

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, CULTIVO Y
PATOLOGÍA DE ESPECIES MARINAS

ESTRATEGIAS DE ALIMENTACIÓN Y CULTIVO DE LA
DORADA (*Sparus aurata*). REGULACIÓN ENDOCRINA Y
ESTDO INMUNOPATOLÓGICO

MÓNICA MINGARRO MARTÍ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2004

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 13 de Maig de 2004 davant un tribunal format per:

- D^a. Rosa De Frutos Illán
- D^a. Esperanza Garay Aubán
- D. Manuel Jesús Martínez Valdivia
- D^a. Joaquim Gutiérrez Fruitos
- D. Rafael Martínez Pardo

Va ser dirigida per:
D. Jaume Pérez Sánchez

©Copyright: Servei de Publicacions
Mónica Mingarro Martí

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5466-4

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

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal



**ESTRATEGIAS DE ALIMENTACIÓN Y
CULTIVO EN LA DORADA (*Sparus aurata*).
REGULACIÓN ENDOCRINA Y ESTADO
INMUNOPATOLÓGICO**

Memoria presentada por Mónica Mingarro Martí para optar al
grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Valencia, Enero 2004

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**ESTRATEGIAS DE ALIMENTACIÓN Y
CULTIVO EN LA DORADA (*Sparus aurata*).
REGULACIÓN ENDOCRINA Y ESTADO
INMUNOPATOLÓGICO**

Memoria presentada por Mónica Mingarro Martí para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Fdo.: Mónica Mingarro Martí

Valencia, Enero 2004

LA PRESENTE TESIS DOCTORAL HA SIDO DIRIGIDA POR EL DOCTOR JAUME PÉREZ SÁNCHEZ, CIENTÍFICO TITULAR DEL INSTITUTO DE ACUICULTURA DE TORRE DE LA SAL (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS), Y CUMPLE CON TODOS LOS REQUISITOS EXIGIDOS POR LA LEGISLACIÓN VIGENTE.

Fdo.: Jaume Pérez Sánchez

A mis padres
A Nacho

Agradecimientos

Quisiera agradecer a todas aquellas personas que de una u otra forma me han ayudado en el desarrollo de esta tesis doctoral. Gracias a todos, pero en especial a:

La Diputación Provincial de Castellón, por darme la oportunidad de realizar la tesis doctoral a través de una de sus becas predoctorales.

Jaume Pérez Sánchez, mi director de tesis, al cual debo la oportunidad de realizar mi tesis en el Instituto de Acuicultura de Torre la Sal. Gracias a él soy consciente del esfuerzo que los investigadores han de realizar para llevar a cabo sus proyectos.

Ariadna Sitjá-Bobadilla, así como a los miembros del grupo de Patología del IATS y del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia que han participado en la realización de esta tesis.

Josep Àlvar Calduch Giner, por su trabajo incalculable en el último capítulo de la tesis.

Los compañeros del grupo: Silvia, Pedro, M^a Carmen y Alfonso, que me acompañaron en los días de trabajo ofreciéndome su ayuda y amistad. También a aquellos compañeros que terminaron su estancia en el IATS y con los cuales compartí mis primeros días: Rubén y Amparo. Gracias a todos por estar ahí.

Los miembros de los Servicios de Animalario y Mantenimiento, por su ayuda en los muestreos y en reparar aquellos aparatos que justo daban errores en el momento menos oportuno. También a todas aquellas personas del Instituto que con su amistad y apoyo he podido contar todos estos días.

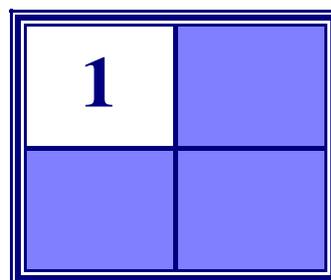
Los amigos y familiares que no entienden muy bien el “trabajo” de una tesis pero que me han animado a que esto terminara. Especialmente a mis padres, por darme la oportunidad de estudiar lo que quería y enseñarme que en esta vida la educación es el legado más precioso.

Por último, como no, a Nacho. Todo te lo debo a ti.

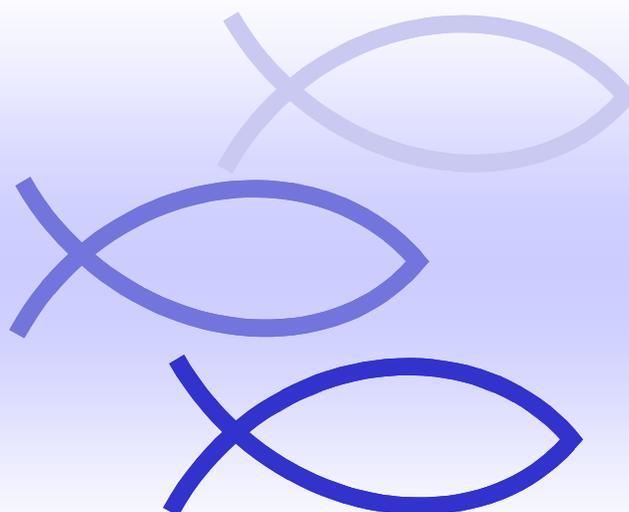
1. PRÓLOGO.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	7
2.1. Crecimiento somático.....	9
2.2. Crecimiento y factores abióticos	
2.2.1. Temperatura.....	14
2.2.2. Fotoperiodo.....	17
2.3. Eficiencia energética. Adiposidad y estado inmunológico.....	19
2.4. Control y regulación de la adiposidad	
2.4.1. Localización de los depósitos grasos.....	24
2.4.2. Divergencia y presión evolutiva.....	27
2.4.3. Modelo lipostático: crecimiento compensatorio.....	30
2.4.4. Señales periféricas de adiposidad: leptina.....	32
2.5. Señales eferentes del sistema nervioso central: Familia GH/PRL/SL	
2.5.1. Origen de la familia.....	36
2.5.2. Estructura proteica. Isoformas.....	38
2.5.3. Estructura genómica.....	41
2.5.4. Aspectos funcionales.....	43
2.5.4.1. Características de la familia receptores citoquina clase I.....	44
2.5.4.2. Organización genómica de los receptores de GH y PRL en vertebrados superiores. Proteínas de transporte y formas truncadas.....	46
2.5.4.3. Caracterización molecular de los receptores de GH y PRL en peces.....	53
2.5.4.4. Eje somatotrópico GH-IGF-I.....	56
2.5.4.4.1. Estructura y evolución de IGFs.....	59
2.5.4.4.2. Receptores y proteínas de transporte de IGFs.....	63
3. ESTACIONALIDAD DEL CRECIMIENTO EN LA DORADA: INTERACCIÓN ENTRE SOMATOLACTINA Y EJE SOMATOTRÓPICO.....	65
3.1. Introducción.....	68
3.2. Material y métodos	
3.2.1. Animales.....	70
3.2.2. Diseño experimental.....	71
3.2.3. Análisis de hormonas y metabolitos.....	72
3.2.4. Análisis estadístico.....	73
3.2.5. Apéndices	
3.2.5.1. Fundamento de la determinación de triglicéridos en plasma.....	74
3.2.5.2. Fundamento de la determinación de cortisol en plasma.....	75

3.2.5.3. Radioinmunoensayo de GH, SL e IGF-I.....	76
3.2.5.4. Radioyodación (GH, SL e IGF-I).....	78
3.2.5.5. Expresión y purificación de GH y SL.....	79
3.3. Resultados.....	81
3.4. Discusión.....	92
4. INTERACCIÓN ENTRE EL INICIO DE ENGORDE Y EL RÉGIMEN DE ALIMENTACIÓN EN LA DORADA.....	97
4.1. Introducción.....	99
4.2. Material y métodos	
4.2.1. Animales y condiciones de cultivo.....	101
4.2.2. Diseño experimental.....	102
4.2.3. Parámetros hormonales y de composición corporal.....	104
4.2.4. Análisis estadístico.....	104
4.2.5. Apéndices	
4.2.5.1. Fundamento de la determinación de proteínas por el método de Kjeldahl.....	105
4.2.5.2. Protocolo básico de la determinación de lípidos totales por el método de Folch.....	108
4.3. Resultados.....	109
4.4. Discusión.....	118
5. ESTADO INMUNOPATOLÓGICO DE LA DORADA BAJO DISTINTOS RÉGIMENES DE ALIMENTACIÓN.....	123
5.1. Introducción.....	126
5.2. Material y métodos	
5.2.1. Animales y diseño experimental.....	128
5.2.2. Muestras.....	130
5.2.3. Análisis histopatológico.....	132
5.2.4. Análisis inmunológico.....	134
5.2.5. Análisis estadístico.....	135
5.3. Resultados	
5.3.1. Análisis parasitológico.....	136
5.3.2. Mortalidades y análisis bacteriano.....	138
5.3.3. Análisis histopatológico.....	139
5.3.4. Análisis inmunológico.....	143
5.4. Discusión.....	145
6. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL RECEPTOR DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO DE DORADA.....	151
6.1. Introducción.....	154
6.2. Material y métodos	
6.2.1. Extracción de ARN.....	156
6.2.2. Clonación y secuenciación.....	157
6.2.3. Northern blot.....	160

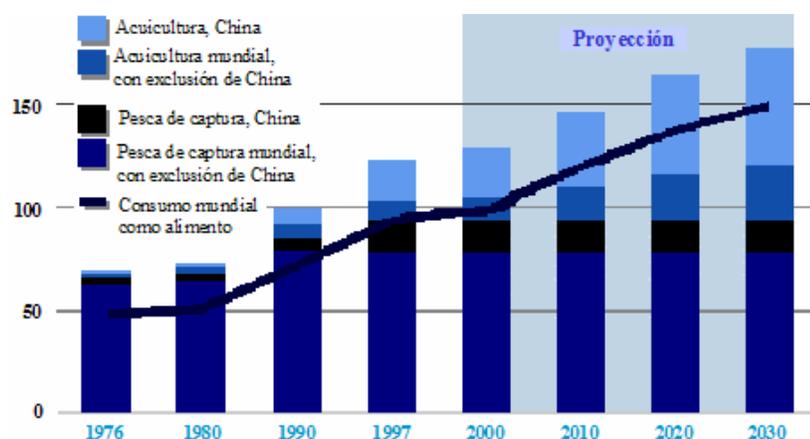
6.2.4. <i>Screening</i> del procesamiento alternativo mediante RT-PCR...	161
6.2.5. <i>Cross-linking</i>	162
6.2.6. Expresión tisular (PCR- en tiempo real-).....	163
6.2.7. Regulación estacional de la expresión hepática de RGH e IGF-I (primavera vs verano).....	165
6.2.8. Análisis estadístico.....	165
6.2.9. Apéndices	
6.2.9.1. Esquema básico del 5' y 3'RACE.....	166
6.2.9.2. Esquema básico del Northern blot.....	167
6.2.9.3. Esquema básico de PCR-en tiempo real (método SYBR Green I).....	168
6.2.9.4. Modelo de cuantificación por PCR- en tiempo real-.....	169
6.3. Resultados y discusión	
6.3.1. <i>Screening</i> de RGHs: organización genómica.....	171
6.3.2. <i>Cross-linking</i> : glicosilación.....	186
6.3.3. Expresión tisular y regulación estacional.....	187
7. CONCLUSIONES. Productos-Resultados transferibles.....	191
8.- BIBLIOGRAFÍA.....	197



Prólogo



La acuicultura es el sector de producción de alimentos que ha experimentado un mayor crecimiento. Desde 1984 la producción aumenta a una tasa media anual del 10%, frente al 3% de la carne de bovino y el 1,6% de la pesca; por lo que la acuicultura representa actualmente más de la cuarta parte de la producción pesquera. De modo que, tal y como prevé la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2000), la acuicultura es el único medio para mantener la proporción de pescado en la dieta, compensando el aumento progresivo de la población y los cambios alimenticios en la dieta de países desarrollados y en vías de desarrollo. De hecho, se espera que para el 2030 más de la mitad del pescado consumido sea producido por la acuicultura.



Producción y consumo mundial de pescado en el periodo 1976-2030 (FAO, 2002).

En la Unión Europea (UE) los principales productos de la acuicultura son la trucha, el salmón, la lubina y la dorada, junto a la más que notable producción de moluscos (mejillones, ostras y almejas). El conjunto de esta producción aumentó de 642.000 toneladas en 1980 a 944.000 toneladas en 1990, y alcanzó 1.315.000 toneladas en el año 2000. Por consiguiente, aunque la producción de la acuicultura europea representa sólo el 3% de la mundial, la UE es líder mundial en algunas especies como la trucha, la lubina, la dorada, el rodaballo y el mejillón (Comisión de las Comunidades Europeas, 2002).

España es un país con gran tradición en el consumo de productos pesqueros y es uno de los primeros consumidores a nivel mundial. Su demanda no se ve satisfecha por la oferta nacional, por lo que ha de acudir a los mercados exteriores. Ante esta situación, y con una producción extractiva sin capacidad de aumento notable, la acuicultura representa la única vía capaz de aumentar nuestro grado de abastecimiento. Además, España cuenta con unas condiciones geográficas que ofrecen un amplio abanico de posibilidades tanto para la acuicultura marina como para la continental (González-Serrano y cols., 1999). Sin embargo, el incremento progresivo de la oferta ha producido un descenso en el precio de estos productos, disminuyendo el margen de beneficio empresarial (Vergara-Martín, 2000). La consecuencia es un mercado cada vez más competitivo, por lo que se requiere una reducción de los costes de producción, una mayor calidad del producto final y el desarrollo de tecnologías que permitan minimizar el impacto medioambiental de las explotaciones en cultivo.

Una de las materias pendientes en la producción de muchas especies acuícolas es la adecuación de las pautas de alimentación al potencial de crecimiento y época del año en que se desarrolla el cultivo (engorde). Para lograr este objetivo es fundamental conocer los mecanismos endocrinos de regulación del crecimiento e ingesta, así como el efecto que estas pautas de alimentación puedan tener sobre el estado inmunopatológico y la calidad del producto que llega a los consumidores.

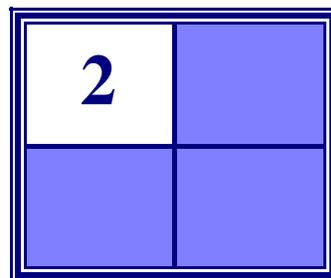
A la luz de estas premisas, se concibió un proyecto de investigación “Aplicación de distintas Estrategias de Alimentación y Cultivo para aumentar la Rentabilidad del Cultivo de la Dorada y la Calidad del Producto Final” (1FD97-0979), concedido en convocatoria pública de investigación y financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología y la UE (fondos FEDER). La especie modelo –la dorada- constituye uno de los pilares más importantes de la piscicultura marina nacional y, actualmente, representa más del 50% de la producción acuícola marina en el área mediterránea. Se trata, por consiguiente, de un teleósteo perciforme que habita en aguas poco profundas tanto de fondos arenosos como de roca del Mediterráneo y del Atlántico, entre las islas Canarias e Inglaterra. Es sociable y presenta un fenómeno de inversión sexual, pasando normalmente de machos a hembras a los dos años de edad. Es una de las especies con mayor valor gastronómico en nuestro país, y en la actualidad hay más de 40 concesiones en las costas españolas destinadas al cultivo de la misma (Fernández, 1999; Vergara-Martín, 2000).

En el proyecto anteriormente mencionado han participado grupos de Investigación del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS-CSIC), del Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA-CSIC) y del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia. Asimismo, se ha contado con la colaboración de empresas de pre-engorde (VALENCIANA DE ACUICULTURA) y engorde (CRIMAR) de Valencia y Castellón, respectivamente. Gracias a la colaboración de la Oficina de Transferencia Tecnológica del CSIC en la Comunidad Valenciana, los resultados obtenidos han sido objeto de unas jornadas de difusión y divulgación al sector empresarial (Pérez-Sánchez y cols., 2002). Algunos de estos aspectos han dado lugar a la elaboración de la presente Tesis Doctoral, cuyos **objetivos** fundamentales son:

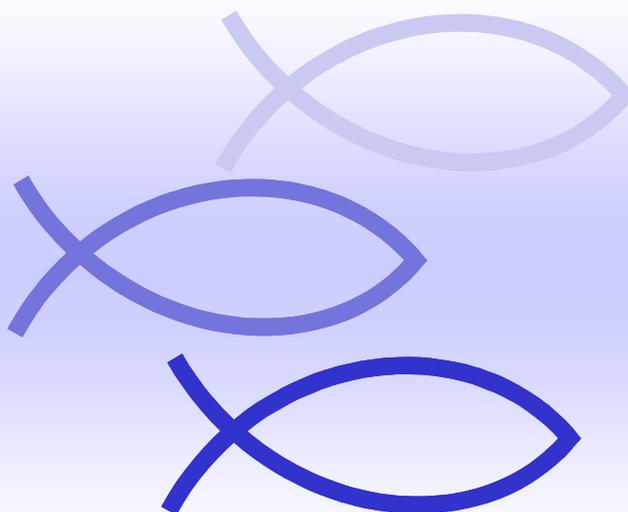
- Caracterización de la regulación endocrina del crecimiento, ingesta y grado de adiposidad de la dorada.
- Estudio del efecto de la estrategia de alimentación y cultivo sobre las tasas de crecimiento y conversión a lo largo de distintos periodos de engorde.

