de ambos saborizantes están dirigidos hacia el eje del estrés. Si el efecto se medía efectivamente mediante la mitigación del estrés, estos deben incidir bien sobre el eje HPI, bien sobre el eje HSC o bien, sobre ambos. Desafortunadamente, el diseño experimental no contempló la evaluación de marcadores de estrés como podrían ser los niveles de cortisol plasmático (revisado por Wenderlar, 1997) o los niveles de monoaminas centrales (Puglisi-Allegra y Andolina, 2015; Höglund et al., 2019). La mitigación de los efectos del estrés mediada por la ingesta de piensos funcionales suplementados con probióticos se ha descrito previamente en peces (Davis et al., 2016a). La administración de probióticos puede reducir la ansiedad de los animales actuando a nivel serotoninérgico (Davis et al., 2016b; Valcarce et al., 2020) o incluso mitigar los efectos de contaminantes sobre la función hepática y gástrica (Hu et al., 2021). Otra posibilidad es que estos saborizantes que, en principio, deberían actuar a través de los receptores gustativos sean capaces de paliar los efectos del estrés sobre la función gastrointestinal. Nuestros estudios no publicados han demostrado que las diferentes isoformas de los receptores de la familia T1R se expresan en células enteroendocrinas. Si el estrés tiene un efecto sobre la secreción de estos tipos celulares

que incluyen células CCK, entre otras, es posible que los saborizantes puedan mitigar estos efectos negativos regulando la ingesta desde los sistemas periféricos. En resumen, nuestros estudios demuestran por primera vez que el uso de saborizantes puede mitigar los efectos del estrés sobre la ingesta. Este efecto puede ser de especial interés para el cultivo de peces / acuicultura.





# DISCUSIÓN GENERAL



La acuicultura recoge muchas de las expectativas de la alimentación de la creciente población mundial (Costello et al., 2020). Las mejoras actuales se han producido, básicamente, gracias a la investigación relacionada con la nutrición y la mejora de las conversiones alimenticias de las especies en cultivo (revisado por Naylor et al., 2021a). La I+D de las empresas de piensos para acuicultura se centra fundamentalmente en dos aspectos:

- i) Acoplar los excedentes de materias primas adecuadas para la producción de piensos de peces y/o crustáceos, con el fin de abaratar el coste de estos y mejorar la sostenibilidad de los procesos productivos.
- ii) El desarrollo de piensos funcionales que garanticen las necesidades nutricionales de las especies pero que, además, aporten alguna mejora sobre la fisiología del organismo. Paralelamente, una buena parte de la I+D de las empresas productoras, se centra en la prueba de estos alimentos, y en corroborar los supuestos beneficios ofertados por las empresas de piensos.

El aspecto sensorial de los piensos de cultivo es un área poco estudiada dentro del mundo de la acuicultura. La mejora de los aspectos sensoriales del alimento obtenida mediante la suplementación de los piensos, puede marcar diferencias en el consumo de estos y por extensión, en el crecimiento de diversas especies de peces (Dias et al., 1997; Barata et al., 2009; Trushenski et al., 2011; Barroso et al., 2013). Sin embargo, las mejoras no se restringen solamente al crecimiento, sino que pueden incidir además sobre otros parámetros importantes del cultivo como, por ejemplo, el desperdicio de alimento (revisado por Morais, 2016). Se comercializan estimulantes de la alimentación como “FinnStim”, basados principalmente en el uso de betaína e hidrolizados proteicos, que son capaces de mejorar

las tasas de ingesta y la conversión alimenticia, e incluso disminuir la mortalidad tras los procesos de esmoltificación en salmónidos (Clarke et al., 1994; Castro et al., 1998), peces planos (Fredete et al., 2000) o incluso en invertebrados (Peñaflorida y Virtanen, 1996).

El estudio de los nichos ecológicos y la posición en la cadena trófica de las especies en producción, puede ayudar considerablemente a la hora de predecir sustancias o moléculas implicadas en la regulación hedónica de la ingesta. De hecho, muchos estudios centrados en la búsqueda de estimulantes, utilizan extractos o hidrolizados de presas naturales potenciales de las especies de interés (Barroso et al., 2013). La mayor parte de las especies cultivadas en las sociedades occidentales, tanto Atlánticas como Mediterráneas, son de carácter carnívoro, por los que sus principales requerimientos nutricionales se basan en la proteína y parcialmente en el aporte de grasas en las dietas. Esto hace que la faceta sensorial umami sea de especial interés a la hora de formular estimulantes de la ingesta en los peces. Por motivos de confidencialidad empresarial nosotros no conocemos la composición de los compuestos/aditivos con los que trabajamos, pero en ambos casos (capítulo 1 y 4) se centran en la estimulación sensorial umami. En el primer capítulo de la tesis, basándonos en experimentos previos realizados con la dorada, que demostraban la adecuación de los sistemas de auto-demanda a los estudios de los niveles de ingesta (López-Olmeda et al., 2009) y a la selección nutricional en la dorada (Aranda et al., 2000; Montoya et al., 2011), decidimos estudiar el efecto de dos aditivos sensoriales umami (A y B) sobre la ingesta y la dinámica de crecimiento de las doradas. Ambos aditivos fueron capaces de modificar la fisiología de los animales, bien incrementando la tasa de crecimiento y mejorando la conversión alimenticia, sin modificar la tasa de ingesta (Dieta B), o por el contrario,

modificando la tasa de ingesta sin repercusiones en el crecimiento de los animales (Dieta A). Los resultados demuestran por primera vez, que la estimulación de la vertiente sensorial umami, puede modificar los niveles de ingesta y las tasas de crecimiento en la dorada, como se ha observado en otras especies (ver introducción capítulo 1 para referencias). Si bien los primeros estudios sobre el gusto de los peces fueron dirigidos hacia los sabores más clásicos (dulce, salado, ácido/agrio y amargo), la faceta más estudiada actualmente ha sido el sabor umami, y fundamentalmente, el efecto de los diferentes aminoácidos solos o en mezclas equilibradas. En algunas especies determinadas, mezclas de aminoácidos libres tienen el mismo poder estimulante o de palatabilidad, como el extracto completo de sus presas favoritas (revisado por Hara, 1994b; Kasumyan y Doving, 2003). De hecho, los receptores gustativos de peces, en su versión dimérica T1R1/T1R3 y T1R2n/T1R3, responden de forma muy sensible a los aminoácidos libres, al igual que estos estimulan de forma muy potente la transmisión nerviosa desde los nervios gustativos en estudios electrofisiológicos (Marui y Carpio, 1992). Sin embargo, no todos los aminoácidos son palatables, un amplio estudio desarrollado sobre 21 especies, mostró que solamente el 28% de los aminoácidos tuvo capacidad estimulatoria, y normalmente las especies mostraron un espectro de 0 a 13 aminoácidos estimulantes (Kasumyan, 1997), siendo este totalmente específico para cada una de las especies. En realidad, en lo que al espectro gustativo se refiere, la extrapolación de resultados entre especies, incluso del mismo género, es inválida debido a esta especificidad gustativa, lo que obliga ineludiblemente a la caracterización del espectro en cada especie. A la hora de formular estimulantes umami, debe tenerse en cuenta que no todos los aminoácidos tienen efectos neutros o estimulantes, sino que algunos pueden presentar efectos disuasorios. Entre aquellos estudiados por