- Estudio del efecto de la estrategia de alimentación sobre el estado inmunopatológico de doradas cultivadas.
- Caracterización molecular de los receptores de la hormona de crecimiento y estudio de su regulación transcripcional.

En la introducción se ha revisado ampliamente el conocimiento actual sobre el crecimiento, ingesta y adiposidad; abordándose en los capítulos siguientes los diferentes objetivos planteados.



Introducción



- 2.1. Crecimiento somático
- 2.2. Crecimiento y factores abióticos
 - 2.2.1. Temperatura
 - 2.2.2. Fotoperiodo
- 2.3. Eficiencia energética. Adiposidad y estado inmunológico
- 2.4. Control y regulación de la adiposidad
 - 2.4.1. Localización de los depósitos grasos
 - 2.4.2. Divergencia y presión evolutiva
 - 2.4.3. Modelo lipostático: crecimiento compensatorio
 - 2.4.4. Señales periféricas de adiposidad: leptina
- 2.5. Señales eferentes del sistema nervioso central: Familia GH/PRL/SL
 - 2.5.1. Origen de la familia
 - 2.5.2. Estructura proteica
 - 2.5.3. Organización genómica
 - 2.5.4. Aspectos funcionales
 - 2.5.4.1. Características de la familia receptores citoquina clase I
 - 2.5.4.2. Organización genómica de los receptores de GH y PRL en vertebrados superiores. Proteínas de transporte y formas truncadas
 - 2.5.4.3. Caracterización molecular de los receptores de GH y PRL en peces
 - 2.5.4.4. Eje somatotrópico: GH-IGF
 - 2.5.4.4.1. Estructura y evolución de IGFs
 - 2.5.4.4.2. Receptores y proteínas de transporte de IGFs

2.1. Crecimiento somático

El crecimiento es el resultado de una compleja interacción entre factores genéticos, ambientales y nutricionales, presentado este proceso una complicación adicional en el caso de los peces. En estos vertebrados inferiores, el crecimiento somático (acreción proteica) es un proceso continuo e indeterminado a lo largo de toda la vida del animal (ver Mommsen y Moon, 2001). De ahí, la importancia de diferenciar claramente en estos animales el crecimiento somático (aumento de masa muscular-deposición proteica) del reproductivo (producción de huevos y/o esperma). Este último va muchas veces en detrimento del somático, por lo que solamente acontece una vez cubiertas las necesidades energéticas que aseguren la supervivencia del animal (ver Jobling, 1994).

El crecimiento somático es el resultado de la hiperplasia (aumento del número de células) e hipertrofia (aumento del tamaño celular) del músculo esquelético (ver Rowlerson y Veggetti, 2001). En los mamíferos, el número de fibras musculares está fijado desde el nacimiento, por lo que el desarrollo postnatal implica la hipertrofia de las células musculares ya existentes. Sin embargo, en los peces el crecimiento por hiperplasia sigue dándose hasta pasada la etapa juvenil, aunque la contribución de la hiperplasia frente a la hipertrofia disminuye con la edad y el tamaño corporal. Es más, existen periodos de crecimiento hiperplásico que alternan con periodos de crecimiento por hipertrofia, aunque los dos procesos no son excluyentes entre sí (Brooks y Johnston, 1993).

La anatomía del músculo de los peces también difiere de la de otros vertebrados, ya que carecen del sistema conectivo que entrelaza los paquetes musculares al esqueleto del animal. En cambio, poseen células musculares que corren en paralelo, separadas perpendicularmente por tabiques de tejido conectivo (miosepto) ancladas al esqueleto y la piel. Los segmentos musculares situados entre estos tabiques se denominan miotomos. Los mioseptos corren de forma oblicua, formando un patrón de surcos perpendiculares al eje longitudinal del pez,

desde la piel hasta la espina. Esta anatomía está adaptada para permitir la flexibilidad del músculo en los movimientos que propulsan al pez a través del agua (Huss, 1998).

El músculo esquelético de los peces está compuesto mayoritariamente de músculo blanco, pero dependiendo de la especie también existe una importante fracción de músculo rojo, localizado debajo de la piel a lo largo de todo el cuerpo del animal (Fig. 2.1). La proporción de músculo blanco y rojo varía en función de la actividad de los peces, ya que el primero está perfectamente adaptado para los movimientos súbitos, fuertes y cortos; mientras que el segundo está diseñado para movimientos continuos aunque no tan fuertes. Hay notables diferencias en la composición química de ambos tipos musculares, pero la más característica es el alto contenido de lípidos y hemoglobina que facilita un metabolismo mayoritariamente aeróbico en el músculo rojo (ver Huss, 1998; Sängner y Stoiber, 2001).

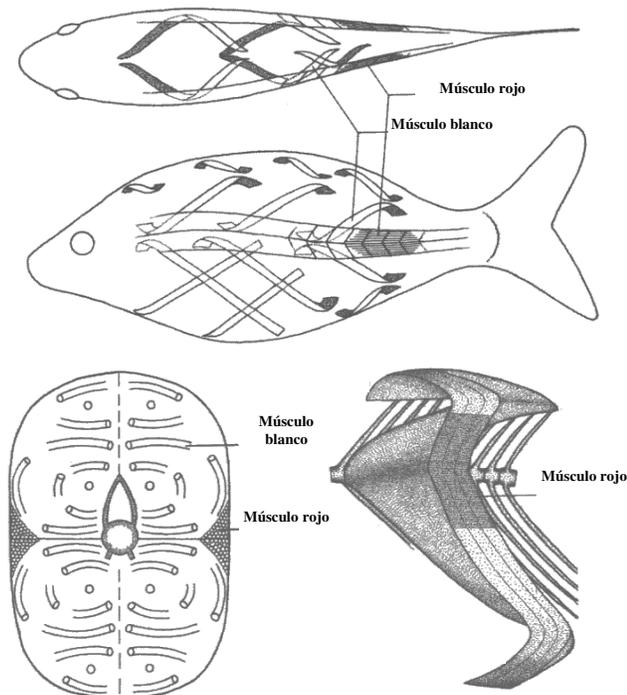


Figura 2.1. Modelo de estructura muscular del miotomo de un teleosteo. (A) vista dorsal y lateral; (B), vista transversal (modificado de Sängner y Stoiber, 2001).

La hiperplasia muscular requiere una fuente adicional de núcleos, proporcionados por un conjunto de células biogénicas indiferenciadas –células satélite-, localizadas debajo de la lámina basal. Estas células se activan en casos de daño tisular para la subsiguiente regeneración (Stockdale, 1992; Schultz, 1996), pero tanto en mamíferos como en aves los mecanismos de activación son objeto de controversia. No obstante, se sabe que dichas células se originan a partir de células pluripotentes al final del desarrollo embrionario (Stockdale, 1992; Quinn y cols., 1988). En lo que respecta a los peces, los estudios con células satélites son todavía incipientes, pero se cree que son responsables de la hipertrofia de las fibras musculares así como de la biogénesis de nuevas fibras (ver Fauconneau y Paboeuf, 2001). A pesar de ello, tanto el origen como la implicación de estas células en estos procesos es difícil de demostrar. En este contexto, son de notable interés los trabajos con desmina y diferentes miembros de la familia MyoD, utilizados como marcadores moleculares de la generación de nuevas fibras musculares y su posterior diferenciación (ver Watabe, 2001).

Los miembros de la familia MyoD, factores de transcripción con una estructura hélice-vuelta-hélice, han sido estudiados con detalle en el músculo esquelético de vertebrados superiores (ver Weintraub y cols., 1991). Nombrados en su conjunto como MRFs, incluyen los genes de MyoD y miogenina, así como los genes myf-5 y MRF4 (o myf-6). Los MRFs forman heterodímeros con los productos de la proteína E y se unen a las secuencias de ADN –CANNTG- presentes en las regiones reguladoras de muchos genes específicos del músculo (Olson, 1992). En los mamíferos, la expresión forzada de cada uno de los MRFs es capaz de transformar células no musculares en mioblastos (Weintraub, 1993), mostrando los estudios en ratones *knock-out* que estos factores de transcripción tienen funciones distintas pero que, en cualquier caso, se solapan (Rudnicki y cols., 1992; Smith y cols., 1994).

Otro regulador importante de la diferenciación muscular es la familia de los factores de transcripción del factor potenciador específico de miocitos 2 (MEF2). Éste se une a secuencias ricas en A/T, presentes en algunos promotores específicos del músculo (Gosset y cols., 1989). Las múltiples

isoformas de MEF2 se han identificado en gran variedad de vertebrados, incluidos los peces (Ticho y cols., 1996). Éstas contienen una secuencia característica de unión al ADN y un dominio específico de MEF2 altamente conservado. Las isoformas de MEF2 regulan los genes hélice-vuelta-hélice y cooperan con los MRFs en la activación de la transcripción específica del músculo esquelético (Olson, 1992) (Fig. 2.2).

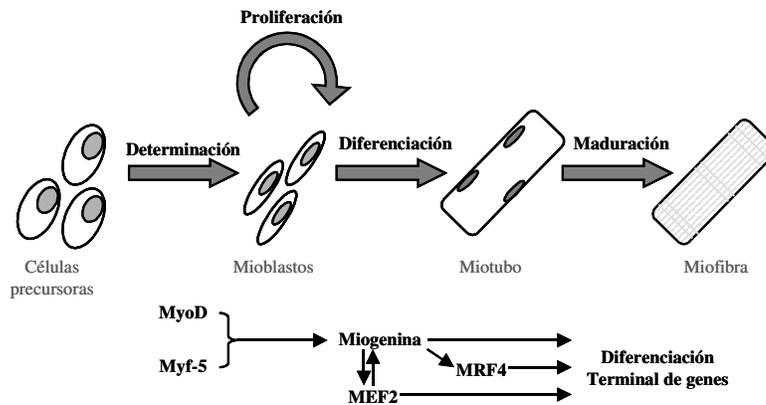


Figura 2.2. Representación de la determinación y diferenciación del linaje miogénico en relación con la expresión de la familia MyoD y los factores de transcripción MEF2 (modificado de Watabe, 2001).

Varios miembros de la familia MEF2 y MyoD han sido identificados en el pez cebra (ver Watabe, 2001). En trucha, se han clonado y secuenciado varios MRFs (ver Rescan., 2001), y dos genes de MyoD, al igual que en dorada (Tan y Du, 2002). Los ADNc de MyoD y MEF2 también se han clonado y secuenciado en carpas (Kobiyama y cols., 1998), por lo que se sospecha que los mecanismos de formación y regulación del músculo esquelético se han conservado notablemente a lo largo de la evolución de los vertebrados. Además, en esta especie, las fibras musculares rápidas cambian las isoformas de la cadena pesada de la miosina con la temperatura (Guo y cols., 1994; Watabe y cols., 1995; Imai y cols., 1997; Hirayama y Watabe, 1997), por lo que varios autores han sugerido que los MRFs

participan en el reclutamiento de las fibras musculares en respuesta al incremento de la temperatura y del crecimiento.

Las fibras musculares que se regeneran después del daño tisular (procedentes de las células satélites) recapitulan el desarrollo muscular gracias a la expresión de desmina y distintas isoformas de miosina (Sartore y cols., 1982; Helliwell, 1988; Rowleron y cols., 1997). La desmina es una de las primeras proteínas específicas del músculo en ser expresada después de finalizar la diferenciación de los mioblastos, donde es abundante y localizada de forma ubicua. Después del desarrollo de las fibras musculares, su distribución cambia y su expresión cae, por lo que se trata de un útil marcador de la generación de nuevas fibras musculares en vertebrados (Helliwell, 1988; Bornemann y Schmalbruch, 1992). Esta proteína se ha identificado en anguila eléctrica (Costa y cols., 1986), medaka (Ishikawa, 1990), carpa (Koumans y cols., 1990), salmón (Speilberg y cols., 1994), trucha (Greenlee y cols., 1995), pez mosquito (Arenas y cols., 1995), dorada y pez cebra (Rowleron y cols., 1997; Loh y cols., 2000).

2.2. Crecimiento y factores abióticos

Directa o indirectamente hay un gran número de factores abióticos (temperatura, fotoperiodo, salinidad, la cantidad de oxígeno disponible y calidad del agua) que afectan al crecimiento de los peces. No obstante, dado el carácter cíclico de la temperatura y el fotoperiodo, posiblemente estos dos factores son los que ejercen una mayor incidencia a lo largo del desarrollo y la vida adulta.

2.2.1. Temperatura

El crecimiento de los peces, al igual que en otros ectotermos, es claramente dependiente de la temperatura (ver Jobling, 1997). De modo que la temperatura óptima, definida como la temperatura en la que se alcanza el crecimiento máximo, suele ser inferior a la de ingesta máxima (Brett, 1979; Gadomski y Caddell, 1991). Aspecto éste que pone de relieve la falta de coincidencia de la ingesta máxima con la mejor conversión del alimento.

En el caso de los ciprínidos, la temperatura óptima es de 20°C o más, oscilando en dorada y lubina alrededor de los 20-22°C, mientras que en salmónidos oscila entre los 12-17°C (ver Jobling, 1994). A su vez, dentro de cada especie, se dan una serie de cambios a lo largo del desarrollo que disminuyen la temperatura óptima a medida que aumenta la edad y el tamaño corporal del animal (Brett, 1979; Pedersen y Jobling, 1989; Fonds y cols., 1992).

El efecto de la temperatura sobre el tipo de crecimiento muscular es también dependiente de la especie. De hecho, durante el desarrollo embrionario y larvario del arenque (Vieira y Johnston, 1992; Johnston y cols., 1995), la estimulación del crecimiento por la temperatura se traduce en una mayor hiperplasia y una reducción del crecimiento por hipertrofia. Por el contrario, en otras especies [salmón (Stickland y cols., 1988; Usher y cols., 1994), corégono (Hanel y cols., 1996), bacalao (Galloway y cols., 1998)] la respuesta es diametralmente

opuesta. El motivo de esta aparente contradicción no está del todo claro, aunque una posible explicación podría ser que la temperatura tiene un mayor efecto sobre la replicación del ADN que sobre la síntesis de proteínas (Van der Have y de Jong, 1996). A su vez, la temperatura puede reducir la disponibilidad de oxígeno, disminuyendo así el crecimiento por hiperplasia (Matschak y cols., 1997, 1998).

En cualquier caso, dada la estrecha relación entre temperatura e ingesta, es difícil desligar los efectos de una u otra variable sobre el mecanismo o modo de crecimiento muscular. En condiciones de alimentación restringida, larvas de diferentes especies de peces suelen mostrar una disminución del crecimiento hiperplásico (Alami-Durante y cols., 1997; Galloway y cols., 1999), mientras que el crecimiento hipertrófico se ve menos afectado (Galloway y cols., 1999). En mamíferos, la reducción de la ingesta también disminuye la replicación celular y la hiperplasia (Cheek y Hill, 1970). Sin embargo, los efectos sobre la hiperplasia e hipertrofia no son siempre opuestos, y hay casos en peces donde la temperatura afecta de modo similar al crecimiento por hiperplasia e hipertrofia (Brooks y Johnston, 1993).

En los ectotermos, otro de los parámetros estrechamente relacionados con la temperatura es la capacidad de respuesta inmune (Zapata y cols., 1992; Bly y Clem, 1992). Una posible explicación es que la reducción de la ingesta, con el descenso de la temperatura, comporta un desequilibrio energético, así como posibles deficiencias y/o disfunciones en la síntesis de moléculas claves involucradas directa o indirectamente en la función inmune (Blazer y Wolke, 1984; Hardie y cols., 1990). Un ejemplo claro es el síndrome invernal de la dorada, que se ve agudizado con el aumento de la latitud (Gallardo y cols., 2003). La lubina, con un área de distribución similar a la de la dorada, no parece estar aquejada de este síndrome. No obstante, otras especies como el pez gato muestran síntomas similares cuando son expuestas a bajas temperaturas sin una aclimatación previa (Bly y cols., 1993).

En la dorada, las tasas de mortalidad provocadas por este síndrome rondan normalmente entre el 7-10%, aunque en casos

muy graves se puede llegar al 80% (Padrós y cols., 1998). Esta situación suele ir acompañada del aumento del cortisol plasmático y de una disminución de los linfocitos circulantes, así como de la lisozima y actividad del complemento (Tort y cols., 1998a). Los signos visibles son el letargo, el nado de lado o al revés y una mínima reacción a estímulos externos, habiéndose descrito una gran variedad de lesiones tisulares en los animales sintomáticos (degeneración granular y necrosis de las fibras musculares blancas, atrofia del páncreas exocrino y degeneración del hígado graso) (Galleotti y cols., 1998; Padrós y cols., 1998; Tort y cols., 1998b; Contessi y cols., 2000). Además, el tracto digestivo está distendido, lo que indica una absorción de nutrientes potencialmente reducida. La mucosa intestinal muestra hiperplasia de las células mucosas y, frecuentemente, la lámina basal presenta edemas (Bovo y cols., 1995; Padrós y cols., 1998; Tort y cols., 1998b; Contessi y cols., 2000). Lesiones menos evidentes se han observado también en cerebro y riñón (Padrós y cols., 1998). Finalmente, entre otras alteraciones funcionales, cabe reseñar la disminución del hematocrito y de la glucosa plasmática, frente a un aumento de la proteína sérica (β_2 y γ -globulinas), del potasio y de los aminoácidos circulantes (Gallardo y cols., 2003).