Kasumyan (1997), doce especies mostraron reacciones adversas a diferentes amino ácidos y en algunas especies, el número de amino ácidos desencadenantes fue elevado oscilando en un rango de 7-11. Los disuasorios más comunes son la valina, arginina, fenilalanina, metionina, cisteína, lisina, histidina y prolina en su forma L-isomérica. Por el contrario, los estimulantes más comunes son la alanina, serina, glutamina, glicina y ácido glutámico. Sin embargo, otra vez, las formulaciones deben ser testadas específicamente para la especie problema. Estas formulaciones generalmente integran betaína o trimetilglicina, componente principal del estimulante comercial “Finnstim”, dada las propiedades sinérgicas de este compuesto con los aminoácidos o su propia acción independiente como agente estimulador. Algo similar ocurre con los nucleótidos y nucleósidos como la inosina (I) o la 5' monofosfato inosina (IMP), entre otros, que ejercen efectos estimulantes en diversas especies como el rodaballo, la seriola y la caballa (*Scomber scombrus*), o potencian el efecto de los propios amino ácidos (Hara, 1994b; Kasumyan y Doving, 2003; revisado por Morais, 2016).

Las preferencias gustativas no tienen por qué ser constantes, dado que la función gustativa puede cambiar en base a la alteración de los parámetros ambientales o al estado energético del organismo (Kasumyan, 2018). Las diferencias que hemos encontrado en la dorada son bastante exiguas, aunque significativas estadísticamente. Una explicación a esta “dificultad” para encontrar diferencias, puede deberse a la época del año en la que se realizaron los experimentos. Durante la fase estival, la dorada muestra su periodo más activo de ingesta y crecimiento, mostrando una voracidad por el alimento diferencial frente a otras especies. En realidad, no hemos encontrado experimentos que cuantifiquen esta voracidad, pero la información recabada en las diferentes empresas de cultivo siempre apunta en este sentido,

incluso en comparaciones con predadores pelágicos como la seriola (comunicación personal, Técnicos de cultivo de Avramar S.A.). Ciertamente, la condición metabólica/energética del organismo influye de manera patente en su comportamiento alimenticio, modificando también el espectro gustativo de las especies. El ayuno o la carencia energética puede provocar un cambio sustancial en las prioridades gustativas de los peces, haciendo que coman el alimento más accesible en detrimento del más atractivo (Nunn et al., 2008), y/o que aumenten la diversidad de los organismos consumidos/presas (Jobling y Miglavs, 1993). Experimentos en invertebrados, han demostrado el mecanismo molecular tras esta anhedonia gustativa, vía modulación de la expresión de receptores gustativos mediada por las neuronas CCK centrales (Guo et al., 2021). Nuestros resultados, junto con experimentos adicionales no recogidos en esta tesis doctoral, sugieren que la dorada muestra poca especificidad gustativa durante las fases de alimentación más activas, siendo difícil encontrar estimulantes que mejoren las tasas de ingesta y crecimiento.

Esto nos llevó a especular que esta capacidad de mejora se hiciese más patente, posiblemente, en situaciones desfavorables para el organismo, en los que su motivación por el alimento no fuese tan extrema o prioritaria. Por tanto, en el capítulo 2 estudiamos otra vez el efecto de dos aditivos (424 y 436) del espectro umami, con una formulación similar a los piensos A y B, pero diferente, sobre la estimulación de la ingesta en condiciones de estrés. Nuestros experimentos previos en la lubina habían mostrado que el estrés es un potente agente anorexigénico, estableciendo un protocolo basado en la exposición temporal al aire de los animales en conjunción con el estrés mecánico que conlleva la limpieza/escobado de los tanques. Inicialmente, los resultados muestran que el cambio de dieta desde una estándar comercial a

una dieta formulada por nosotros con una elevada sustitución vegetal, conlleva a una disminución de los niveles de ingesta. Nosotros no podemos atribuir este descenso a la sustitución vegetal, puesto que desconocemos la formulación próxima del pienso comercial, pero es cierto que esta puede producir un descenso en los niveles de ingesta (revisado por Gatlin et al., 2007). Sin embargo, la propia novedad de un pienso diferente también puede suponer una condición de estrés para el organismo que induzca este descenso en el nivel de ingesta. Los aditivos utilizados no fueron capaces de contrarrestar dicho efecto, puesto que durante esta fase experimental todos los animales comieron por igual. Como hipotetizamos, cuando el animal es sometido a un estrés severo de forma diaria los niveles de ingesta caen significativamente, y en este caso, ambos aditivos fueron capaces de contrarrestar totalmente (424) o parcialmente (436) la anorexia inducida por el estrés. Hasta nuestro conocimiento, no existen estudios específicos que relacionen el estrés con la sensibilidad gustativa en peces, sin embargo, estudios en mamíferos así lo describen. Por ejemplo, el estrés por inmovilización, suprime las respuestas a los sabores dulces y umami en rata, así como reduce la expresión lingual de la subunidad T1R3 (Okamoto et al., 2010) mediada por el receptor de glucocorticoides (Parker et al., 2014). En humanos, el estrés puede atenuar la respuesta al sabor dulce (Al'absi et al., 2012). En ambos casos, el estrés parece reducir la respuesta gustativa, pero nuestros datos en peces sugieren lo contrario, es decir, el estrés induciría mayor motivación por los sabores umami en la dorada. Nuestros peces además, estuvieron sometidos a cambios de temperatura puesto que, aunque el experimento se desarrolló en condiciones constantes en circuito cerrado de recircularización de agua, cuando los tanques fueron vaciados diariamente, hubo que dar entrada a agua externa a menor temperatura que la del sistema. Esto también infringió un



estrés térmico a los peces además del estrés mecánico y como consecuencia de su exposición al aire. Sugerentemente, la temperatura puede cambiar la potencia estimuladora de los amino ácidos en diferentes especies, algo que podía estar relacionado con el cambio de hábitos alimenticios durante las diferentes épocas del año, en función de la diversidad estacional de presas (Kasumyan, 1997).