2.2.2. Fotoperiodo

Los efectos del fotoperiodo sobre el crecimiento se dan tanto en especies marinas como de agua dulce, posiblemente por su capacidad de sincronizar los ritmos endógenos de ingesta con las condiciones ambientales más favorables para el crecimiento (ver Imsland y Jonassen, 2001). De modo que, la exposición a fotoperiodos largos suele traducirse en una mejor eficiencia de conversión del alimento más que en un aumento *per se* de la ingesta (ver Boeuf y Le Bail, 1999). No obstante, experiencias llevadas a cabo en carpines han puesto de relieve que la melatonina actúa en estos animales como una señal periférica de saciedad que inhibe la ingesta voluntaria de alimento (Pinillos y cols., 2001).

En los peces, al igual que en todos los vertebrados estudiados hasta la fecha, la melatonina es la encargada de traducir la señal del fotoperiodo registrada a través de fotorreceptores de la retina y la glándula pineal (Bartness y Goldman, 1989; Bartness y cols., 1993). En los peces, la glándula pineal es a su vez la única fuente de melatonina circulante (Molina-Borja y cols., 1996). De modo general, los niveles de melatonina se mantienen altos durante la noche y caen en picado durante el día (Harvey y Daughaday, 1995), al disminuir la actividad de la serotonina n-acetiltransferasa (Ekström y Meissl, 1997). Por consiguiente, la melatonina representa una señal interna que sirve al organismo para medir y predecir el tiempo de una forma diaria y estacional (ver Falcón y cols., 1992; Zachmann y cols., 1992; Meissl, 1997); capaz de regular directa o indirectamente el crecimiento y los procesos reproductores, interaccionando con ritmos endógenos circadianos y circanuales.

En este sentido, es interesante reseñar que la temperatura y la época de lluvia son las señales desencadenantes de la reproducción en especies de zonas tropicales, mientras que en especies de zonas templadas, el fotoperiodo es la señal por excelencia que sincroniza el proceso reproductor (ver Bromage y cols., 2001b).

A lo largo de los últimos años, la industria del sector en acuicultura ha venido utilizando la manipulación del fotoperiodo para retrasar y adelantar las puestas, y asegurar de este modo una producción de larvas y alevines a lo largo de gran parte del año, (ver Bromage y cols., 2001a). En salmónidos, estas técnicas también se han utilizado para retrasar la pubertad, con los consiguientes efectos sobre el crecimiento y la calidad de la carne de un producto destinado a un mercado cada vez mejor informado y más exigente (Blokus, 1986; Lie y Huse, 1992; Bonnet y cols., 1996; Einen y cols., 1998).

En el caso concreto de la dorada, el desarrollo gonadal en la región mediterránea se inicia de forma natural durante el mes de septiembre, empezando el desove entre finales de diciembre e inicios de enero. El desove o liberación de los gametos puede prolongarse 3-4 meses, durante los cuales la hembra produce entre 0,5-2 veces su peso corporal en huevos (Zohar y cols., 1995). Parte de la energía para producir este volumen de huevos proviene directamente de la ingesta de alimento, pero en gran parte también de las reservas propias de energía, con los consiguientes cambios de composición corporal y pérdida de biomasa que tarda varios meses en regularizarse (Harel y cols., 1994).

2.3.Eficiencia energética. Adiposidad y estado inmunológico

En comparación con otros vertebrados, el contenido proteico de la dieta de los peces es notablemente más alto (Cowey y Sargent, 1979; Wilson y Halver, 1986; Cowey, 1994). En aves y mamíferos, el nivel óptimo de proteína oscila entre el 12-25%. Los peces carnívoros requieren entre un 40-50% (ver Millikin, 1982), mientras que los omnívoros precisan entre un 35-45% de proteína (NRC, 1977). No obstante, este alto contenido de proteína en la dieta, así como la alta representación de especies carnívoras entre los peces (~85%), es en realidad reflejo de una alta eficiencia en la transformación de energía; fruto del bajo coste de la termorregulación, la locomoción y la excreción mayoritariamente en forma de iones amonio en el medio acuático (Pandian y Vivekanandan, 1985, Kaushik y Cowey, 1991). En consecuencia, la demanda de sustratos no proteicos para fines energéticos disminuye, por lo que aumenta la relación óptima de proteína/energía en la dieta. No obstante, para una determinada especie la relación óptima de proteína/energía varía con la edad y el tamaño del animal (ver Satia, 1974; Lovell, 1989, Kaushik, 1995).

Es de suponer que variaciones similares también tienen lugar con la temperatura y el nivel de ración, aunque desgraciadamente ello está deficientemente tipificado. En la dorada, por ejemplo, hay evidencias experimentales de que la composición óptima de la dieta varía en función de la tasa de ingesta (Company y cols., 1999a): la tasa de conversión del alimento no disminuye en animales alimentados a saciedad con dietas de alto contenido proteico; mientras que con la reducción de la relación proteína/energía de la dieta hay que restringir la ingesta para seguir manteniendo una alta conversión del alimento. Aspectos éstos que nos llevan a revisar el concepto *sparing* de proteínas, a la vez que establecer criterios adecuados para un uso más racional de las dietas hiperenergéticas (alto contenido graso) (Company y cols., 1999b).

Otro efecto no deseado de un uso inadecuado de las dietas hiperenergéticas es el aumento del grado de adiposidad de los animales en cultivo. Ello comporta por sí mismo una pérdida del valor añadido que supone la incorporación del pescado en la dieta, sin olvidar que ello también altera la percepción de frescura y el grado de conservación, así como las propiedades físicas y organolépticas (Sheehan y cols., 1996; Gjedrem, 1997; Einen y Skrede, 1998). De ahí que, como mal menor, una práctica habitual en ciertos cultivos haya sido imponer un periodo de ayuno relativamente largo a los peces destinados a la venta (Blokus, 1986; Lie y Huse, 1992; Bonnet y cols., 1996; Einen y cols., 1998).

Un incremento excesivo del grado de adiposidad también puede comprometer la capacidad de respuesta del sistema inmune. Diferentes estudios en vertebrados superiores muestran que la obesidad y el consumo de dietas con alto contenido en grasas perjudican la respuesta inmune y aumentan el riesgo de enfermedades infecciosas graves (Lamas y cols., 2002). Por otra parte, la obesidad en humanos se ha relacionado con una gran variedad de problemas de salud, entre los que se incluyen hipertensión, dislipemia, enfermedades cardiovasculares, diabetes *mellitus*, lipoapoptosis de las células β -pancreáticas y ciertos tipos de cáncer (ver Unger, 2000; Samartin y Chandra, 2001). En la última década, numerosos estudios han intentado establecer las interrelaciones existentes entre el nivel de grasa de la dieta y el sistema inmune (Calder, 1998). Sin embargo, aunque cada vez hay más evidencias de las ventajas de mantener un determinado grado de adiposidad, los mecanismos y vías metabólicas implicadas en ello no están delimitados, y sólo existe un cuadro clínico que relacione adiposidad con disfunciones de capacidad de respuesta (Lamas y col., 2002) (ver Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Resumen de las principales alteraciones del sistema inmunológico en relación con la obesidad (modificado de Lamas y cols., 2002).

	Resultado	Referencia
Obesos	Niveles altos de linfocitos totales, IL-6 y IL-1 α , proteína C reactiva y TNF- α . Respuesta leve de los linfocitos contra los mitógenos.	Nieman y cols., 1999; Visser y cols., 1999; Raymon y cols., 2000; Tanaka y cols., 1993
Obesos con moderada restricción de energía	Respuesta proliferativa leve contra los patógenos.	Nieman y cols., 1999
Obesos con pérdida de peso	Respuesta elevada de los linfocitos T contra los patógenos.	Tanaka y cols., 1993, 2001
Obesos después del ayuno	Actividad elevada de las células naturales asesinas e IgM.	Wing y cols., 1983
Obesos con quemaduras	Probabilidad de infección elevada por bacterias, sepsis, duración de la antibioterapia y permanencia en el hospital.	Gottschlich y cols., 1993

En los vertebrados superiores, el sistema inmune alcanza su máxima expresión en la respuesta mediada por anticuerpos. No obstante, este tipo de respuesta es relativamente lenta en los peces, por lo que en estos vertebrados inferiores la respuesta inmune no específica se encuentra especialmente desarrollada (ver Fernández y cols., 2002).

En peces, los órganos y tejidos inmunocompetentes más importantes son el timo, el riñón anterior y el bazo. Los tejidos inmunitarios de estos órganos no están tan bien definidos como en los mamíferos, pero las diferentes observaciones sugieren que el timo es el responsable del desarrollo de los linfocitos T, como en el resto de vertebrados, aunque los datos que sustentan esta hipótesis son indirectos (Ellsaesser y cols., 1988; Passer y cols., 1996). El riñón anterior es importante en la hematopoyesis e inmunidad de los peces, ya que la diferenciación de las células sanguíneas acontece en este tejido, en lugar de la médula ósea,

como es el caso de los mamíferos. Además, el riñón anterior está implicado en la producción de las células inmunitarias y la respuesta inmune temprana. Conforme los peces se desarrollan, el riñón anterior se vuelve el tejido hematopoyético más importante; mientras que el riñón posterior está implicado en la filtración de la sangre y/o funciones urinarias.

El bazo es el segundo órgano en importancia de la respuesta inmune de los peces, estando implicado tanto en la reacción inmunitaria como en la formación de células sanguíneas (ver Manning, 1994). La mayor parte de los macrófagos presentes en el bazo están localizados en los centros melanomacrofágicos, participando también este órgano en la eritropoyesis. Van Muiswinkel y cols. (1991) sugieren que estos centros melanomacrofágicos están implicados en la estimulación antigénica, pudiendo persistir dicha estimulación durante un año, por lo que se sugiere un papel importante en la memoria inmunológica (ver Shoemaker y cols., 2001).

Al igual que ocurre en vertebrados superiores, la respuesta inmune de los peces está afectado por una gran variedad de factores (Tabla 2.2). No obstante, en el contexto que nos ocupa cabe reseñar que estudios llevados a cabo en lubina muestran una correlación significativa entre la composición de la dieta y la prevalencia de infección por *Ceratomyxa* spp. (Sitjá-Bobadilla y Pérez-Sánchez, 1999). En este caso, la tasa de infección es mayor en los peces alimentados con dietas ricas en lípidos. Otros autores también han demostrado una correlación entre la composición de la dieta y las infecciones parasitarias en mamíferos (Coop y Holmes, 1996) y peces (Thomas y Woo, 1990; Whali y cols., 1995), lo que proporciona una evidencia clara de que la manipulación de la dieta representa una herramienta útil para mejorar la inmunocompetencia y la resistencia a enfermedades.

Con independencia del nivel de grasa de la dieta, se han considerado tres mecanismos para explicar la interrelación entre ácidos grasos y capacidad de respuesta del sistema inmune de peces (ver Balfry y Higgs, 2001). El primero es a través de su influencia sobre la composición lipídica de la membrana, ya que al igual que en los mamíferos, varias respuestas inmunológicas

están basadas en la interacción entre las membranas celulares de los leucocitos; como por ejemplo, la fagocitosis, la unión antígeno-anticuerpo y las etapas de activación de la producción de citoquinas. Un segundo mecanismo implica la alteración de las señales de transducción, posiblemente debido a los efectos sobre la proteínquinasa C, tal y como se ha visto en mamíferos (Erickson y Hubbard, 1993). Por último, un tercer mecanismo podría ser a través de la producción de icosanoides inmunológicamente activos. Esta última vía se ha estudiado mayoritariamente en salmónidos, pero dado que existen diferencias entre especies, éstas han de tenerse en cuenta antes de hacer generalizaciones al respecto (Rowley y cols., 1995).

Tabla 2.2. Factores que afectan a la resistencia innata y la inmunidad adquirida de los peces (modificado de Shoemaker y cols., 2001).

Factores Generales	Factores Específicos
Genéticos	Diferencias interindividuales (Wolters y Johnson, 1994; Wolters y cols., 1996; Wilkie y Mallard, 1999)
Ambientales	Temperatura, estación, fotoperiodo (Bly y Clem, 1991)
Estrés	Calidad del agua, contaminantes, densidad, manejo y transporte, ciclos de selección.
Nutrición	Calidad y cantidad del alimento, disponibilidad de micronutrientes, adición de inmunoestimulantes, factores antinutricionales (Ainsworth y cols., 1994; Duncan y Klesius, 1996).
Intraespecíficos	Edad, especies o razas, individuos (Klesius, 1990; Wolters y cols., 1996; Balfry y cols., 1997).
Patógenos	Niveles de exposición, tipo (parásito, bacteria o virus), virulencia y serotipo (Klesius y Shoemaker, 1997).

2.4. Control y regulación de la adiposidad

2.4.1. Localización de los depósitos grasos

La función por excelencia del tejido adiposo es la reserva de energía (ver González-Hita y cols., 2002), lo cual ha sido esencial en la evolución de aves y mamíferos (Pond, 1992; Vernon y Houseknecht, 2000). El tejido adiposo blanco, cuyos lípidos son acumulados en forma de triglicéridos, tiene la capacidad de aumentar en volumen y extenderse por el organismo formando depósitos grasos, cuya distribución varía de forma distinta según el grupo taxonómico al que se haga referencia. En el caso del hombre, la distribución de estos depósitos grasos viene determinada principalmente por el sexo, con acumulaciones femeninas periféricas e inferiores y con acumulaciones masculinas típicamente centrales y superiores. En mamíferos hibernantes, al igual que en los neonatos y animales adaptados al frío, existe además del tejido adiposo blanco (reserva energética) el tejido adiposo pardo (Dawkins y Hall, 1965; Smith y Horwitz, 1969; Lindberg, 1970), encargado de la termorregulación durante el periodo de hibernación. Dicho tejido se localiza en el cuello y la región torácica, donde gran cantidad de vasos sanguíneos transportan rápidamente el calor producido por la combustión de los lípidos a los órganos vitales del animal (cabeza y corazón). En el caso de las aves migratorias, los depósitos de grasa se acumulan de forma subcutánea y proporcionan la fuente de energía durante la migración (ver Blem, 1990), aunque los músculos pectorales pueden ser también importantes en dicho almacenamiento (Marsh, 1984).

En el caso concreto de los peces, los lípidos son depositados en el músculo, hígado, depósitos subcutáneos y en la cavidad abdominal. El músculo e hígado son considerados los depósitos de mayor capacidad de almacenamiento (ver Jobling y cols., 1998). Sin embargo, en función de la especie se utiliza de forma preferente uno u otro (ver Love, 1980; Weatherlay y Gill, 1987).

Existe una correlación negativa entre los lípidos musculares y los hepáticos (Ando y cols., 1993), por lo que las

distintas especies pueden ser agrupadas en función de dicho cociente. El primer grupo lo forman los peces grasos, que almacenan los lípidos de forma preferente en el músculo esquelético, representando más del 10% de su peso fresco. Entrarían dentro de esta categoría la anguila, la caballa y el arenque (Huss, 1998). El segundo grupo lo forman los peces denominados “magros”, que acumulan los lípidos preferiblemente en el hígado. Un ejemplo de ello es el bacalao, donde los lípidos almacenados en el hígado suponen hasta el 70% de su peso fresco (Jobling y cols., 1991; Lambert y Denis-Dutil, 1997).

Entre ambas agrupaciones, encontramos una amplia variedad de peces donde la distribución lipídica entre hígado y músculo oscila, y la importancia relativa de cada depósito es difícil de valorar. Un ejemplo de ello es la lubina, donde los depósitos periviscerales son considerados los de mayor peso específico, ya que suponen el 4-5% del peso total del individuo. En cualquier caso, la lubina se caracteriza por tener un hígado relativamente graso (30-40% en peso fresco) y los lípidos hepáticos representan hasta el 1,2% del peso total del individuo (Dias y cols., 1998). En dorada (Santinha y cols., 1999) y la mayoría de salmónidos, como el salmón rojo (Porter y cols., 1992), salmón común (Aursand y cols., 1994), y trucha alpina (Miglavys y Jobling, 1989; Jørgensen y cols., 1997; Jobling y cols., 1998), los lípidos se almacenan mayoritariamente en el músculo esquelético (hasta un 10% del peso fresco) y en el tejido perivisceral; mientras que el hígado no parece desempeñar un papel cuantitativamente importante en el almacenamiento lipídico (Takama y cols., 1994). De hecho, muchos salmónidos depositan grandes cantidades de lípidos en el esqueleto, como es el caso del salmón del atlántico y la trucha alpina, con el 20% y el 45-60% de los lípidos totales, respectivamente.