Como hemos comentado anteriormente, y apuntan los datos presentados en el capítulo 2, la sustitución vegetal puede producir un descenso en los niveles de ingesta debido a la presencia de compuestos genéricamente llamados como anti-nutricionales. Entre estos, se encuentran las sustancias estrogénicas no esteroideas como las isoflavonas vegetales (revisado por Gatlin et al., 2007). Nuestros experimentos previos habían demostrado la presencia de componentes estrogénicos en un elevado porcentaje de los piensos comerciales (Quesada et al., 2012), así como el efecto negativo de los estrógenos y andrógenos no aromatizables sobre la ingesta de la lubina (Leal et al., 2011). Por tanto, en el capítulo 3 nos planteamos estudiar si estos efectos eran extensibles a otras especies de acuicultura mediterránea como la dorada. Los resultados sugieren que la dorada es mucho más sensible a la administración de estrógenos exógenos, como lo demuestra la elevada mortalidad obtenida implantando las mismas dosis que las utilizadas en la lubina (Leal et al., 2011). Como en esta especie, la administración de esteroides produjo un descenso de los niveles de ingesta diarios y acumulados, pero a diferencia de la lubina, los andrógenos no aromatizables tuvieron el mismo efecto. Estos resultados advierten seriamente sobre la inclusión de materia vegetal con elevado contenido de sustancias/moléculas con actividad esteroidea sobre la ingesta y el crecimiento de la dorada.

Finalmente, en el capítulo, 4 de la tesis doctoral decidimos profundizar en el uso de los sistemas de auto-demanda para el estudio del comportamiento alimenticio, investigando además su potencial funcionalidad en la selección de alimentos. El correcto funcionamiento de estos sistemas de selección sería de gran ayuda en la monitorización gustativa de los diferentes aditivos experimentales. El concepto apunta al establecimiento de paneles de peces, capaces de discernir la calidad organoléptica de los piensos en ensayos rápidos, que ayuden a una primera discriminación en las formulaciones. Nuestra idea fue establecer inicialmente un índice para evaluar el balance de activaciones entre los dos comederos, asumiendo que los peces no mostrarían preferencias cuando estos suministrasen el mismo alimento. Los resultados revelan que las preferencias indefinidas son, en realidad, habituales como ha sido descrito previamente en otras especies, incluida la dorada (ver referencias capítulo 4). Incluso podemos cambiar la preferencia por otro comedero, pero no balancear el número de demandas entre ellos. No obstante, esta característica parece depender del tamaño de los peces, puesto que el desbalance entre los comederos de los tanques no es patente en animales jóvenes con un tamaño 5 veces menor (250 vs 50g). Nuestra explicación atiende a la estructura comportamental de los grupos de peces, en función de la aparición más común de comportamientos agonísticos entre los animales de mayor talla. Estas diferencias comportamentales también podrían explicar el menor número de demandas cuando los peces disponen de menos opciones de activación (1 sensor vs 2 sensores), lo que hace más robusta nuestra conclusión. Estos resultados no significan que el sistema de selección sea inválido en la dorada, porque cuando analizamos las demandas conjuntamente, demostramos la existencia de condicionamientos de carácter aversivos por la quinina. Sin embargo, también detectamos mayor dificultad para

establecer condicionamientos sensoriales positivos, sugiriendo que los métodos de selección pueden ser idóneos en la detección de formulaciones disuasorias, pero quizás no tan eficientes en la búsqueda de estimulantes.

La proporcionalidad directa entre el número de sensores y demandas, abre una discrepancia con los experimentos realizados en el capítulo 1, 2 y 3. La pregunta evidente es si la metodología fue apropiada y la respuesta es lógicamente no, bien porque estamos limitando la ingesta de los animales, o bien, porque en realidad estamos recogiendo datos referentes a los requerimientos energético/nutricionales y/o organolépticos de el/los animales dominantes en la población o incluso, ambos supuestos. Evidentemente habría que profundizar experimentalmente en estudios de carácter comportamental, estableciendo el número de sensores correctos para inhibir las relaciones agonísticas en los individuos de mayor talla, o bien, habría que restringir los estudios a animales de menor talla con el fin de minimizar las interacciones agonísticas. Sin embargo, esta carencia experimental limita, pero no invalida los datos y/o conclusiones derivadas de los experimentos de los capítulos anteriores. Por ejemplo, las diferencias en las demandas de piensos con quinina se han detectado en experimentos de dual choice o en experimentos con un solo sensor, pero es cierto que, muy probablemente, la mejora del sistema mediante la inclusión de múltiples sensores mejore la resolución experimental de la infraestructura.



# CONCLUSIONES



- 1) La dorada ajusta su comportamiento alimenticio a los sistemas de auto-demanda, desarrollando un aprendizaje instrumental válido para el estudio del comportamiento alimenticio.
- 2) La dorada exhibe un ritmo circadiano de alimentación fundamentalmente diurno, y ninguna de las condiciones experimentales pudo inducir cambios en las fases de alimentación día/noche.
- 3) El aumento de sensores de activación en el sistema de auto-demanda provoca un incremento en el número de demandas debido, probablemente, a la dilución del comportamiento agonístico.
- 4) El tamaño/edad de los animales influye su comportamiento alimenticio debido, probablemente, a una carencia o disminución del comportamiento agonístico.
- 5) La dorada es capaz de discriminar sensorialmente los piensos y modificar de forma acorde su nivel de demandas/ingesta y/o crecimiento, en función de la adición de saborizantes compuestos por un núcleo umami.
- 6) La inclusión de saborizantes umami en las dietas, modifica el nivel de expresión de receptores gustativos de la familia T1R en la cavidad orofaríngea y en el tracto gastrointestinal.
- 7) Los saborizantes umami pueden mitigar los efectos anorexigénicos del estrés.
- 8) La dorada exhibe una mayor sensibilidad a los estrógenos que la encontrada en otras especies.
- 9) Ambos, estrógenos y andrógenos, limitan el número de demandas alimenticias, sugiriendo que los piensos vegetales con un elevado contenido en fitoestrógenos pueden coaccionar el crecimiento de la especie.





# BIBLIOGRAFÍA



- Alanärä A, Brännäs E. A test of the individual feeding activity and food size preference in rainbow trout using demand feeders. *Aquaculture International*. 1993. 1: 47–54.
- Alanärä A, Brännäs E. Dominance in demand-feeding behaviour in Arctic charr and rainbow trout: the effect of stocking density. *Journal of Fish Biology*. 1996. 48: 242-54.
- Al'absi M, Nakajuma M, Hooker S, Wittmers L, Cragin T. Exposure to acute stress is associated with attenuated sweet taste. *Psychophysiology*. 2012. 49: 96-103.
- Aluru N, Vijayan MM. Stress transcriptomics in fish: a role for genomic cortisol signaling. *General and Comparative Endocrinology*. 2009. 164: 142-150.
- Angotzi AR, Puchol S, Cerdá-Reverter JM, Morais S. Insights into the Function and Evolution of Taste 1 Receptor Gene Family in the Carnivore Fish Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). *International Journal of Molecular Science*. 2020. 21(20):7732.
- Aranda A, Sanchez-Vazquez FJ, Zamora S, Madrid JA. Self-design of fish diets by means of self-feeders: validation of procedures. *Journal of Physiology Biochemistry*. 2000. 56:155-166.
- Attia J, Millot S, Di-Poi C, Bégout ML, Noble C, Sánchez-Vázquez FJ, Terova G, Saroglia M, Damsgard B. Demand feeding and welfare in farmed fish. *Fish Physiology Biochemistry*. 2012. 38: 107-118.
- Barata E, Hubert F, Conceição L, Velez Z, Rema P, Hubbard P, Canario A. Prey odour enhances swimming activity and feed intake in the Senegalese sole. *Aquaculture*. 2009. 293: (1-2)100-107.
- Barroso FG, Rodiles A, Vizcaino AJ, Martínez TF, Alarc FJ. Evaluation of feed attractants in juvenile Senegalese Sole, *Solea senegalensis*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 2013. 44.
- Barton BA. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*. 2002. 42:517–525.

- Bernier NJ. The corticotrophin-releasing factor system as mediator of the appetite-suppressing effects of stress in fish. *General Comparative Endocrinology*. 2006. 146:45–55.
- Blanca MJ, Alarcón R, Arnau J, Bono R, Bendayan R. Non-normal data: Is ANOVA still a valid option? *Psicothema*. 2017. 29(4):552-557.
- Blaser RE, Vira DG. Experiments on learning in zebrafish (*Danio rerio*): a promising model of neurocognitive function. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2014. 42:224-31.
- Blázquez M, Piferrer F. Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2004. 219:83–94.
- Borg B. Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 1994. 109: 219-45.
- Box GEP, Jenkins GM, Reinsel GC, Ljung GM. *Time series analysis: Forecasting and control* (5th ed). Hoboken, NJ: Wiley. 2016.
- Brännäs E, Alanära A. Effect of reward level on individual variability in demand feeding activity and growth rate in Arctic charr and rainbow trout. *Journal of Fish Biology*. 1994. 45. 423-434.
- Brännäs E, Alanära A. Monitoring the feeding activity of individual fish with a demand feeding system. 1993. 42: 209-15.
- Canosa LF, Chang JP, Peter RE. Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *General and Comparative Endocrinology*. 2007. 151: 1-26.
- Castro H, Battaglia J, Virtanen E. Effects of FinnStim on growth and sea water adaptation of *Coho salmon*. *Aquaculture*. 1998. 168: 423-429.
- Cave NJ, Backus RC, Marks SL, Klasing KC. Oestradiol and genistein reduce food intake in male and female overweight cats after gonadectomy. *New Zealand Veterinary Journal*. 2007. 55:113–119.

- Cerda-Reverter JM, Zanuy S, Carillo M, Kah O. Development of enzyme immunoassays for 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and L-thyroxine: time-course studies on the effect of food deprivation on plasma thyroid hormones in two marine teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). *General and Comparative Endocrinology*. 1996. 103: 290-300.
- Cerdá-Reverter JM, Canosa LF, Peter RE. Regulation of hypothalamic melanin-concentrating hormone neurons by sex steroids in the goldfish: possible role in the modulation of luteinizing hormone secretion. *Neuroendocrinology*. 2006. 84:364-77.
- Clarke W, Virtanen E, Blackburn J, Higgs D. Effects of a dietary betaine/amino acid additive on growth and seawater adaptation in yearling chinook salmon. *Aquaculture*. 1994. 121: 137-45.
- Clotfelter ED, Rodriguez AC. Behavioral changes in fish exposed to phytoestrogens. *Environmental Pollution*.
- Cohen J, Cohen P, West SG, Aiken LS. *Applied multiple regression/correlation analysis for the behavioral sciences*. New York, NY: Routledge. 2003.
- Costello C, Cao L, Gelcich S, Cisneros-Mata MÁ, Free CM, Froehlich HE, Golden CD, et al. The future of food from the sea. *Nature*. 2020. 588: 95–100.
- Covès D, Beauchaud M, Attia J, Dutto G, Bouchut C, Bégout ML. Long-term monitoring of individual fish triggering activity on a self-feeding system: an example using European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*. 2006. 253:385-392.
- Cowey C-B, Pope JA, Adron JW, Blair A. Studies on the nutrition of marine flatfish. The effect of oral administration of diethylstilboestrol and cyproheptadine on the growth of *Pleuronectes platesa*. *Marine Biology*. 1973. 19:1–6.
- Davis KB, Ludwig GM. Hormoneal effects on sex differentiation and growth in sunshine bass *Morone chrysops* X *Morone saxatilis*. *Aquaculture*. 2004. 231:587–596.

- Davis DJ, Doerr HM, Grzelak AK, Busi SB, Jasarevic E, Ericsson AC, Bryda EC. *Lactobacillus plantarum* attenuates anxiety-related behavior and protects against stress-induced dysbiosis in adult zebrafish. *Scientific Reports*. 2016a. 6:33726.
- Davis DJ, Bryda EC, Gillespie CH, Ericsson AC. Microbial modulation of behavior and stress responses in zebrafish larvae. *Behavioural Brain Research*. 2016b. 11: 219-227.
- Dean EE, Woo NYS. Modulation of fish growth hormone levels by salinity temperature, pollutants and aquaculture related stress: a review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 2009. 19: 97-120.
- Del Pozo A, Sánchez-Férez JA, Sánchez-Vázquez JF. Circadian Rhythms of Self-feeding and Locomotor Activity in Zebrafish (*Danio Rerio*). *Chronobiology International*. 2011. 28: 39-47.
- Dias J, Gomes EF, Kaushik S. Improvement of feed intake through supplementation with an attractant mix in European seabass fed plant-protein rich diets. *Aquatic Living Resources*. 1997. 10: 385 - 9.
- Dominguez-Castanedo O. Agonistic interactions with asymmetric body size in two adult-age groups of the annual killifish *Millerichthys robustus* (Miller & Hubbs, 1974). *Journal of Fish Biology*. 2021. 99: 773-781.
- Drew MD, Borgenson TL, Thiessen DL. A review of processing of feed ingredients to enhance diet digestibility in finfish. *Review. Animal feed science and technology*. 2007. 138: 118-136.
- Eckel LA. Estradiol: a rhythmic, inhibitory, indirect control of meal size. *Review. Physiology and Behavior* .2004. 82; 35 – 41.
- Encarnaçao P. Functional feed additives in aquaculture feeds. *Aquafeed Formulation*. 2016.
- Figueiredo-Silva A, Rocha E, Dias J, Silva P, Rema P, Gomes E, Valente LMP. Partial replacement of fish oil by soybean oil on lipid distribution and liver histology in European sea bass