Así pues, la importancia relativa de cada depósito lipídico varía en función de la especie. En una primera instancia se creyó que dichas diferencias respondían a motivos ecológicos ligados a la forma de vida de cada especie. Braekken (1959) sugirió que el hígado es el principal reservorio en las especies que habitan los fondos marinos, caracterizadas por su escasa actividad; mientras que el músculo esquelético es el principal depósito en las

especies de comportamiento más activo. No obstante, tales consideraciones ecológicas no se sostienen, dada la gran variedad de patrones de distribución lipídica exhibida por peces de ambientes similares (Sheridan, 1988).

En 1994, Sheridan sugirió una organización jerárquica de los depósitos grasos que difería de la meramente cuantitativa. De acuerdo con ello, la grasa visceral ocupa el primer lugar en esta jerarquía, y estaría implicada en la reserva de energía a largo plazo. Por el contrario, los depósitos musculares y hepáticos son más bien de carácter secundario, y estarían especialmente influenciados por unas determinadas condiciones fisiológicas y ambientales. Los salmónidos parecen ajustarse bastante bien a dicho modelo. Durante la esmoltificación tienden a preservar la grasa visceral (Sheridan y cols., 1989); mientras que en las etapas finales del desarrollo gonadal están supeditadas a la movilización de las reservas energéticas del músculo y la carcasa. Sin embargo, en la lubina, los lípidos mesentéricos se movilizan en las etapas tempranas del ayuno, mientras que la composición del músculo no varía durante dicho periodo (Echevarría y cols., 1997). Estas diferencias podrían indicar la existencia de variaciones interespecíficas, no sólo en cuanto al peso específico de cada uno de los depósitos grasos, sino también en el destino final de los lípidos almacenados en cada uno de ellos.

2.4.2. Divergencia y presión evolutiva

El tejido adiposo permite la supervivencia de los animales en ambientes exigentes al asegurar el suministro de energía. No obstante, el consiguiente aumento de masa corporal dificulta la movilidad, aumenta el riesgo de predación y/o dificulta la captura de presas (ver Vernon y cols., 2001). Por tanto, en la naturaleza, los animales tienen la necesidad de ajustar el tamaño de su tejido adiposo dependiendo de si el hambre o la depredación es la mayor de sus amenazas (ver Vernon y Houseknecht, 2000). Este equilibrio es enormemente complejo ya que la disponibilidad de alimento es discontinua, y una ventaja evolutiva es la capacidad de aprovechar determinados periodos para almacenar los excesos de energía (ver Mercer y Speakman, 2001). En todo caso, la reserva de grasa corporal es un factor sometido a una alta presión de selección tanto en sus márgenes inferiores como superiores.

El nivel de adiposidad no suele aumentar de forma continua a lo largo de la vida del animal. Así pues, los niveles de grasa corporal muestran a menudo aumentos y descensos predecibles con los cambios de estación. De acuerdo con ello, las especies con adiposidad estacional pueden ser divididas en dos grandes categorías. La primera categoría incluye las especies que responden a los cambios del fotoperiodo, fielmente traducidos por la melatonina (Mercer y cols., 2000; Bartness y cols., 2002). La segunda categoría incluye a las especies que se sincronizan con un reloj interno de localización desconocida (Mrosovsky y Faust, 1985).

Existen también cambios adaptativos de acuerdo con el estado fisiológico del animal en respuesta al potencial de crecimiento, estado reproductor, migración e hibernación (ver Mercer y Speakman, 2001). El tejido adiposo de muchos mamíferos aumenta durante el embarazo para facilitar el cumplimiento de las demandas energéticas durante la lactancia (Vernon y Flint, 1984; Vernon y Pond, 1997). Las aves migratorias depositan grasa como una adaptación energética a la migración (King y Farner, 1965; Ramenofsky, 1990). Además, la tasa de deposición de grasa en estas aves está relacionado con varios

factores: el peso corporal, la distancia de migración, la duración del vuelo y las oportunidades de alimentarse durante el viaje (Berthold, 1975). En el caso de peces anádromos, como los salmónidos, existe la capacidad de aprovechar las condiciones favorables del mar para un rápido crecimiento (Mathisen y Berg, 1968) y almacenamiento de energía (Dutil, 1984, 1986; Boivin y Power, 1990). Conforme los peces retornan al agua dulce, se vuelven anoréxicos y las reservas de lípidos son movilizadas para mantener las demandas metabólicas relacionadas con el desove y el transcurso del invierno (Dutil, 1984, 1986; Boivin y Power, 1990). Así pues, el control de la adiposidad no está confinado a los mamíferos, sino que también se da en aves (Butler y cols., 1998) y peces (Jobling y cols., 1998). Todos ellos deben tener, por consiguiente, mecanismos para modular las cantidades de tejido adiposo y conocer sus necesidades. El proceso de domesticación de algunas especies podría haber eliminado o suavizado algunos de estos mecanismos de regulación. Aún así, todavía se dan en algunos animales domésticos cambios estacionales en el apetito (Kay, 1985) y adiposidad (Vernon, 1986) durante el embarazo y la lactancia.

En el hombre, la presión evolutiva sobre el nivel de adiposidad ha sido posiblemente diferente a la sufrida por otros pequeños mamíferos. Ello podría haber sido consecuencia de dos hechos únicos en nuestra historia evolutiva (ver Mercer y Speakman, 2001). El primero es que los primeros cazadores-recolectores tenían una gran flexibilidad en la elección de la dieta, explotando alimentos de procedencia tanto animal como vegetal. Ello podría haber conducido a unos periodos de escasez de alimento cada vez menores, alternando los productos de distintas fuentes según su disponibilidad estacional. Además, el desarrollo de la agricultura y la capacidad de reservar alimentos fuera del propio cuerpo debieron relajar la presión para superar los periodos de ayuno. El segundo hecho es que los homínidos formaban grupos sociales, lo que debió contribuir a reducir el riesgo de depredación. A su vez, el desarrollo de armas y utensilios para el dominio del fuego aumentó todavía más la posibilidad de defenderse de eventuales depredadores. Estas nuevas herramientas también aumentaron la capacidad de conseguir alimento y, por tanto, disminuir los periodos de ayuno.

En cualquier caso, diferentes estudios a lo largo de la última década resaltan la importancia de los factores genéticos en el origen y desarrollo de la obesidad (ver Villaseñor, 2002). De hecho, en todos los mamíferos existen mecanismos homeostáticos más o menos desarrollados que regulan el reparto de la energía ingerida entre crecimiento muscular y reserva de energía en forma de acumulación grasa (Figlewicz y cols., 1996; Schwartz y Seeley, 1997). La interrupción de esta homeostasis conlleva diferentes respuestas de comportamiento, endocrinas e hipotalámicas en un esfuerzo por restablecer el equilibrio (Figlewicz y cols., 1996; Levin y Routh, 1996; Schwartz y Seeley, 1997).

En peces, existen ciertas evidencias de un equilibrio entre el crecimiento del tejido adiposo y el muscular (Weatherley y Gill, 1981; Metcalfe y Thorpe, 1992; Shearer y cols., 1997a, b). No obstante, son todavía incipientes nuestros conocimientos sobre los mecanismos fisiológicos que regulan este equilibrio, sujeto a una complicación adicional dado el patrón de crecimiento indeterminado de los peces (Silverstein y cols., 1999).

2.4.3. Modelo lipostático: crecimiento compensatorio

El concepto de retroalimentación negativa entre el peso corporal y el volumen del tejido adiposo surgió hace más de 50 años, constituyendo la base de un primer modelo lipostático (Kennedy, 1953). En dicho modelo se hipotetizó la existencia de señales humorales, generadas en proporción al tamaño de las reservas lipídicas, para informar al sistema nervioso central del nivel de adiposidad. Tras lo cual, se desencadenarían las respuestas pertinentes para modificar la ingesta de alimento, la actividad espontánea, la eficiencia metabólica y la termogénesis. En este contexto, se han propuesto a lo largo de los últimos años una gran variedad de mecanismos de señalización y regulación de la ingesta (Hervey 1969; Weigle 1994; Cabanac y Richard 1996; Matson y cols., 1996; Friedman, 1998), aunque los mecanismos últimos todavía no están claros.

En cualquier caso, este modelo lipostático introduce un nuevo concepto de crecimiento- crecimiento compensatorio-, relacionado con los continuos ciclos de reposición y vaciado de las reservas lipídicas (Fig. 2.3).

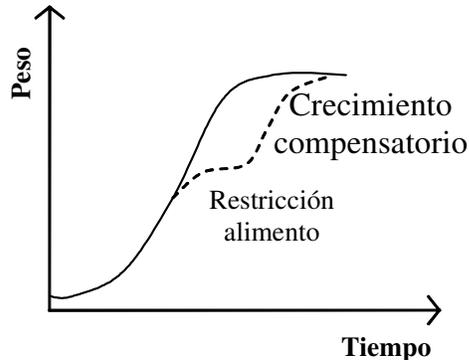


Figura 2.3. Modelo de crecimiento compensatorio.

De acuerdo con el modelo de crecimiento compensatorio, en ausencia de una restricción de la ingesta, la curva de crecimiento sigue un patrón normal. No obstante, un periodo de ayuno o restricción de alimento causa una desviación de la curva teórica, y cuando el alimento está de nuevo disponible en exceso, el animal gana peso rápidamente en un intento por recobrar el patrón ideal. Los cambios que acontecen en dicho proceso son por consiguiente, hiperfagia y una mejora de las tasas de conversión del alimento. En cuanto a los factores que regulan la duración e intensidad de este crecimiento compensatorio se incluyen la severidad y duración de la restricción, el tamaño del animal, el sexo, la edad, el estado de madurez sexual y las condiciones de cultivo (Wilson y Olson, 1960; Plavnik y Hurwitz, 1985; Summers y cols., 1990; Yu y cols., 1990; Marais y cols., 1991; Stamataris y cols., 1991; Jones y Farrell, 1992a, b).

Este proceso de crecimiento compensatorio es, por tanto, de notable interés científico- práctico para la acuicultura a la hora de aumentar la rentabilidad de las explotaciones en cultivo (Quinton y Blake, 1990; Jobling y cols., 1994; Hayward y cols., 1997; Chatakondi y Yant, 2001). Dicho proceso se ha descrito en numerosas familias de peces, y su aplicación ha mejorado las tasas de conversión y/o crecimiento en pez gato (Kim y Lovell, 1995; Gaylord y Gatlin, 2000), trucha arco iris (Weatherlay y Gill, 1981; Quinton y Blake, 1990; Teskeredzic y cols., 1995; Jobling y Koskela, 1996), salmón (Nicieza y Metcalfe, 1997), tilapia (Melard y cols., 1998), pescardo (Russell y Wooten, 1992) y carpa híbrida (Hayward y cols., 1997). Sin embargo, el crecimiento compensatorio sólo se da de forma parcial en algunas especies- no se recupera totalmente el peso- (Schwarz y cols., 1985; Pirhonen y Forsman, 1999); y de modo general es más acusado y/o extenso en especies de aguas frías (Schwarz y cols., 1985; Kim y Lovell, 1995; Hayward y cols., 1997).

2.4.4. Señales periféricas de adiposidad: leptina

Diferentes estudios han puesto de manifiesto la gran importancia del tejido adiposo como productor de ciertas sustancias con acción endocrina, paracrina y autocrina (ver Fruhbeck y cols., 2001). En este grupo de sustancias se incluyen moléculas implicadas en la regulación del peso corporal (leptina, Acr30/adipoQ), del sistema inmune (TNF α , IL-1, IL-6), de la función vascular (angiotensina e inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1), del desarrollo de la resistencia a la insulina (resistina) y de la función reproductora, entre otras (ver González-Hita y cols., 2002; Moreno y Martínez, 2002).

Entre los factores lipostáticos, la leptina merece una mención a parte. El hecho de que esta proteína se asociara inicialmente con el gen de la obesidad (gen *Ob*) en ratones (Campfield y cols., 1995) ha provocado una enorme expectación en el mundo científico, y ha intensificado la investigación en el campo de la obesidad como ningún otro descubrimiento en los últimos 30 años (Casanueva-Freijo y cols., 2000) (ver Fig. 2.4). Sin embargo, los tratamientos con leptina en humanos han tenido menos éxito del esperado (Ahima y Flier, 2000; Chicurel, 2000).

Tal y como ponen de manifiesto numerosas investigaciones, no existen alteraciones del gen *ob* en la mayoría de casos de obesidad humana (Montague y cols., 1997; Ravussin y cols., 1997; Clement y cols., 1998). Es más, un alto porcentaje de casos muestran niveles elevados de leptina (Considine y cols., 1996), con una relativa insensibilidad a la acción de la misma (Palou y Pico, 1998a). Además, dosis altas de leptina pueden tener efectos de endotoxina, induciendo la liberación de citoquinas anoréxicas (Luheshi y cols., 1999). Por consiguiente, la hiperleptinemia no previene la obesidad (Ahima y cols., 2000; Ahima y Flier, 2000; Harris, 2000; Havel, 2000; Reidy y Weber, 2000; Spiegelman y Flier, 2001), aunque puede actuar como retardante de la deposición de grasa. Por todo ello, la administración de leptina sería eficaz en menos del 5% de los obesos, según los pronósticos más optimistas (Palou y Pico, 1998b).

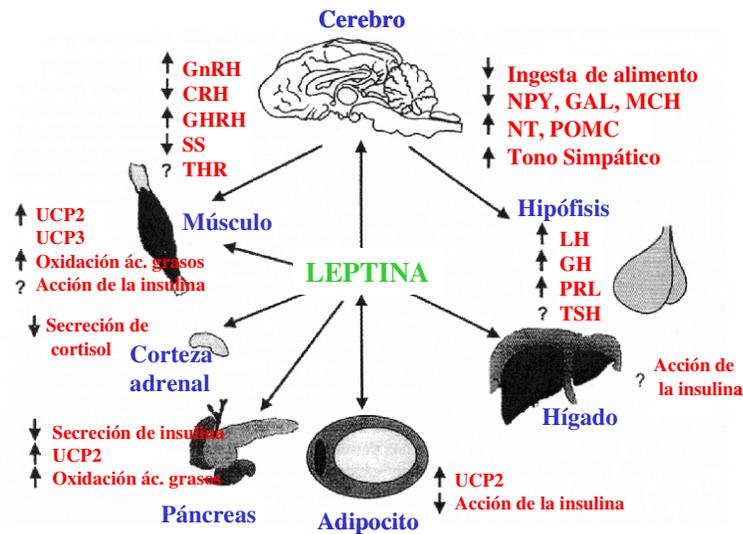


Figura 2.4. Acción de la leptina en la homeostasis energética; mecanismos centrales y periféricos en mamíferos (modificado de Houseknecht y Portocarrero, 1998).

La leptina se ha clonado y secuenciado en varias especies de homeotermos (ver Doyon y cols., 2001): pollo, pavo, armadillo, conejo, ratón, rata, mono *Rhesus*, orangután, gorila, chimpancé, vampiro marrón, gato, perro, mapache, mofeta, cerdo, vaca, oveja y ballena beluga.

Posiblemente, también se encuentra representada en otros taxones (Taouis y cols., 1998; Ashwell y cols., 1999), aunque diferentes estudios han acrecentado la controversia al respecto. En 1998, se secuenció la leptina de pollo (Taouis y cols., 1998), siendo ésta la primera evidencia clara de la existencia de leptina en otros animales que no fuesen los mamíferos. En principio, su regulación es similar a la leptina de los mamíferos (Ashwell y cols., 1999; Denbow y cols., 2000; Dridi y cols., 2000). Sin embargo, desde la publicación de la secuencia de pollo, ha habido una serie de dudas respecto a la verdadera naturaleza de la misma (Friedman-Einat y cols., 1999; Pitel y cols., 2000;

Dunn y cols., 2002). Todo ello, a pesar de que un grupo independiente ha confirmado esta secuencia (Ashwell y cols., 1999). El motivo es la alta similitud (95%) entre las leptinas de pollo y ratón, mientras que la encontrada entre las leptinas de mamíferos es solamente del 90%.

Para explicar la alta similitud entre la leptina de aves y roedores, se ha propuesto una evolución convergente o en paralelo (ver Doyon y cols., 2001). En cualquier caso, un reciente estudio realizado por Murunzábal y cols. (2002) pone de manifiesto la expresión de ARNm de leptina de pollo en el saco vitelino. Además, otro trabajo en el herrerillo común, muestra que las inyecciones de leptina tienen efecto sobre la ingesta y la actividad de aves salvajes (Lohmus y cols., 2003), al igual que en varias especies de mamíferos (Chen y cols., 1996; Cusin y cols., 1996; Wagner y cols., 1996; Barb y cols., 1998).

La inyección de leptina recombinante de roedores también desencadena diferentes efectos fenotípicos en lagartos (Niewiarowski y cols., 2000). En este mismo estudio, se detectó mediante inmunoblot una proteína leptina reactiva. No obstante, no se ha clonado todavía el gen que codifica la leptina en este grupo de vertebrados.