- (*Dicentrarchus labrax*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture Nutrition*. 2005.
- Fischer H. A history of the central limit theorem. New York, NY: Springer. 2011.
- Fortes-Silva R, Kitagawa A, Sánchez Vázquez FJ. Dietary self-selection in fish: a new approach to studying fish nutrition and feeding behavior. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 2016. 26: 39–51.
- Fortes-Silva R, Valle SVD, Lopéz-Olmeda JF. Daily rhythms of swimming activity, synchronization to different feeding times and effects on anesthesia practice in an Amazon fish species (*Colossoma macropomum*). *Review. Chronobiology international*. 2018. 35: 1713-1722.
- Fox J. Applied regression analysis and generalized linear models. London: Sage. 2015.
- Francis G, Makkar HPS, Becker K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*. 2001. 199:197–227.
- Fredette M, Batt J, Castell J. Feeding stimulant for juvenile Winter flounders. *North American Journal of Aquaculture*. 2000. 52.
- Geurden I, Cuvier A, Gondouin E, Olsen RE, Ruohonen K, Kaushik S, Boujard T. Rainbow trout can discriminate between feeds with different oil sources. *Physiology Behavior*. 2005. 85, 107–114.
- Gatlin DM, Barrows FT, Brown P, Dabrowski K, Gaylord TG, Hardy RW, Herman E, Hu G, Krogdahl A, Nelson R, Overturf K, Rust M, Sealey W, Skonberg D, Souza EJ, Stone D, Wilson R, Wurtele E. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research*. 2007.
- Goldan O, Popper D. Food competition in small groups of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *The Israeli Journal of Aquaculture*. 2003. 55(2): 94-106.

- González A, Piferrer F. Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology*. 2003. 132:223–230.
- Guo D, Zhang YJ, Zhang S, Li J, Guo C, Pan YF, Zhang N, Liu CX, Jia YL, Li CY, Ma JY, Nässel DR, Gao CF, Wu SF. Cholecystokinin-like peptide mediates satiety by inhibiting sugar attraction. *PLoS Genetics*. 2021. 16:1009724.
- Hara TJ. The diversity of chemical stimulation in fish olfaction and gustation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 1994a. 4(1):1-35.
- Hara TJ, Kitada Y, Evans RE. Distribution patterns of palatal taste buds and their responses to amino acids in salmonids. *Journal of Fish Biology*. 1994b. 45:453-465.
- Hendry DF. *Dynamic econometrics*. Oxford, UK: Oxford U.P. 1995.
- Henry M, Gasco L, Piccolo G, Fountoulaki E. Review on the use of insects in the diets of farmed fish: past and future. *Review. Animal Feed Science and Technology*. 2015. 203:1-22.
- Herrero MJ, Pascual M, Madrid JA, Sánchez-Vázquez FJ. Demand-feeding rhythms and feeding-entrainment of locomotor activity rhythms in tench (*Tinca tinca*). *Physiology & Behavior*. 2005. 84: 595-605.
- Höglund E, Moltesen M, Castanheira MF, Thörnqvist P, Silva P, Overli O, Martins C, Winberg S. Contrasting neurochemical and behavioral profiles reflects stress coping styles but not stress responsiveness in farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Physiology behavior*. 2019. 214: 112759.
- Huckfeldt RR, Kohfeld CW, Likens TW. *Dynamic modeling: An introduction*. London: Sage. 1982.
- Hu C, Liu M, Tang L, Sun B, Huang Z, Chen L. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* modulates the impacts of perfluorobutanesulfonate on oocyte developmental rhythm of zebrafish. *Science of the Total Environment*. 2021. 776:145975.



- Hua K, Cobcroft JM, Cole A, Condon K, Jerry DR, Mangott A, Praeger C, Vucko MJ, Zeng C, Zenger K, Strugnell JM. The future of aquatic protein: implications for protein sources in aquaculture diets. Cell Press. 2019
- Hung AJ, Stanbury MG, Shanabrough M, Horvath TL, García-Segura LM, Naftolin F. Estrogen, synaptic plasticity and hypothalamic reproductive aging. *Experimental Gerontology*. 2003. 38:53–59.
- Jobling M, Miglavs I. The size of lipid depots-a factor contributing to the control of food intake in Arctic charr, *Salvelinus alpinus*? *Journal of fish biology*. 1993.43: 487-849.
- Kamunde C, Sappal R, Melegy TM. Brown seaweed (AquaArom) supplementation increases food intake and improves growth, antioxidant status and resistance to temperature stress in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *PLoS One*. 2019. 14(7):e0219792.
- Kasumyan A. Gustatory reception and feeding behavior in fish. *Journal of Ichthyology*. 1997. 37: 72-86.
- Kasumyan A. Olfaction and gustation in Acipenseridae, with special references to the siberian sturgeon. In book: *The Siberian Sturgeon (Acipenser baerii, Brandt, 1869)* 2018. Volume 1 - Biology (pp.173-205)
- Kasumyan A. The taste system in fishes and the effects of environmental variables. *Journal of Fish Biology*. 2019. 95(1):155-178.
- Kasumyan A, Doving KB. Taste preferences in fish. Review. *Fish and Fisheries*. 2003. 4, 289-347.
- Khan A, Rayner GD. Robustness to non-normality of common tests for the many-sample location problem. *Journal of Applied Mathematics and Decision Sciences*. 2003. 7:187-206.
- Kim H-K, Nelson-Dooley C, Della-Fera MA, Yang J-Y, Zhang W, Duan J, Hartzell DL, Hamrick MW, Baile CA. Genistein decreases food intake, body weight, and fat pad weight and causes adipose tissue apoptosis in ovariectomized female mice. *Journal of Nutrition*. 2006. 136:409–414.

- Ko K, Malison JA, Reed JD. Effect of genistein on the growth and reproductive function of male and female yellow perch (*Perca flavescens*). Journal of the World Aquaculture Society. 1999. 30:73–79.
- Leal E, Sánchez E, Muriach B, Cerdá-Reverter JM. Sex steroid-induced inhibition of food intake in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Journal of Comparative Physiology B. 2009. 179:77-86.
- Leal E, Fernández-Durán B, Guillot R, Ríos D, Cerdá-Reverter JM. Stress-induced effects on feeding behaviour and growth performance of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a self-feeding approach. Journal of Comparative Physiology B. 2011. 181:1035-1044.
- Leal E, Fernández-Durán B, Agulleiro MJ, Conde-Siera M, Míguez JM, Cerdá-Reverter JM. Effects of dopaminergic system activation on feeding behavior and growth performance of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): A self-feeding approach. Hormones and Behavior. 2013. 64: 113-121.
- Li R, Fan W, Tian G, Zhu H, He L, Cai J, Huang Q, Cai Q, et al. The sequence and de novo assembly of the giant panda genome. Nature. 2010. 21: 463 (7279).
- Li X, Li W, Wang H, Cao J, Maehashi K, Huang L, Bachmanov AA, Reed DR, Legrand-Defretin V, Beauchamp GK, Brand JG. Pseudogenization of a sweet-receptor gene accounts for cats' indifference towards sugar. PLOS Genetics. 2005. 1(1): 27-35.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. Methods. 2001. 25: 402-408.
- Ljung GM, Box GEP. On a measure of lack of fit in time series models. Biometrika. 1978. 6: 431–441.
- Lone KP. The effect of feeding three anabolic steroids in different combinations on the growth, food conversion efficiency and protein and nucleic acid levels of liver, kidney, brain and muscle

- of mirror carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Physiology Biochemistry*. 1989. 6:149–156.
- López-Olmeda JF, Montoya A, Oliveira C, Sánchez-Vázquez FJ. Synchronization to light and restricted-feeding schedules of behavioral and humoral daily rhythms in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Chronobiology International*. 2009. 26: 1389-1408
- Mandiki SNM, Houbart M, Babial I, Vandeloise E, Gardeur JN, Kestemont P. Are sex steroids involved in the sexual growth dimorphism in Eurasian perch juveniles. *Physiology Behavior*. 2004. 80:603–609.
- Mandiki SNM, Babial I, Bopopi JM, Leprieur F, Kestemont P. Effects of sex steroids and their inhibitors on endocrine parameters and gender growth differences in Eurasian perch (*Perca Xuviatilis*) juveniles. *Steroids*. 2005. 70:85–94.
- Marui T, Caprio J. Teleost gustation. *Fish Chereception*. 1992. 171-98.
- Matsumoto T, Kobayashi M, Moriwaki T, Kawai S, Watabe S. Survey of estrogenic activity in fish feed by yeast estrogen-screen assay. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2004. 139: 147-52.
- Matty AJ, Cheema IR. The effect of some steroid hormones on the growth and protein metabolism of rainbow trout. *Aquaculture*. 1978. 14:163–178.
- McBridge JR, Higgs DA, Fagerlund UHM, Buckley JT. Thyroid and steroid hormones: potential for control of growth and smoltification of salmonids. *Aquaculture*. 1982. 28:201–209.
- Millot S, Begout M-L. Individual fish rhythm directs group feeding: A case study with sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*) under self-demand feeding conditions. *Aquatic Living Resources*. 2009. 22 (3).
- Millot S, Begout ML, Jeannine P, Gilles B, Julie F, Philippe P, Roue M, Severe A. Feed demand behavior in sea bass juveniles: Effects on

- individual specific growth rate variation and health (inter-individual and inter-group variation). *Aquaculture*.2008. 274 (1).
- Millot S, Nilsson J, Fosseidengen JE, Begout ML, Kristiansen T. Evaluation of self-feeders as a tool to study diet preferences in groups of Atlantic cod. *Aquatic Living Resources*. 2012.25, 251-258.
- Miyahara M, Ishibashi H, Inudo M, Nishijima H, Iguchi T, Guillette LJ, Arizono K. Estrogenic activity of a diet to estrogen receptors -alpha and -beta in an experimental animal. *Journal of Health Science*. 2003. 49:481–491.
- Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*.1999. 9: 211-268.
- Mommsen TP, Moon TW. Hormonal Regulation of Muscle Growth. 2001. 251–308.
- Montoya A, Alves Martins D, Yufera M, Sánchez-Vázquez FJ. Self-selection of diets with different oil oxidation levels in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*. 2011. 314, 282–284.
- Montoya A, López-Olmeda JF, Lopez-Calpel A, Sánchez-Vázquez FJ, Pérez-Ruzafa A. Impact of a telemetry-transmitter implant on daily behavioral rhythms and physiological stress indicators in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Marine Environmental Research*. 2012. 79: 48-54.
- Montoya-Camacho N, Marquez-Ríos E, Castillo-Yáñez FJ, Cárdenas JL, López-Elías JA, Ruíz-Cruz S, Jiménez-Ruíz EI, Rivas-Vega ME, Ocaño-Higuera VM. Advances in the use of alternative protein sources for tilapia feeding. *Reviews in Aquaculture*. 2019. 11:515-26.
- Morais S. The physiology of taste in fish: potential implications for feeding stimulation and gut chemical sensing. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*. 2016. 25: 2,133-149.

- Naderi F, Míguez JM, Soengas JL, López-Patiño MA. SIRT1 mediates the effect of stress on hypothalamic clock genes and food intake regulators in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2019. Part A 235:102–111.
- Napolitano A. *Cyclostationary Processes and Time Series*. London: Elsevier. 2019.
- Naylor RL, Goldberg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MC, Clay J, Folke C, Lubchenco J, Mooney H, Troell M. Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*. 2000. 405. 1017-24.
- Naylor RL, Hardy RW, Buschmann AH, Bush SR, Cao L, Klinger DH, Little DC, Lubchenco J, Shumway SE, Troell M. A 20-years retrospective review of global aquaculture. *Review. Nature*. 2021a. 591: 551-563.
- Naylor RL, Kishore A, Sumaila UR, Issifu I, Hunter BP, Belton B, Bush SR, Cao L, Gelcich S, Gephart JA, Golden CD, Jonell M, Koehn JZ, Little DC, Thilsted SH, Tigchelaar M, Crona B. Review. Blue food demand across geographic and temporal scales. *Nature Communications*. 2021b. 15. 12(1): 5413.
- Ng Y, Hanson S, Malison JA, Wentworth B, Barry TP. Genistein and other isoflavones found in soybeans inhibit estrogen metabolism in salmonid fish. *Aquaculture*. 2006. 254:658–665.
- Nilsson J, Torgersen T. Exploration and learning of demand feeding in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*. 2010. 306, 384– 387.
- Nunn AD, Harvey JP, Cowx IG. Winter diet and condition of two 0+ year cyprinid fish species in the lower River Trent, England. *Journal of fish biology*. 2008. 72: 1529-1533.
- Oike H, Nagai T, Furuyama A, Okada S, Aihara Y, Ishimaru Y, Marui T, Matsumoto I, Misaka T, Abe K. Characterization of ligands for fish taste receptors. *Journal of Neuroscience*. 2007. 23; 27(21):5584-92.
- Okamoto A, Miyoshi M, Imoto T, Ryoike K, Watanabe T. Chronic restraint stress in rats suppresses sweet and umami taste responses