Tras el empleo de diferentes técnicas de biología molecular- Southern blot (Zhang y cols., 1994), inmunoblot (Johnson y cols., 2000), Western ligand blot (Yaghoubian y cols., 2001)- se ha sugerido la existencia en peces de una proteína homóloga a la leptina de mamíferos. Diferentes experiencias no han conseguido poner de manifiesto ningún efecto de la leptina de mamíferos en el salmón plateado (Baker y cols., 2000) y pez gato del canal (Silverstein y Plisetskaya, 2000). Por el contrario, existen evidencias de que la leptina es capaz de regular el nivel de ingesta en carpa dorada (Volkoff y Peter, 2001), así como aumentar las proteínas de unión a los ácidos grasos intracelulares en mojarra (Londrville y Duvall, 2002). Además, en cultivos *in vitro* de células hipofisarias de lubina, la leptina ejerce una acción estimuladora sobre la secreción de hormona luteinizante (LH) (Peyon y cols., 2001) y de somatolactina (SL) (Peyon y cols., 2003). En la trucha, la leptina también afecta a la secreción hipofisaria de la hormona

folículo estimulante (FSH) y LH (Weil y cols., 2003). No obstante, las dosis requeridas para inducir una determinada respuesta suelen ser relativamente altas. Esta aparente insensibilidad podría explicarse por el uso de una hormona heteróloga, por una diferente función de la leptina en peces o por la menor tasa metabólica de estos vertebrados inferiores.

Londrville y Duvall (2002) han sugerido que la leptina puede ejercer su efecto en peces a una mayor escala temporal. De hecho, estos autores mantienen que, si la leptina evolucionó como una defensa contra el ayuno más que como una señal lipostática (ver Ahima y Flier, 2000), ésta debe ejercer sus efectos más lentamente, ya que éstos animales están adaptados a periodos más largos de ayuno. De ser así, los experimentos de inyección de leptina (entre dos semanas y un mes de duración) pueden no conducir a efectos significativos, precisándose de varios meses para poder detectar un efecto claro.

En base a lo expuesto anteriormente, el clonaje y secuenciación de la leptina de peces es una asignatura pendiente. Los intentos llevados a cabo hasta el momento han sido infructuosos, aunque es de suponer que los mecanismos de regulación de la ingesta en peces y mamíferos sean parecidos. Prueba de ello es la existencia de varios reguladores, ampliamente distribuidos filogenéticamente, y que interactúan con la leptina de los vertebrados superiores (Niewiarowski y cols., 2000). Estos neuropéptidos funcionan como señales anorexigénicas (inhibidoras del apetito) u orexigénicas (estimuladoras del apetito). Entre las señales anorexigénicas descritas en peces se incluyen la colecistoquinina, la bombesina, el factor liberador de la corticotropina, la serotonina y el transcrito regulado por anfetamina y cocaína. Entre las orexigénicas se encuentran el neuropéptido Y (NPY), las orexinas, la galanina y la β -endorfina (ver Lin y cols., 2000).

2.5. Señales eferentes del sistema nervioso central. Familia GH/PRL/SL

La familia GH/PRL/SL, que también incluye los lactógenos placentarios, agrupa a una serie de proteínas implicadas en funciones tan importantes como diversas: reproducción, crecimiento, diferenciación, metabolismo y osmorregulación. Los peces no son una excepción, pero presentan características propias con respecto a otros grupos taxonómicos.

2.5.1. Origen de la familia

La hormona del crecimiento (GH), la prolactina (PRL), los lactógenos placentarios (LPs) y la somatolactina (SL) son proteínas pertenecientes a una misma familia que posiblemente evolucionaron a partir de un único gen ancestral (Niall y cols., 1971; Barta y cols., 1981; Miller y Eberhardt, 1983).

Un primer modelo evolutivo, basado en el estudio de la historia de los vertebrados y cordados primitivos, sugiere que la función primaria del gen ancestral era la regulación del crecimiento somático (Specker y cols., 1984). De tal forma que las células que expresaban este gen ancestral podrían haber tenido una naturaleza paraneuronal y estarían reguladas directamente por los cambios acontecidos en el medio externo. Ello está de acuerdo con un estudio reciente en lamprea (Kawauchi y cols., 2002), donde se detecta la existencia de GH pero no de PRL. Por tanto, la GH estaría presente en todas las clases de vertebrados y sería la hormona ancestral; mientras que la PRL procedería de la duplicación de la GH durante la evolución y quedaría relegada a los gnatostomos.

El modelo alternativo presupone que el gen ancestral estaba implicado en la osmorregulación, ya que ésta es una de las funciones comunes de PRL y GH (ver Chen y cols., 1994a). Presumiblemente, los genes de PRL y GH divergieron antes de la emergencia de los metazoos. No obstante, con la identificación

de la SL de peces como una nueva proteína perteneciente a la familia GH/PRL, el origen de la misma se ha vuelto más complejo; presuponiéndose un tercer linaje fruto de duplicaciones génicas sucesivas en los primeros estadios de la evolución de los peces.

Menos confuso es el origen de los LPs, que sólo están presentes en los mamíferos, y que son sintetizados en las células sinciotrofoblásticas de la placenta (ver Talamantes y Ogren, 1988; Talamantes, 1990). Inicialmente, se propuso que los LPs habían evolucionado a partir del gen ancestral de GH/PRL/SL (Niall y cols., 1971), pero posteriores estudios han comportado la revisión de esta hipótesis de partida (Seeburg, 1982; Miller y Eberhardt, 1983; Nicoll y cols., 1986; Walker y cols., 1991). De hecho, en base a las secuencias aminoacídicas, actualmente, se asume que los LPs de los primates evolucionaron a partir del gen de GH; mientras que los LPs de los no primates procederían del linaje de la PRL (ver Goffin y cols., 1996).

2.5.2. Estructura proteica

Las hormonas de la familia GH/PRL/SL son polipéptidos secretados como prohormonas que tras la escisión proteolítica del péptido señal dan lugar a proteínas maduras de aproximadamente 196-202 aminoácidos (Chen y cols., 1994b). Tras el alineamiento de las secuencias aminoacídicas se ha podido contemplar la conservación de cuatro dominios altamente conservados (A, B, C y D) en la GH y PRL de todos los vertebrados (Kawauchi y Yasuda, 1989), así como en la SL de peces (Chen y cols., 1994b). El dominio C de PRL es el que guarda mayor grado de conservación entre las PRLs de tetrápodos, pero no entre tetrápodos y teleósteos; mientras que el dominio C de GH es específico y responsable de la actividad biológica de dicha hormona (Yamazaki y cols., 1972). En el caso de la SL, el dominio A es el más conservado. Sin embargo, cuando se comparan las secuencias de GH, PRL y SL, la región con un mayor grado de homología es el extremo C-terminal (Company y cols., 2000).

Mención a parte merecen las cisteínas, cuyo número y posición es una característica altamente conservada en los diferentes grupos taxonómicos. De hecho, estas cisteínas están implicadas en la formación de puentes disulfuro que participan en la preservación de la estructura terciaria y actividad biológica, tal y como se ha demostrado con la GH en estudios *in vivo* e *in vitro* (Lewis y cols., 1980).

La PRL de los teleósteos y la GH de todos los vertebrados estudiados hasta la fecha han conservado cuatro cisteínas implicadas en la formación de dos puentes disulfuro. Sin embargo, la PRL de tetrápodos y peces no teleósteos (esturión y pez pulmonado) posee un tercer puente disulfuro en su extremo N-terminal (Noso y cols., 1993a, b). En este caso, se trata de proteínas más largas con una inserción de 12-14 aminoácidos en el extremo N-terminal (ver Rand-Weaver y cols., 1993). Es posible que este tercer puente disulfuro pueda estar relacionado con el papel osmorregulador de la PRL. Esta idea está basada en el hecho de que en ausencia del mismo, la PRL

ovina aumenta considerablemente su actividad en bioensayos de osmorregulación en teleósteos (Doneen y cols., 1979).

La secuencia consenso de la SL también ha conservado 7 cisteínas, 6 de las cuales estarían implicadas en la formación de los tres puentes disulfuro descritos para la PRL de tetrápodos. Por consiguiente, existe una cisteína que no participa en la formación de puentes disulfuro intramoleculares, aunque en determinadas condiciones podría favorecer la formación de uniones covalentes intermoleculares que dificultan la purificación y/o expresión de proteínas nativas y recombinantes (Pendón y cols., 1996; Caldach-Giner y cols., 1998).

La GH es sintetizada de forma pulsátil por las células somatotropas de la adenohipófisis (Frohman y Jansson, 1986; Hall y cols., 1986). Esta proteína sufre una serie de modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales (desaminación, acilación, glicosilación, proteólisis) que dan lugar a una notable heterogeneidad de formas circulantes que, a su vez, pueden existir tanto en formas monoméricas como en agregados o polímeros. En humanos existen dos formas mayoritarias, una de 22 kDa y otra de 20 kDa, generadas por procesamiento alternativo del ARNm precursor (Lewis y cols., 1980). La forma de 20 kDa es idéntica a la de 22 kDa, excepto en una delección entre los aminoácidos 32-46 (Cooke y cols., 1988). La isoforma de 22 kDa es la más abundante en circulación.

La PRL se sintetiza en las células lactotropas de la adenohipófisis (Emmart y Mossakowski, 1967; Asa y cols., 1982; Cambre y cols., 1986). En mamíferos, existen variantes de PRL producidas por escisión proteolítica después de la traducción de la PRL de 23Kb, dando lugar a isoformas de 22, 16 y 14 kDa (Ben-Jonathan y cols., 1996; Clapp y cols., 1993; 1994). La isoforma de 16 kDa tiene actividad antiangiogénica e inhibe el crecimiento de las células endoteliales capilares (Clapp y cols., 1993; Clapp y Weiner, 1992; Mitra, 1980). Existen otros tipos de modificaciones post-transcripcionales (fosforilación y glicosilación) cuyo papel fisiológico no se conoce a fondo, pero posiblemente producen isoformas de actividad biológica reducida (ver Ben-Jonathan y cols., 1996; Freeman y cols., 2000).

En varios teleósteos (salmón chum, carpa común, anguila japonesa, tilapia de Mozambique y tilapia del Nilo), se han detectado dos formas de PRL (ver Manzon, 2002). En el caso de la tilapia, se ha caracterizado una forma larga (PRL₁₈₈) y otra corta (PRL₁₇₇), siendo la estructura de la PRL₁₈₈ la que se habría conservado a lo largo de la evolución de los vertebrados (Yamaguchi y cols., 1988). Es más, el patrón de expresión de las PRLs de tilapia varía durante el desarrollo (Ayson y cols., 1994) y en función de los cambios en las condiciones ambientales (Borski y cols., 1992; Yada y cols., 1994; Yoshikawa-Ebesu y cols., 1995; Auperin y cols., 1994). Es de reseñar que el cociente PRL₁₇₇/PRL₁₈₈ es menor en peces adaptados a agua dulce que en los adaptados a un medio marino (Borski y cols., 1992; Yoshikawa-Ebesu y cols., 1995).

La somatolactina es sintetizada en células de la *pars intermedia* de la hipófisis de peces (Rand-Weaver y cols., 1991), que son PAS negativas (tinción con el ácido peryódico de Schiff) en salmónidos. Por el contrario, en hipófisis de lenguado (Rand-Weaver y cols., 1991), dorada (Cavari y cols., 1995) y lubina (Company y cols., 2000; Vega-Rubín de Celis y cols., 2003) coexisten formas glicosiladas y no glicosiladas de SL.

A modo de resumen la Tabla 2.3 muestra el grado de conservación de las proteínas de la familia GH/PRL/SL a lo largo de la evolución de los peces. Es de reseñar la mayor conservación de la SL con respecto tanto a GH como a PRL.

Tabla 2.3. Identidad aminoacídica entre las proteínas maduras de GH, PRL y SL de peces. La existencia de variantes para alguna de las proteínas se indica entre paréntesis.

Tabla 2.4. Referencias o números de acceso a GenBank de las secuencias utilizadas en la Tabla 2.3.

2.5.3. Organización genómica

Al igual que en mamíferos, el gen de la PRL de peces ha conservado a lo largo de la evolución cinco exones y cuatro intrones. Hasta la fecha, dicho patrón se ha puesto de relieve en una notable variedad de especies de peces: carpa (Chen y cols., 1991), salmón real (Xiong y cols., 1992), tilapia (Swennen y cols., 1992), pez gato (Tang y cols., 1993) y dorada (Astola y cols., 2003). Habiéndose propuesto dos linajes evolutivos: un linaje tetrápodo y otro teleósteo (Kawauchi y cols., 1988; 1989). Según este modelo, los peces de lóbulo fino (Crossopterygii y Dipnoi) son parte del linaje que dio lugar a los tetrápodos, mientras que los peces de rayas finas (Polypteri, Chondrostei y Holostei) son parte del linaje que dio lugar a los teleósteos (ver Manzon, 2002).

La organización genómica de la SL solamente se ha estudiado en salmón keta (Takayama y cols., 1991) y dorada (Astola y cols., 2004), siendo de reseñar la conservación del patrón de cinco exones y cuatro intrones. Sin embargo, el tamaño de estos intrones es más parecido al de la PRL de mamíferos que al de la PRL de peces. Además, en el caso de la dorada, hay evidencias de un segundo gen para dicha proteína (Herrero-Turrión y cols., 2003; Astola y cols., 2003a).

Al igual que en mamíferos (Parks y cols., 1982; Hirt y cols., 1987), el gen de la GH en Cipriniformes (Chiou y cols., 1990; Ho y cols., 1991; Hong y Schartl, 1993) y Siluriformes (Tang y cols., 1993) conserva la estructura de cinco exones y cuatro intrones. Sin embargo, en salmónidos (Agellon y cols., 1988; Johansen y cols., 1989; Du y cols., 1993), tilapia (Ber y Daniel, 1992; 1993), platija (Tanaka y cols., 1995), barramundi (Yowe y Epping, 1995) y seriola (Ohkubo y cols., 1996) hay un intrón adicional dentro del último exón.

Este quinto intrón divide el árbol filogenético en dos grupos distintos (ver Venkatesh y Brenner, 1997). De hecho, los miembros del superorden Ostariophysii poseen sólo cuatro intrones, mientras que los peces de los superórdenes Protacanthopterygii y Acanthopterygii poseen cinco. Dado que

los genes de GH en los tetrápodos tienen sólo cuatro intrones y que se separaron de forma prematura del linaje de los teleósteos, es posible que el quinto intrón fuese adquirido por un ancestro común a los superórdenes Protacanthopterygii y Acanthopterygii, después de que éste divergiera del superorden Ostariophysii. Otra posibilidad es que el ancestro tuviera los cinco intrones, y el quinto intrón se hubiese perdido en el linaje que dio lugar a Ostariophysii y tetrápodos.

2.5.4. Aspectos funcionales

Las actividades biológicas de GH y PRL están mediadas por receptores específicos de membrana con una amplia distribución en diferentes tejidos y órganos (ver Kelley y cols., 1991, 1993; Goffin y Kelley, 1996). El receptor de GH (RGH) se ha venido considerando como un receptor específico (Tsushima y Friesen, 1973; Leung y cols., 1987). Sin embargo, el receptor de PRL (RPRL) es capaz de unirse tanto a PRL como a LPs (Shiu y cols., 1973; Boutin y cols., 1988; 1989; Edery y cols., 1989). Recientemente, se ha propuesto para los LPs un receptor heterodimérico formado por RPRL-RGH (Herman y cols., 2000), aunque falta por establecer la importancia biológica de este hecho.

La GH de primates también es capaz de unirse a los RPRLs por lo que, en estos animales, la GH ejercería una acción lactogénica (ver Goffin y Kelley, 1996). Sin embargo, este no parece ser el caso de los peces (Prunet y cols., 2000; Rouzic y cols., 2001; Wong y cols., 2002).

Hasta la fecha no se han caracterizado los receptores de la SL de peces, pero directa o indirectamente hay evidencias de la participación de la SL en diferentes funciones: reproducción (Planas y cols., 1992; Rand-Weaver y cols., 1992; 1995; Rand-Weaver y Swanson, 1993; Olivereau y Rand-Weaver, 1994); equilibrio ácido-base (Kakizawa y cols., 1996); adaptación al color del fondo (Zhu y Thomas, 1995, 1996, 1997, 1998); esmoltificación (Rand-Weaver y Swanson, 1993); regulación del metabolismo del calcio (Kakizawa y cols., 1993, 1995), fosfato (Kakizawa y cols., 1995; Lu y cols., 1995) y sodio (Zhu y Thomas, 1995); inmunomodulación (Calduch-Giner y cols., 1999) y homeostasis energética (Company y cols., 2001; Vega-Rubín de Celis, 2003).