- and lingual expression of T1R3 mRNA. *Neuroscience letters*. 2010. 486: 211-214.
- Oliveira CC, Aparício R, Blanco-Vives B, Chereguini O, Martín I, Sánchez-Vázquez JF. Endocrine (plasma cortisol and glucose) and behavioral (locomotor and self-feeding activity) circadian rhythms in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) exposed to light/dark cycles or constant light. *Fish Physiology Biochemistry*. 2013. 39(3):479-87.
- Papatryphon E, Soares Jr JH. Optimizing the levels of feeding stimulants for use in high-fish meal and plant feedstuff-based diets for striped bass, *Morone saxatilis*. *Aquaculture*. 2001. 202:279-288.
- Paredes JF, Vera LM, Martinez-Lopez FJ, Navarro I, Sánchez Vázquez FJ. Circadian rhythms of gene expression of lipid metabolism in Gilthead Sea bream liver: synchronisation to light and feeding time. *Chronobiology International*. 2013. 31: 613-26.
- Parker M, Feng D, Chamuris B, Margolskee RF. Expression and nuclear translocation of glucocorticoid receptors in type 2 taste receptor cells. *Neuroscience Letters*. 2014. 571: 72-77.
- Paspatis M, Maragoudaki D, Kentouri M. Self-feeding activity patterns in gilthead sea bream (*Sparus aurata*), red porgy (*Pagrus pagrus*) and their reciprocal hybrids. *Aquaculture*. 2000. 190: 389-401.
- Pearson ES. The Analysis of Variance in Cases of Non-Normal Variation. *Biometrika*. 1931. 23:114-133.
- Pelissero C, Sumpter JP. Steroid and steroid-like substances in fish diets. *Aquaculture*. 1992. 107:283–301.
- Pelissero C, Lenczowski MJP, Chinzi D, DavailCuisset B, Sumpter JP, Fostier A. Effects of Xavonoids on aromatase activity, an in vitro study. *Journal of Steroid Biochemistry*. 1996. 57:215–223.
- Peñaflorida V, Vitanen E. Growth, survival and feed conversion of juvenile shrimp (*Penaeus monodon*) fed a betaine/amino acid additive. *Seafdec/aqdindtitutinal repository*. 1996.

- Picazo O, Azcoitia I, García-Segura LM. Neuroprotective and neurotoxic effects of estrogen. *Brain Research*. 2003. 990:20–27.
- Picone B, Hesse U, Panji S, Van Heusden P, Jonas M, Christoffels A. Taste and odorant receptors of the coelacanth—a gene repertoire in transition. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. 2014. 322(6): 403–414.
- Prieto L, Herranz I. *Bioestadística sin dificultades matemáticas*. Madrid: Díaz de Santos. 2010.
- Puglisi-Allegra S, Andolina D. Serotonin and stress coping. *Behavioural Brain Research*. 2015. 277: 58-67.
- Quesada-García A, Valdehita A, Fernández-Cruz ML, Leal E, Sánchez E, Martín-Belinchón M, Cerdá-Reverter JM, Navas JM. Assessment of estrogenic and thyrogenic activities in fish feeds. *Aquaculture*. 2012. 338: 172-180.
- Rigos G, Karagouni E, Kgriazis I, Athanasiou E, Grigorakis K, Kotou E, Katharios P. *In vitro* and *in vivo* evaluation of quinine in gilthead seabream, *Sparus aurata* naturally infected with the ciliate *Cryptocaryon irritans*. *Aquaculture*. 2013. 416-417: 185-191.
- Roques S, Deborde C, Richard N, Skiba-Cassy S, Moing A, Fauconneau B. Metabolomics and fish nutrition: a review in the context of sustainable feed development. *Reviews in Aquaculture*. 2020. 12:261-82.
- Rotllant J, Balm PH, Perez-Sanchez J, Wendelaar-Bonga SE, Tort L. Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. *General and Comparative Endocrinology*. 2001. 121: 333-342.
- Roy J, Mercier Y, Tonnet L, Burel C, Lanuque A, Surget A, Larroquet L, Corraze G, Terrier F, Panserat S, Skiba S. Rainbow trout prefer diets rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids DHA and EPA. *Physiology behavior*. 2020. 213: 112692.

- Rubio VC, Sánchez E, Cerdá-Reverter JM. Compensatory feeding in the sea bass after fasting and physical stress. *Aquaculture*. 2010. 298: 332-337.
- Saera-Vila A, Calduch-Giner JA, Prunet P, Perez-Sanchez J. Dynamics of liver GH/IGF axis and selected stress markers in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) exposed to acute confinement: differential stress response of growth hormone receptors. *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 2009. 154: 197-203.
- Sánchez-Vázquez FJ, Zamora S, Madrid JA. Light-dark and food restriction cycles in sea bass: Effect of conflicting zeitgebers on demand-feeding rhythms. *Physiology & Behavior*. 1995. 58: 705-14.
- Sánchez-Vázquez FJ, Yamamoto T, Akiyama T, Madrid JA, Tabata M. Macronutrient self-selection through demand feeders in rainbow trout. *Physiology Behavior*. 1998. 66, 45–51.
- Schrek CB, Tort L. The concept of stress in fish. *Fish Physiology*. 2016. 35.
- Simone DA. The effects of synthetic steroid 17-alpha-methyltestosterone on the growth and organ morphology of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*. 1990. 84:81–93.
- Spanos A. *Statistical foundations of econometric modelling*. Cambridge: Cambridge U. P. 1986.
- Stejskal V, Matoušek J, Prokešová M, Podhorec P, Křišťan J, Polícar T, Gebauer T. Fin damage and growth parameters relative to stocking density and feeding method in intensively cultured European perch (*Perca fluviatilis* L.). *Journal of Fish Diseases*. 2020. 43: 253-62.
- Szkudelska K, Nogowski L. Genistein - a dietary compound inducing hormonal and metabolic changes. *Journal of Steroid Biochemistry*. 2007. 105:37–45.



- Toguyeni A, Fauconneau B, Boujard T, Fostier A, Kuhn ER, Mol KA, Baroiller J-F. Feeding behaviour and food utilisation in tilapia, *Oreochromis niloticus*: effect of sex ratio and relationship with the endocrine status. *Physiology Behavior*. 1997. 62:273–279.
- Trushenski J, Schwarz M, Lewis H, Laporte J, Delbos B, Takeuchi R, Sampaio LA. Effect of replacing dietary fish oil with soybean oil on production performance and fillet lipid and fatty acid composition of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture Nutrition*. 2011. 17: 437-47.
- Tzchori I, Degani G, Elisha R, Eliyahu R, Hurvitz A, Vaya J, Moav B. The influence of phytoestrogen and estradiol-17b on growth and sex determination in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture Research*. 2004. 35:1213–1219.
- Unniappan S, Lin X, Cervini L, Rivier J, Kaiya H, Kangawa K, Peter RE. Goldfish ghrelin: molecular characterization of the complementary deoxyribonucleic acid, partial gene structure and evidence for its stimulatory role in food intake. *Endocrinology*. 2002. 143(10):4143-6.
- Upton KR, Riley LG. Acute stress inhibits food intake and alters ghrelin signaling in the brain of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Domestic Animal Endocrinology*. 2013. 44: 157–164.
- Velázquez M, Zamora S, Martínez FJ. Influence of environmental conditions on demand-feeding behaviour of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Applied Ichthyology*. 2004. 20: 536-541.
- Velázquez M, Zamora S, Martínez FJ. Effect of different feeding strategies on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) demand-feeding behaviour and nutritional utilization of the diet. *Aquaculture Nutrition*. 2006. 12:403-9.
- Valcarce DG, Martinez-Vazquez JM, Riesco MF, Robles V. Probiotics reduce anxiety-related behavior in zebrafish. *Heliyon*. 2020. 6:e03973.

- Vandaele W. Applied time-series and Box-Jenkins methods. New York: Academic Press. 1983.
- Vera LM, Negrini P, Zagatti C, Frigato E, Sánchez-Vázquez FJ, Bertolucci C. Light and feeding entrainment of the molecular circadian clock in a marine teleost (*Sparus aurata*). *Chronobiology International*. 2013. 30(5):649-61.
- Vik P. Regression, ANOVA, and the General Linear Model: A statistics primer. London: Sage. 2010.
- Volkoff H, Canosa LF, Unniappan S, Cerdá-Reverter JM, Bernier NJ, Kelly SP, Peter RE. Neuropeptides and the control of food intake in fish. Review. *General and Comparative Endocrinology*. 2005. 142:3–19.
- Weatherley AH, Gill HS. *The Biology of Fish Growth*. 1987.
- Wenderlar Bonga S. The stress response in fish. *Physiological Reviews*. 1997. 77: 591-625.
- Wilson PN, Brigstocke TDA. *Improved Feeding of Cattle and Sheep*. 1987. Pp. 256.
- Woo NYS, Chung ASB, Ng TB. Influence of oral administration of estradiol-17b and testosterone on growth, digestion, food conversion and metabolism in the underlying reed sea bream, *Chrysophrys major*. *Fish Physiology Biochemistry*. 1993. 10:377–387.
- Yamada Y, Chensom S, Yonemoto H, Nakayama H, Zang L, Nishimura N, Mishima T, Shimada Y. Water extract of Yamato Tachibana (*Citrus tachibana*) induces food intake in adult and larval zebrafish. *Journal of Medicinal Food*. 2020. 23(1):65-71.
- Yáñez J, Souto Y, Piñeiro L, Folgueira M, Anadón R. Gustatory and general visceral centers and their connections in the brain of adult zebrafish: a carbocyanine dye tract-tracing study. *The Journal of Comparative Neurology*. 2017. 525: 333-362.

- Yasuoka A, Abe K. Gustation in fish: Search for prototype of taste perception. *Results and Problems in Cell Differentiation*. 2009. 47: 239–255.
- Yoshida R, Niki M, Jyotaki M, Sanematsu K, Shigemura N, Ninomiy Y. Modulation of sweet responses of taste receptor cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2013.24: 226-231.
- Yuferá M, Romero MJ, Pujante IM, Astola A, Mancera JM, Sánchez-Vázquez FJ, Moyano FJ, Martínez-Rodríguez G. Effect of feeding frequency on the daily rhythms of acidic digestion in a teleost fish (*gilthead seabream*). *Chronobiology International*. 2014. 31(9):1024-33.



# ANEXOS



# ABREVIATURAS

ANDRO	Androstenediona
ARN	Ácido ribonucleico
Asp	L-ácido aspártico
CCK	Colecistoquinina
CEE	El Consejo de las Comunidades Europeas
Cm	Centímetros
CNTL	Control
Col.	Colaboradores
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Ct	Umbral de ciclo
Cys	Cisteína
Desv. Error	Desviación del error
DHA	Ácido docosahexaenoico
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
E	Estradiol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EF2	Factor de elongación 2

ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ETC	Etcétera
F	Parámetro F de Fisher
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FAP	Función autocorrelación parcial
FAS	Función autocorrelación simple
FCR	Factor de conversión de alimento
Fig.	Figura
G	Guanidinio
G	Gramo
GH	Hormona crecimiento pituitaria
GI	Grados de libertad
GLM	Modelo lineal general
Gln	L-glutamina
Glu	L-glutámico
HPA	Eje hipotalámico-pituitaria-adrenal
HPI	Eje hipotalámico-pituitaria-interrenal
HSC	Eje hipotalámico-simpático-cromafin



IATS	Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal
IGF	Factor de crecimiento hepático
Kg	Kilogramo
L-Ala	L-alanina
L-Hpr	Hidroxi-L-prolina
L-Pro	L-prolina
Lys	Lisina
MCP	Fosfato monocálcico
Met	Metionina
Min	Minerales
ml	Mililitro
Mm	Milímetro
NaCl	Cloruro de Sodio
NGS	Núcleo gustativo secundario
NGT	Núcleo gustativo terciario
NTS	Núcleo tracto solitario
OGM	Organismo genéticamente modificado
P	Fósforo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

QPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
R	Coefficiente de correlación múltiple de Pearson
SCN	Sistema nervioso central
SEM	Error estándar de la media
SGR	Tasa de crecimiento específico
Sig.	Significación
TR	Taste receptor (receptor del gusto)
T1R	Taste 1 receptor
T2R	Taste 2 receptor
T1R1	Taste 1 receptor 1
T1R2	Taste 1 receptor 2
T1R3	Taste 1 receptor 3
UE	Unión Europea
VD	Variable dependiente
VFI	Consumo voluntario
VI	Variable independiente
Vit	Vitaminas
VLo	Lóbulo vagal
Vol	Volumen

VS	Versus
S.A.	Sociedad Anónima
mm <sup>2</sup>	Milímetro cuadrado
°C	Grados centígrados
DM	Dry matter (Materia seca)
M	Molar
Int.	Intestino
μl	microlitro
F	forward
R	reverse
UI	Unidad Internacional
MJ	Megajulio

# LISTADO DE ESPECIES

Anguila (*Anguilla anguilla*)

Bacalao (*Gadus morhua*)

Besugo (*Pagellus bogaraveo*)

Caballa (*Scomber scombrus*)

Carpín dorado (*Carassius auratus*)

Cobia (*Rachycentron canadum*)

Corvina atlántica (*Argyrosomus regius*)

Dorada (*Sparus aurata*)

Espinoso (*Gasterosteus aculeatus*)

Fugu (*Lagocephalus sceleratus*)

Lenguado senegalés (*Solea senegalensis*)

Lubina americana (*Morone saxatilis*)

Lubina europea (*Dicentrarchus labrax*)

Medaka (*Oryzias latipes*)

Pargo japonés (*Pagrus major*)

Perca amarilla (*Perca flavescens*)

Perca europea (*Perca fluviatilis*)

Pez almirante mexicano (*Millerichthys robustus*)

Pez cebra (*Danio rerio*)  
Pez gato (*Ictalurus natalis*)  
Rodaballo (*Scophthalmus maximus*)  
Rutilo marino (*Rutilus rutilus*)  
Salmón atlántico (*Salmo salar*)  
Seriola (*Seriola dumerili*)  
Tenca (*Tinca tinca*)  
Tilapia (*Oreochromis niloticus*)  
Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)  
Trucha marrón (*Salmo trutta*)