2.5.4.1. Características de la familia receptores citoquina clase I

Los receptores lactogénicos (RPRL) y somatogénicos (RGH) han sido incluidos en la superfamilia de receptores citoquina (Bazan, 1989; Cosman y cols., 1990). Los receptores citoquina de clase I, además de RPRL y RGH, engloban los receptores de eritropoyetina (EPO), factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interleuquina (IL)-2, -3, -4, -5, -6, -7, -9, -11, -13 y -15, factor inhibidor de la leucemia (LIF), factor neurotrófico ciliar, oncostatina M, señal de transducción gp130 y el receptor de leptina (Tartaglia y cols., 1995). Los receptores citoquina clase II incluyen los receptores de interferón (IFN) e IL-10 (ver Cosman y cols., 1990; Bazan, 1990; Kaczmarek y cols., 1991; Nakamura y cols., 1992; Cosman, 1993).

Los motivos comunes en los diferentes miembros de la familia de receptores de citoquina de clase I residen en la región extracelular e intracelular, y han sido detalladamente descritos en diferentes revisiones (ver Moutoussamy y cols., 1998; Bole-Feysot, 1998; Kopchick y Andry, 2000; Manzon, 2002; Goffin y cols., 2002).

En la región extracelular están conservados dos puentes disulfuro que son los que confieren al receptor las propiedades funcionales, así como los motivos estructurales para el transporte celular y un correcto plegamiento. Cerca de la región transmembrana también está conservada una secuencia de cinco aminoácidos -dominio WS (Trp-Ser- indeterminación -Trp-Ser) - que es sustituido en el RGH por el dominio (F/Y)GEFS (Tyr/Phe-Gly-Glu-Phe-Ser).

En la porción citoplasmática hay dos regiones conservadas -Dominios 1 y 2- que son importantes para la transmisión de la señal intracelular (VanderKuur y cols., 1994; Ihle, 1995), representada de forma esquemática en la Figura 2.5. El dominio 1 tiene mayor grado de conservación que el 2, y está formada por una secuencia rica en prolina y un grupo previo de aminoácidos hidrófobos. El dominio 2 está formado por

aminoácidos hidrófobos, seguidos de uno o dos aminoácidos cargados positivamente.

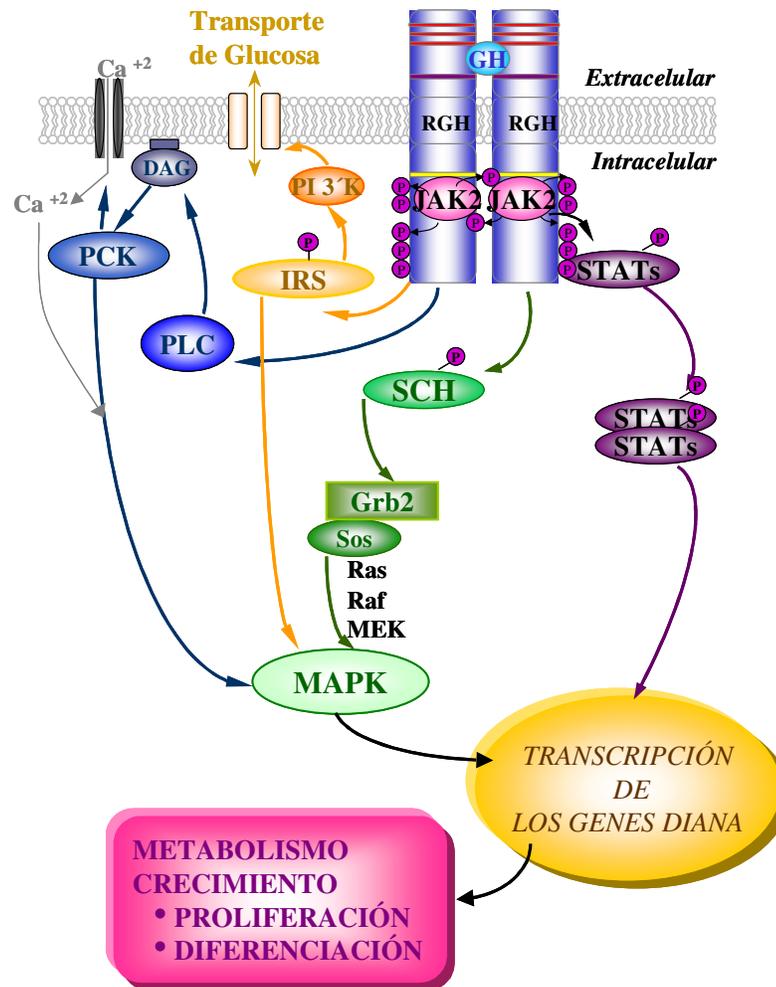


Figura 2.5. Representación esquemática de los principales mecanismos de transmisión de la señal intracelular de GH, tomando al RGH como modelo de receptor citoquina clase I. (modificado de Kopchick y Andry, 2000 y Herrington y Carter-Su, 2001). Abreviaturas: GH, hormona del crecimiento; RGH, receptor de GH; JAK2, janus quinasa 2; STATs, proteína transductora de señal y activadora de la transcripción; IRS, sustratos del receptor de insulina; PI3'K, 3'-fosfatidilinositol quinasa; MAPK, proteína quinasa activada por mitógeno; PLC, fosfolipasa C; DAG, diacilglicerol; PCK, proteína quinasa C; P, fosfato.

2.5.4.2. Organización genómica de los receptores de GH y PRL en vertebrados superiores. Proteínas de transporte y formas truncadas

En la actualidad, se conoce la estructura genómica completa del RGH en dos especies de mamíferos: hombre (Godowski y cols., 1989) y ratón (Zhou y cols., 1994; Edens y cols., 1994; Menon y cols., 1995) (ver Fig. 2.6).

El gen RGH humano (hRGH) posee varios exones que codifican para la región 5' no traducida (5'UTR), además de nueve exones que codifican para el péptido señal, proteína madura y la región 3' no traducida (3'UTR)- exones del 2 al 10-. El gen del RGH de ratón (rRGH) sólo posee dos exones para la región 5'UTR, seguidos de otros 11 exones (péptido señal, proteína madura, 3'UTR). Los exones del 2 al 10 son homólogos en tamaño y secuencia a los exones del hRGH; pero existen dos exones presentes en ratón que no tienen sus homólogos en humanos, los exones 4B y 8A. El exón 4B codifica para una secuencia de 8 aminoácidos de la región extracelular que está presente en todos los transcritos. El exón 8A codifica para la cola hidrofóbica y la región 3'UTR de la proteína de transporte de GH (rGHBP). Cuando este exón es incluido en el procesamiento alternativo, los exones posteriores son eliminados debido a una señal de poliadenilación cerca del final del exón 8A. Cuando el procesamiento alternativo va directamente del exón 7 al 8, se genera la forma anclada a la membrana (Zhou y cols., 1994).

La estructura genómica del RGH de pollo sólo se ha caracterizado parcialmente (Oldman y cols., 1993), siendo de reseñar el menor tamaño de los intrones y la carencia del exón 3, que no parece crítico para la interacción entre el ligando y el receptor (Urbanek y cols., 1993; Sobrier y cols., 1993).

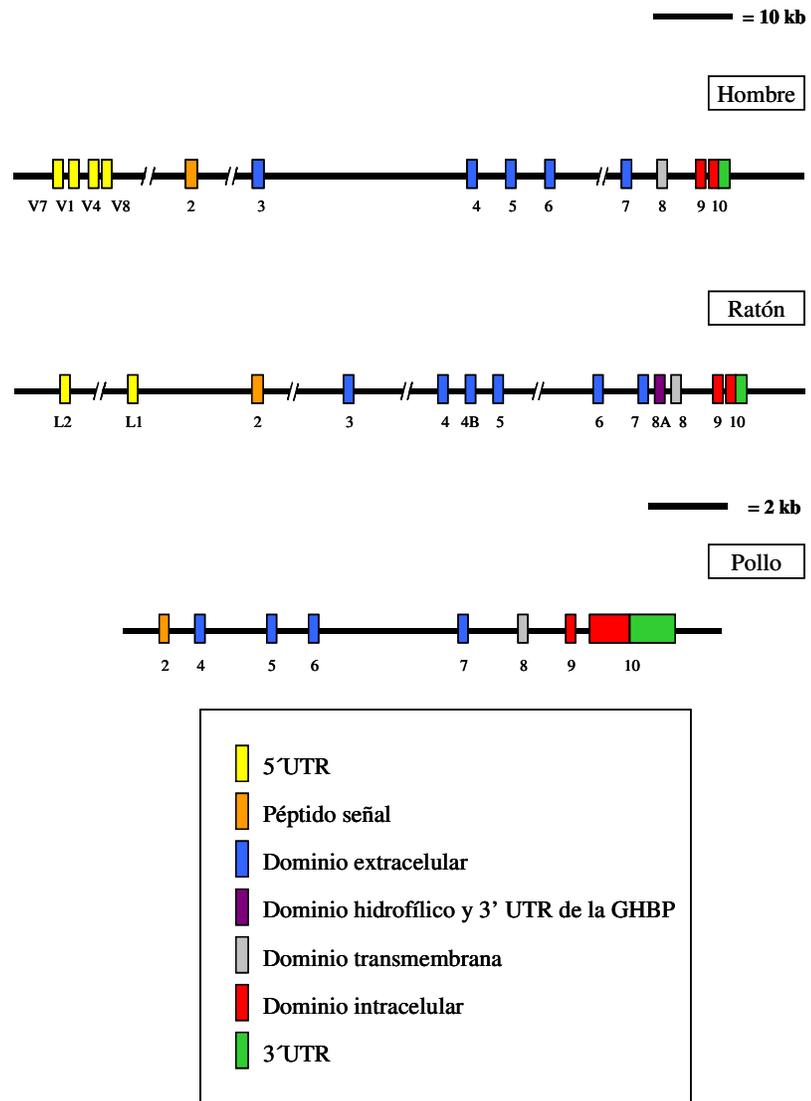


Figura 2.6. Estructura y tamaño del gen del RGH en hombre, ratón y pollo (modificado de Edens y Talamantes, 1998).

El gen del RPRL en mamíferos está bajo el control de un complejo sistema de regulación transcripcional. En ratas hay tres promotores (PI, PII, PIII) que son utilizados de forma diferente según el tejido para la transcripción de exones no codificantes (E1₁, E1₂, E1₃) (Moldrup y cols., 1996; Hu y cols., 1996; 1997; 1998; 1999). El PI de rata es específico de las gónadas y dependiente de SF-1 (Hu y cols., 1996; 1997); el PII es específico del hígado y está activado por HNF4 (Hu y cols., 1996; Moldrup y cols., 1996), mientras que el PIII se expresa en todos los tejidos diana de PRL y está activado por C/EBPβ y Sp1 (Hu y cols., 1998) (Fig. 2.7).

En el ratón, el PIII se encuentra bien conservado, pero el PI no es operativo debido a una alteración de dos bases en el sitio de unión a SF-1 (Hu y cols., 1997; 1998). Un nivel de complejidad similar ha sido descrito recientemente en tejidos humanos (Hu y cols., 2002).

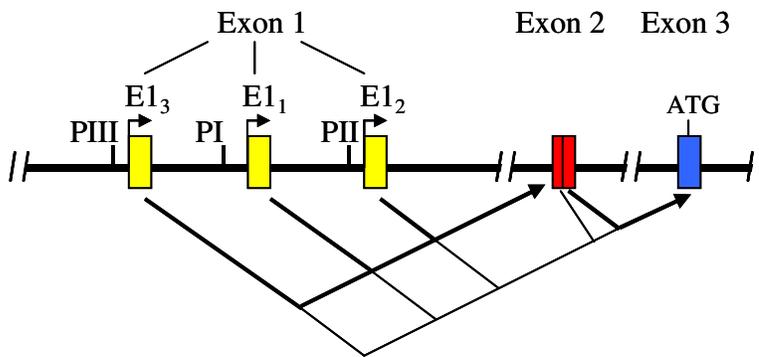


Figura 2.7. Organización genómica de la región 5' UTR del RPRL de rata (modificado de Hu y cols., 1998). El patrón de procesamiento alternativo está ilustrado mediante líneas y flechas que conectan distintos exones. Las líneas gruesas indican la vía mayoritaria de procesamiento y las delgadas la vía alternativa. Los símbolos // indican clones genómicos no solapantes entre exones adyacentes.

La complejidad de la regulación transcripcional también se pone manifiesto a nivel de mensajeros: 1) transcritos con heterogeneidad en el extremo 5'UTR, 2) transcritos que codifican para deleciones o truncamientos en la región extracelular, y 3) transcritos que codifican para deleciones o truncamientos en los dominios transmembrana o intracelular (ver Bole-Feysot y cols., 1998; Edens y Talamantes, 1998). No obstante, las más importantes, desde un punto de vista fisiológico, son las que codifican directamente mensajeros de proteínas de transporte o las que dan lugar a formas truncadas en la región intracelular.

Las proteínas de transporte (GHBP o PRLBP) contienen la región extracelular del receptor anclado a membrana. Las formas truncadas pueden contener parte de la región intracelular, pero son más susceptibles que las formas largas a la acción proteolítica, que acaba liberando al medio extracelular y al torrente circulatorio las proteínas de transporte de GH y PRL (Dastot y cols., 1996; Ross y cols., 1997). En cualquier caso, los mecanismos de generación de estas proteínas de transporte y formas truncadas varían de acuerdo con la especie analizada (ver Fig. 2.8).

En el caso del ratón, la GHBP está codificada por un mensajero cuyos primeros 300 aminoácidos son idénticos al mensajero que codifica para la forma larga (Smith y cols., 1989) (Fig. 2.8B). A partir de este punto, le sigue una secuencia divergente que codifica para 27 aminoácidos hidrofílicos y una región 3'UTR. Dicha divergencia se debe a que en lugar de procesar el exón 8, que da lugar al RGH, se transcribe el exón 8A (ver Fig. 2.6). En rata, la GHBP también se origina a partir de un mensajero que codifica para la región extracelular del RGH, pero que difiere en 9 aminoácidos antes de llegar a la región transmembrana (Zhou y cols., 1996). A partir de este punto, le siguen 17 aminoácidos divergentes que son codificados por un exón alternativo.

El caso del conejo es diferente, puesto que la GHBP es generada por escisión proteolítica del receptor, en la posición aminoacídica 197 (Leung y cols., 1987; Sotiropoulos y cols., 1993; Harrison y cols., 1995). El mono es la única especie donde

se han visto ambos mecanismos de generación de GHBP, proteólisis y procesamiento alternativo (Martini y cols., 1997). En esta especie, el ARNm de la GHBP es igual al del RGH en los primeros 784 aminoácidos, pero 8 pb antes de la región transmembrana, contiene una secuencia divergente de 236 pb.

Se calcula que aproximadamente el 60% de la GH circulante está unida a las GHBP, por lo que se ha atribuido a estas proteínas una notable importancia fisiológica (Baumann y cols., 1988). De hecho, *in vivo* la GHBP aumenta la vida media de la GH plasmática, actuando a modo de reserva y prolongando su actividad. Sin embargo, *in vitro* se ha visto que la GHBP actúa compitiendo con el RGH por la unión al ligando, inhibiendo la transmisión de la señal intracelular de la GH (Mannor y cols., 1991). No obstante, este efecto antagónico de las GHBP no se ha observado *in vivo*.

En el hombre, existen dos formas truncadas de RGH generadas por procesamiento alternativo del mensajero (Lewin, 1994; Ross y cols., 1997; Amit y cols., 1997). En ambos casos, las regiones extracelular y transmembrana son idénticas a las descritas para la forma larga del receptor. Los 3 primeros aminoácidos de la región intracelular también se conservan, pero a partir de este punto la secuencia es divergente (ver Fig. 2.8B). Una de las formas truncadas se genera por un sitio aceptor alternativo dentro del exón 9, mientras que la otra se debe a una delección completa de este mismo exón. La secuencia divergente en el primer caso consiste en 6 aminoácidos, mientras que es de 4 en el segundo. Estas formas truncadas, al igual que otras descritas en otras especies, inhiben la acción de la GH al competir por el ligando sin desencadenar ninguna señal intracelular, al carecer de las proteínas de unión de los sistemas implicados en la misma.

En el caso de los receptores de PRL, también se han descrito formas truncadas y proteínas de transporte (ver Freeman y cols., 2000). El mecanismo de generación de las PRLBP no se conoce (Bole-Feysot y cols., 1998), a pesar de que en rata se ha visto que su secuencia contiene los primeros 206 aminoácidos de la región extracelular de la forma larga (Berwaer y cols., 1994) (ver Fig. 2.8A). En esta misma especie, existen tres formas

truncadas de RPRL: la isoforma larga (591 aminoácidos, igual que la de humanos), la intermedia (o Nb2, de 393 aminoácidos) (Ali y cols., 1991) y la corta (291 aminoácidos). Aunque las isoformas varían en longitud y composición de sus regiones citoplasmáticas, mantienen constantes las regiones extracelulares y de membrana (Kelley y cols., 1991; Lesueur y cols., 1991; Bole-Feysot y cols., 1998). El mecanismo por el cual se originan es a través de los sitios alternativos de inicio de la transcripción (promotores alternativos), así como por el procesamiento alternativo de exones codificantes y no codificantes (Hu y Dufau, 1991; Hu y cols., 1998).

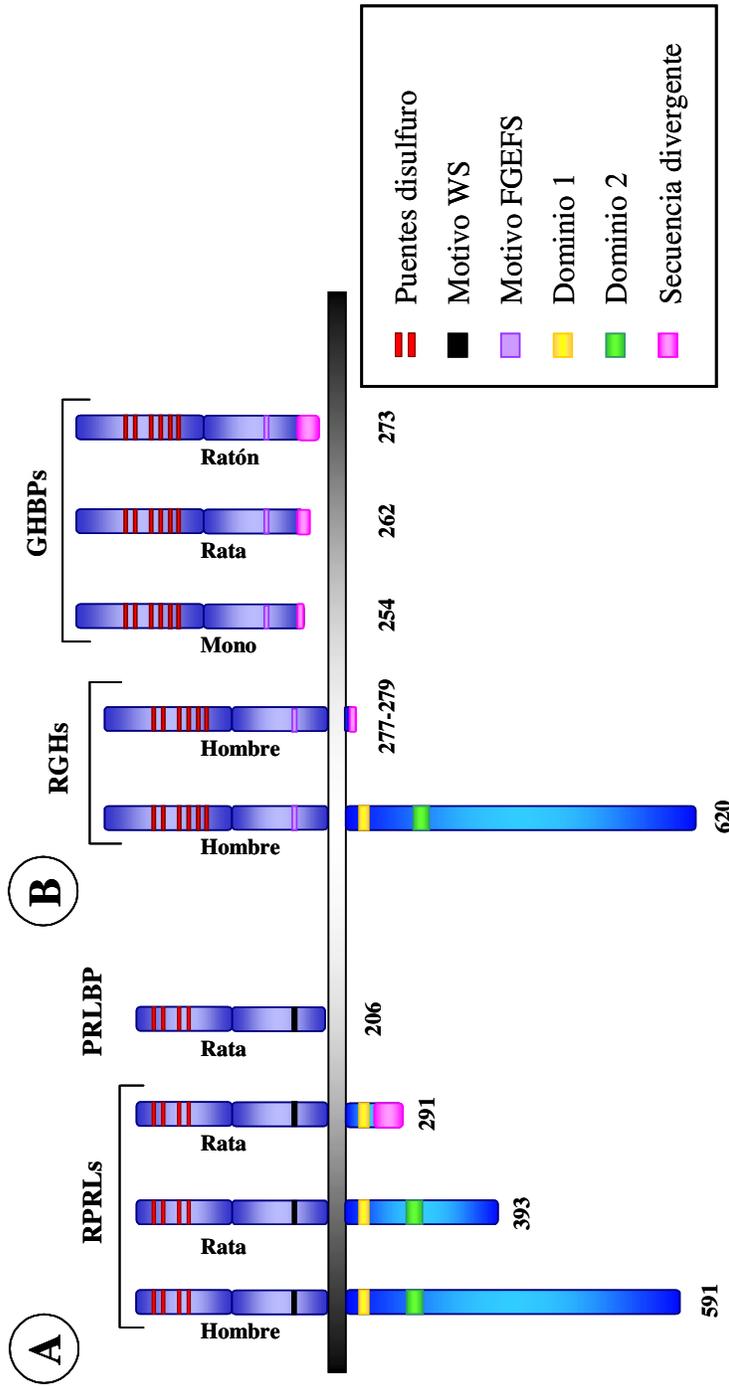


Figura 2.8. Representación esquemática de los distintos tipos de receptores y proteínas de transporte de PRL (A) y GH (B) en mamíferos. En azul oscuro está representada la región extracelular y en azul claro la región intracelular. El número inferior indica la longitud de la proteína.

2.5.4.3. Caracterización molecular de los receptores de GH y PRL en peces

En 1995, se clonó y secuenció el RPRL de tilapia (Sandra y cols., 1995). Posteriormente, también se han clonado y secuenciado los RPRLs de carpa dorada (Tse y cols., 2000), trucha arco iris (Le Rouzic y cols., 2001), dorada (Santos y cols., 2001) y platija japonesa (Higasimoto y cols., 2001). Todos ellos codifican para una proteína madura de aproximadamente 600 aminoácidos de longitud y con los mismos motivos estructurales que los RPRLs de mamíferos (ver Manzon, 2002) (Fig. 2.9). La mayor cantidad de identidades aminoacídicas se encuentra en la región extracelular, donde dos pares de cisteínas están conservadas en todos los RPRLs. Sin embargo, existen diferencias en las secuencias de los motivos WS. El motivo WS de los RPRLs de peces es altamente homólogo a la secuencia de mamíferos, pero hay una sustitución conservativa (de Ser a Thr) en la quinta posición del RPRL de carpa dorada (Tse y cols., 2000) y dorada (Santos y cols., 2001). Asimismo, todos los RPRLs de peces estudiados hasta la fecha carecen del sitio de N-glicosilación que está presente en los RPRLs de mamíferos entre la segunda y tercera cisteína. También es importante señalar que el RPRL de dorada es entre 70 y 100 aminoácidos más corto que otros receptores de PRL, requiriéndose para su correcto alineamiento diferentes deleciones en su región citoplasmática.

En el 2001, se clonaron y secuenciaron las secuencias del RGH de rodaballo (Calduch-Giner y cols., 2001) y carpa dorada (Lee y cols., 2001). Posteriormente, también se han clonado y secuenciado los RGHs de: halibut (AB058418), carpa herbívora (AY283778), pez gato (AY336104) y un espárido de distribución asiática, la chopa (Tse y cols., 2003). El grado de homología con los RGHs de vertebrados superiores es del 30-40%. Las secuencias más divergentes son las de salmónidos -salmón plateado (GenBank AF403539 y AF403540) y salmón japonés (AB071216)- que sólo conservan 4 de las 6 Cys extracelulares implicadas en la formación de puentes disulfuro.

En el caso del rodaballo, además de la forma larga, existe una forma truncada de 325 aminoácidos de longitud con idéntica secuencia en la región extracelular y transmembrana. En la región intracelular, los primeros 28 aminoácidos son también idénticos al receptor completo. Sin embargo, en este punto aparece una secuencia divergente de 21 aminoácidos (Calduch-Giner y cols., 2001) (ver Fig. 2.9). En la chopa existe también una variante, pero con una inserción de 93 pb después del dominio 2 en la región intracelular - posición aminoacídica 387- (Tse y cols., 2003).

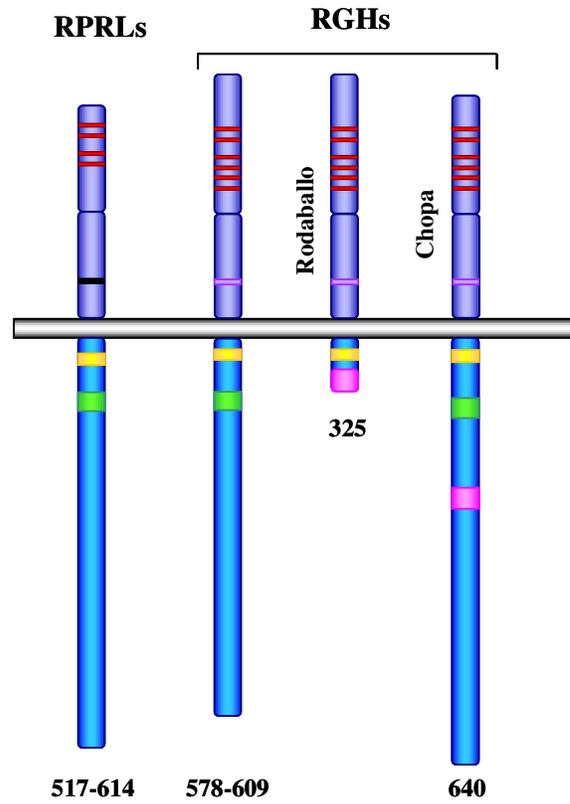


Figura 2.9. Representación esquemática de los receptores de PRL y GH en peces. En azul oscuro está representada la región extracelular y en azul claro la región intracelular. El número inferior indica la longitud de la proteína.

2.5.4.4. Eje somatotrópico: GH-IGF-I

Se han descrito un gran número de actividades biológicas tanto para la GH como para la PRL. En todos los vertebrados, la GH está implicada en la regulación del crecimiento somático (Wallis, 1988; Lewis, 1992), pero además, en peces, se ha relacionado con la osmorregulación –adaptación al medio marino- (Bolton y cols., 1987; Collie y cols., 1989; Sakamoto e Hirano, 1991). La PRL es también una proteína muy versátil, con más de 300 funciones que se pueden englobar en varias categorías: osmorregulación, crecimiento y desarrollo, metabolismo, comportamiento y reproducción (ver Bole-Feysot y cols., 1998). Ambas hormonas están implicadas en la modulación de la respuesta del sistema inmunitario (ver Harris y Bird, 2000), tanto en mamíferos (Edwards y cols., 1992; Warwick-Davies y cols., 1995; Ortega y cols., 1996), como en peces (Calduch-Giner y cols., 1995, 1997; Narnaware y cols., 1997; 1998). Ello comporta un cierto grado de solapamiento, aunque la función por excelencia de la GH se ejerce sobre el crecimiento y la de la PRL sobre la regulación osmótica (adaptación a un medio dulceacuícola).

La acción de la GH sobre el crecimiento es dicotómica, puesto que tiene una acción tanto lipolítica como anabólica. La acción lipolítica (independiente de IGFs) está potenciada en estados catabólicos y de malnutrición, facilitando la utilización de las grasas como fuente de energía. La acción anabólica *per se*- síntesis proteica- está mediada, al menos en parte, por las IGFs que se encuentran altamente conservadas en todos los vertebrados.

Inicialmente, la hipótesis somatomédica contemplaba una acción de la GH sobre el hígado para estimular la síntesis y liberación al torrente circulatorio de IGFs (ver Daughaday y Rotwein, 1989). Tras lo cual, las IGFs estimularían el crecimiento del hueso y del músculo esquelético (Fig. 2.10A). El descubrimiento de la producción local de IGFs amplió el modelo inicial de la hipótesis somatomédica, al incluir una función autocrina-paracrina frente a la clásica función endocrina de las IGFs (Fig. 2.10B). En este segundo modelo, además de la acción

de la GH sobre el hígado para la producción de IGFs, existe una producción extrahepática que puede, en mayor o menor grado, ser también dependiente de GH. Esta situación comporta el plantearse la contribución relativa de las IGFs circulantes, de origen mayoritariamente hepático, frente a las IGFs de acción autocrina/paracrina (ver Le Roith y cols. 2001a, b). De hecho, en un modelo de ratón *knock-out* de IGF hepática, se observa un descenso en los niveles circulantes de IGFs, pero los efectos sobre el crecimiento son menos importantes de lo que cabría esperar (Sjogren y cols., 1999; Yakar y cols., 1999).

Una complicación adicional es la producción extrahipofisaria de GH. En dorada, ésta se ha puesto de relieve en el riñón anterior (Calduch-Giner y Pérez-Sánchez, 1999), el equivalente a la médula ósea de mamíferos. También se ha demostrado una capacidad proliferativa de la GH en cultivos de leucocitos, así como una activación de la actividad fagocítica (Calduch-Giner y cols., 1997) modulada por el estado parasitario del animal (Muñoz y cols., 1998). Es más, el patrón de distribución de los receptores de GH en la línea leucocítica y eritroide de dorada indica una mayor abundancia en las formas inmaduras o poco diferenciadas, lo que sugiere una acción importante sobre las mismas en los primeros estadios, actividad que puede estar mediada o no por las IGFs (Calduch-Giner y cols., 1995).

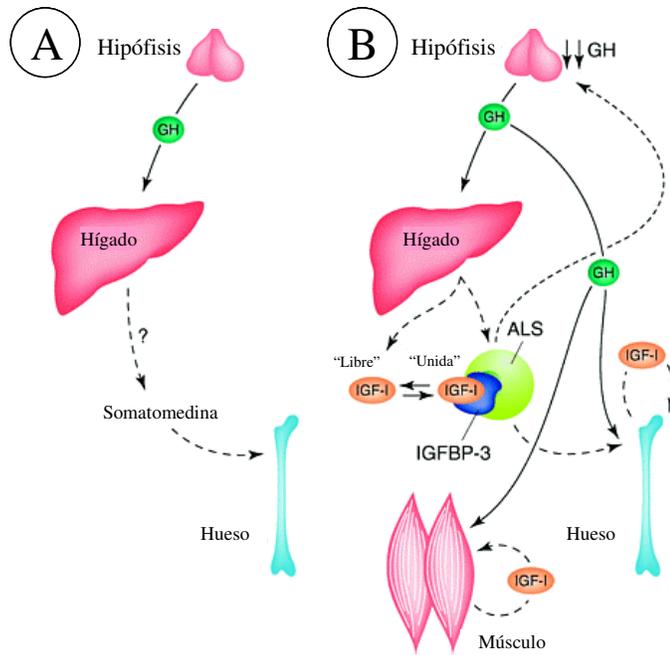


Figura 2.10. Evolución de la hipótesis somatomédica (modificado de Le Roith y cols., 2001a, b). ALS: subunidad ácido lábil, no presente en peces.

2.5.4.4.1. Estructura y evolución de IGFs

La similitud de secuencias entre IGFs e insulina hace suponer la existencia de un gen ancestral común (ver Kelley y cols., 2000). Estos péptidos son sintetizados como prohormonas y difieren en su proceso de maduración, dando lugar a una estructura distinta con funciones también propias (ver Tabla 2.3).

La insulina consta de dos cadenas (A y B), unidas por dos puentes disulfuro e inicialmente separadas por el dominio C que es eliminado en el proceso de maduración de la proteína. Las IGFs están constituidas por una sola cadena polipeptídica con 4 dominios (B, C, A y D), seguidos por el dominio E en el extremo C-terminal, el cual no está presente en la proteína madura.

Los dominios B y A de las IGFs son homólogos a los dominios B y A de la insulina, mientras que el dominio C es estructuralmente análogo al péptido C de la proinsulina, aunque con un bajo grado de conservación de la secuencia aminoacídica (ver Shuldiner y cols., 1991). El proceso proteolítico para la eliminación de los dominios C (insulina) y E (IGFs) también es muy parecido (ver Foyt y Roberts, 1991); y, aunque inicialmente se había pensado que estos dominios carecían de actividad biológica, el dominio E de las IGFs posee cierta actividad mitogénica en trucha (Tian y cols., 1999).

Cuando se comparan entre sí las IGFs, los dominios más conservados son el B y el A (ver Kelley y cols., 2000). Evolutivamente es importante reseñar que la IGF-I y la IGF-II están presentes en teleósteos y elasmobranquios, pero no en los gnatóstomos, en donde se ha detectado una única forma de IGF (Chan y cols., 1990; Nagamatsu y cols., 1991; McRory y Sherwood, 1997).

Tabla 2.4. Aspectos estructurales y funcionales de IGF-I, IGF-II e insulina en vertebrados superiores (modificado de Thissen y cols., 1994).

	IGF-I	IGF-II	Insulina
Peso molecular	7649 daltons	7471 daltons	5734 daltons
Estructura	1 cadena; el dominio E es eliminado	1 cadena; el dominio E es eliminado	2 cadenas; el dominio C es eliminado
Origen	Principalmente hígado; tejidos extrahepáticos	Hígado y tejidos extrahepáticos	Células β de los islotes pancreáticos
Secreción	Liberación baja y constante	Liberación baja y constante	Liberación pulsátil
Tasa de producción	10 mg/día	13 mg/día	2 mg/día
Formas circulantes	La mayoría unida a IGFbps	La mayoría unida a IGFbps	Libre
Proteínas de transporte (IGFBPs)	6 formas distintas	6 formas distintas	Ninguna
Concentraciones en adultos	200 ng/ml	700 ng/ml	0,5-5 ng/ml
Variaciones diarias	Poca o ninguna	Poca o ninguna	Sí
Vida media	12-15 h	15 h	10 min
Afinidades por los receptores ^a	Tipo 1 > 2 >> Ins.	Tipo 2 > 1 >> Ins.	Ins > tipo 1
Acción	Endocrina, auto/paracrina	Endocrina, auto/paracrina	Endocrina
Dependencia de GH	Alta	Débil	Ninguna

^a Receptores: tipo 1, receptor de IGF tipo 1; tipo 2, receptor de IGF tipo 2; Ins., receptor de insulina.

Hasta la fecha los ADNc de IGF-I se han clonado en numerosas especies de peces, mostrando el análisis de la secuencia consenso un alto grado de conservación a lo largo de la evolución de los peces (Tabla 2.5).

La IGF-II también se ha clonado en varias especies de peces, entre las que se incluyen la dorada (Duguay y cols., 1996), barramundi (Collet y cols., 1997), trucha arco iris (Shamblott y cols., 1998), tilapia (Chen y cols., 1998), un pez japonés llamado *pufferfish* (Edwards y cols., 1998) y un escorpaeniforme llamado *daddy sculpin* (Loffing-Cueni y cols., 1999). Por el momento no hay evidencias de un procesamiento alternativo de los mensajeros de IGF-II en peces. Sin embargo, al igual que en mamíferos, se han descrito diferentes variantes de mensajeros de IGF-I que divergen solamente en el dominio E, dando lugar a diferentes pro-hormonas.

En salmónidos, se han descrito 4 formas de pro-IGF-I, denominadas pro-IGF-I Ea-1, Ea-2, Ea-3 y Ea-4 (Shamblott y Chen 1993; Chen y cols., 1994a, b). Las cuatro formas se encuentran presentes en el hígado, pero los niveles de Ea-1 y Ea-3 aumentan significativamente en respuesta a la GH. Los tejidos extrahepáticos expresan mayoritariamente la forma Ea-4 (Duguay y cols., 1994). En la carpa común sólo se ha encontrado el transcrito Ea-2 en el hígado (Liang y cols., 1996; Hashimoto y cols., 1997), mientras que la forma Ea-4 es la más abundante en el hígado de la chopa (Chen y cols., 1998). En el caso de barramundi y dorada, se han descrito dos formas (Ea-4, Ea-2). En barramundi, el transcrito Ea-2 es el más abundante en tejidos extrahepáticos (Ståhlbom y cols., 1999). En dorada ocurre lo contrario, es el transcrito Ea-4 el que se expresa de forma mayoritaria en tejidos extrahepáticos. Un patrón similar se ha descrito recientemente en lubina (ver Fig. 2.11).

Tabla 2.5. Identidad aminoacídica entre IGF-I de vertebrados superiores e inferiores.

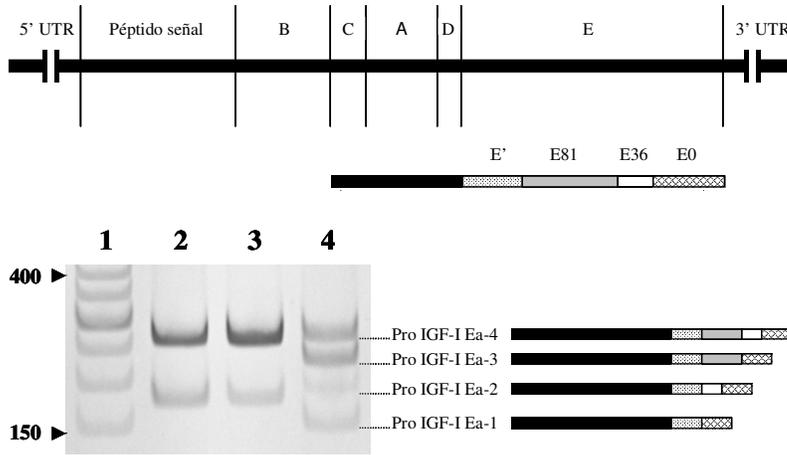


Figura 2.11. Representación esquemática del ADNc de IGF-I. En la parte inferior, gel de poliacrilamida teñido con plata que muestra los diferentes tipos de prohormonas de IGF-I hepáticas en 2) lubina, 3) dorada, y 4) trucha. La carrera 1 corresponde a los marcadores de peso molecular (Vega-Rubín de Celis y cols., en preparación)

2.5.4.4.2. Receptores y proteínas de transporte de IGFs

IGF-I e IGF-II interaccionan con receptores específicos, tipo I y II, que difieren en su secuencia aminoacídica, estructura secundaria y especificidad de unión al ligando (ver Jones y Clemmons, 1995). El receptor de tipo I tiene una estructura heterotetramérica que es homóloga a la del receptor de insulina y presenta una alta afinidad por la IGF-I. El receptor tipo II es idéntico al receptor manosa 6 fosfato dependiente de catión con una baja afinidad por la IGF-I y ninguna por la insulina.

En peces parece no cumplirse esta situación de dos receptores para las IGFs y otro distinto para la insulina (Gutiérrez y cols., 1993; 1995; Parrizas y cols., 1995; Leibush y cols., 1996). Recientemente, se han descrito las secuencias totales o parciales de los receptores IGF-I/insulina en rodaballo (Elies y cols., 1996; 1999) trucha (Elies y cols., 1996; Greene y Chen, 1999), dorada (Perrot y cols., 2000), pez cebra (Ayaso y cols., 2002) y platija japonesa (Nakao y cols., 2002); las cuales son similares a la de los receptores de mamíferos. Sin embargo, son necesarios estudios más detallados para comprender la evolución de estos receptores.

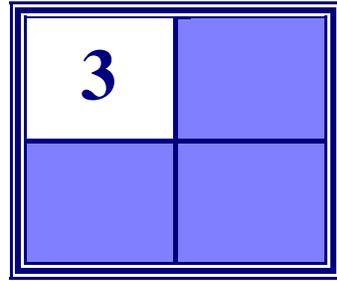
Al igual que GH y PRL, las IGFs circulan en sangre ensambladas a proteínas de transporte o IGFFBPs (ver Jones y Clemmons, 1995; Murphy, 1998; Reinecke y Collet, 1998; Hwa y cols., 1999; Kelley y cols., 2002), que ejercen una importante acción reguladora. En mamíferos, la superfamilia de IGFFBPs comprende seis proteínas, llamadas IGFBP-1 a -6, que se unen a las IGFs con una elevada afinidad. Estas IGFFBPs no sólo regulan la acción y disponibilidad de IGFs (ver Jones y Clemmons, 1995), sino que también median diferentes acciones independientemente de las IGFs; incluyendo la inhibición o estimulación del crecimiento celular y la inducción de la apoptosis (muerte celular programada) (ver Kelley y cols., 2001).

Las IGFFBPs se producen de forma ubicua en todos los tejidos, pero cada tejido tiene sus niveles específicos de IGFFBPs. La escisión de las IGFFBPs por parte de determinadas proteasas es otro punto importante en la modulación de los niveles y acción biológica de las IGFs (ver Wetterau y cols., 1999). Algunas IGFFBPs son inhibitoras, sin embargo, otras promueven la

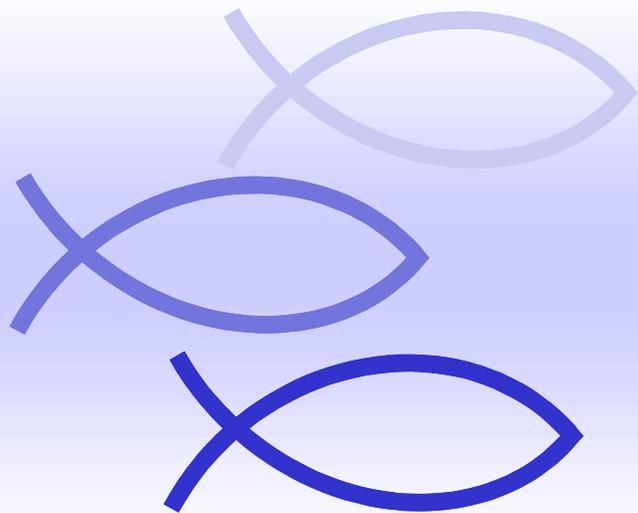
interacción ligando-receptor a través de varios mecanismos específicos. Es más, una misma IGFBP puede ser capaz de ambas acciones, estimuladora e inhibidora, dependiendo del contexto fisiológico y del tipo celular implicado (ver Kelley y cols., 2001).

En el caso de los peces, se han llegado a detectar tres formas distintas de IGFbps: una forma de alto peso molecular (40-50 kDa) y dos formas de bajo peso molecular (24-31 kDa) (ver Duan, 1997; Nicoll y cols., 1998; Kelley y cols., 2000). En base a los pesos moleculares y la regulación endocrina de mamíferos, se ha propuesto que la IGFBP de peces de 40-50 kDa puede corresponder a la IGFBP-3 de mamíferos, mientras que las IGFbps de peces 24-31 kDa pueden ser homólogas a las IGFBP-1 y 2 de mamíferos. Asimismo, la IGFBP de peces de 40-50 kDa muestra una regulación positiva con la GH y, además, está directamente correlacionada con la tasa de crecimiento somático. Las IGFbps de peces con peso ≤ 31 kDa están reguladas positivamente en estados catabólicos, de forma negativa por la insulina e inversamente correlacionadas con el crecimiento somático, por lo que podrían tener una posible relación con la IGFBP-1 y/o IGFBP-2 de mamíferos (Kelley y cols., 1992; 2000; Siharath y cols., 1996; Duan y cols., 1999). Todo ello está en consonancia, al menos en parte, con la clonación de IGFBP-1 y 2 en pez cebra (Duan y cols., 1999; Maures y Duan, 2002), IGFBP-2 en dorada (Funkenstein y cols., 2002) e IGFBP-3 en tilapia (Cheng y cols., 2002).

A lo largo del desarrollo de esta tesis doctoral, el doctorando ha participado activamente en distintos trabajos conducentes a establecer la regulación nutricional de las IGFbps en trucha, dorada y lubina (Pérez-Sánchez y cols., 2004). De los resultados obtenidos se deduce que las IGFbps de dorada y lubina son especialmente susceptibles a degradación proteolítica (posiblemente por proteasas específicas), habiéndose detectado una variante de IGFBP-3 en trucha posiblemente fruto de modificaciones post-transcripcionales (glicosilación).



**Estacionalidad del crecimiento: interacción
entre la somatolactina y el eje somatotrópico**



3.1. Introducción

3.2. Material y métodos

3.2.1. Animales y condiciones de cultivo

3.2.2. Diseño experimental

3.2.3. Análisis de hormonas y metabolitos

3.2.4. Análisis estadístico

3.2.5. Apéndices

3.2.5.1. Fundamento de la determinación de triglicéridos en plasma

3.2.5.2. Fundamento de la determinación de cortisol en plasma

3.2.5.3. Radioinmunoensayo de GH, SL e IGF-I

3.2.5.4. Radioyodación (GH, SL e IGF-I)

3.2.5.5. Expresión y purificación de GH y SL

3.4. Resultados

3.5. Discusión

RESUMEN. En este apartado se abordó la regulación de la somatolactina y del eje somatotrópico en tres ciclos de engorde con inicio en distinta época del año (primavera, verano, otoño). En todos los grupos experimentales, los niveles más altos de GH plasmática se alcanzaron al principio de la fase estival. No obstante, el rango de variación a lo largo del año fue diferente según el grupo experimental, al estar este parámetro estrechamente correlacionado con el nivel de ingesta. Los niveles plasmáticos de IGF-I totales siguieron los cambios estacionales de las tasas de crecimiento y se observó una clara correlación positiva entre estas dos variables, con independencia del grupo experimental de que se tratase. Por consiguiente, la activación del eje somatotrópico siempre precedió al incremento estival del crecimiento. Por el contrario, el aumento de los niveles circulantes de somatolactina tuvo lugar al final del otoño, precediendo a la inhibición invernal de la ingesta. Este fenómeno fue más evidente en animales de mayor tamaño (engordes de primavera y verano). Ello pone de manifiesto una diferente regulación estacional de GH y SL. Se hipotetiza que el papel más importante de la SL es la adaptación y/o preparación al periodo invernal, mientras que la GH e IGF-I son posiblemente percibidas como señales sincronizadoras del crecimiento en periodos de abundancia de alimento (fase estival).

Parte de los resultados expuestos en este capítulo han sido publicados en la revista *General and Comparative Endocrinology* (2002) **128**, 102-111.

3.1. Introducción

La escasa eficiencia de algunos cultivos marinos a escala industrial pone de manifiesto la necesidad de la estandarización de los mismos. En este sentido, es fundamental conocer los factores endocrinos que directa o indirectamente regulan el crecimiento de los peces. La ingesta y, por consiguiente, el crecimiento son altamente dependientes de la temperatura (Jobling, 1997). Sin embargo, el fotoperiodo juega un papel fundamental como agente sincronizador en las zonas templadas (ver Bromage y cols., 2001; Immsland y Jonassen, 2001). Ello permite medir y predecir el tiempo de forma diaria y estacional, a la vez que sincronizar el crecimiento somático y los procesos reproductivos en base a ritmos endógenos circadianos y circanuales, algunas de cuyas señales están mediadas, al menos en parte, por la melatonina (ver Falcón y cols., 1992; Zachmann y cols., 1992; Meissl, 1997).

Sin embargo, la decisión que toma un animal para iniciar un determinado proceso fisiológico (reproducción, esmoltificación, etc.) suele realizarse en un periodo crítico –*oportunity window*– mucho antes de que tenga lugar el proceso por sí mismo (Silverstein y cols., 1997; 1998; Shearer y Swanson, 2000). Ello está en función del peso corporal y las reservas energéticas que tenga el animal. Evidencias indirectas sugieren que el eje somatotrópico puede estar implicado en la sincronización de estas decisiones, al reflejar este sistema el crecimiento somático y la disponibilidad de nutrientes a lo largo del año.

El eje somatotrópico está constituido por la hormona del crecimiento (GH), secretada por la hipófisis; la somatomedina o IGF-I, producida de forma mayoritaria en el hígado; y sus correspondientes receptores y proteínas de transporte. De acuerdo con la hipótesis somatomédica, muchos de los efectos promotores del crecimiento de la GH están mediados a través de la IGF-I plasmática, producida por el hígado en respuesta a la GH hipofisaria (Le Roith y cols., 2001a, b). En peces, al igual que en vertebrados superiores, la secreción de GH está controlada por la retroalimentación negativa de IGF-I (Pérez-

Sánchez y cols., 1992; Blaise y cols., 1995; Weil y cols., 1999), por lo que el estado nutricional juega un papel importante en la regulación de la secreción de GH (Breier, 1999; Louveau y Bonneau, 2001). Además, estudios previos han demostrado que los niveles plasmáticos de GH normalmente alcanzan un pico al final de la primavera e inicio del verano (Pérez-Sánchez y cols., 1994b; Beckman y Dickhoff, 1998), lo que pone de relieve una marcada estacionalidad.

También existen evidencias de que la somatolactina (SL), un nuevo miembro de la familia GH/PRL, está relacionada con la movilización energética. Esta proteína es sintetizada en la *pars intermedia* de la hipófisis de peces y experimenta cambios en su concentración plasmática durante la reproducción (Rand-Weaver y cols., 1992; Kakizawa y cols., 1995b; Taniyama y cols., 1999), el estrés agudo (Rand-Weaver y cols., 1993) y el ejercicio exhaustivo (Kakizawa y cols., 1995a).

Recientemente, un estudio llevado a cabo en dorada indica que, al contrario que la GH, los niveles plasmáticos de SL aumentan con la obesidad y el incremento del tamaño de la ración (Company y cols., 2001). En ese mismo estudio, la SL plasmática aumentó con el ayuno a corto plazo, regresando a los niveles basales tras el incremento de la GH plasmática. Por tanto, la regulación de GH y SL parece ser claramente opuesta. El objetivo del presente estudio es establecer si esta diferente regulación también se da a nivel estacional. Con este propósito se llevó a cabo una experiencia circanual de tres engordes con inicio en distinta época del año (primavera, verano y otoño), analizándose diferentes parámetros metabólicos-endocrinos durante todo este periodo.

3.2. Material y Métodos

3.2.1. Animales y condiciones de cultivo

Juveniles de dorada, procedentes todos ellos del mismo stock atlántico (FMD, Burdeos), se alimentaron a saciedad durante 3-4 semanas (periodo de aclimatación) antes de ser distribuidos aleatoriamente en tanques de 500 litros (0,9 m de diámetro, 0,8 m de altura) con circuito abierto de agua de mar (2 renovaciones por hora) (Fig. 3.1).

El contenido en oxígeno del agua de salida de los tanques no estuvo por debajo del 80% de saturación, y la densidad de cultivo de los animales no superó los 20 Kg/m³. Los animales fueron cultivados en condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura (40° 5'N; 0° 10'E), con un rango de temperatura del agua de 11-14°C en invierno, y de 20-27°C en verano. Los peces fueron alimentados con dietas comerciales basadas en harinas de pescado (Proaqua, España) a un porcentaje fijo del peso corporal; una vez al día en invierno y dos veces al día en verano (5 o 6 veces por semana). El tamaño del gránulo de pienso aumentó (1,5, 2, 3 y 5 mm de diámetro) conforme crecieron los peces sin cambiar la relación proteína/energía (49% proteína; 22% lípidos).



Figura 3.1. Tanques experimentales de 500 litros.

3.2.2. Diseño experimental

Se llevaron a cabo tres experiencias de engorde con inicio en distinta época del año (engorde 1: desde marzo de 1999 hasta mayo del 2000; engorde 2: desde julio de 1999 hasta octubre del 2000; engorde 3: desde noviembre de 1999 hasta octubre del 2000). En cada engorde se distribuyeron 240 animales (peso medio: 22-28 g) en tres tanques. La ingesta de alimento fue ajustada semanalmente para asegurar una buena conversión del alimento (FCR: ingesta alimento/incremento de peso) y un comportamiento activo de la ingesta. Ello ocurre cuando el alimento es ingerido por completo en la superficie del agua.

Los peces se muestrearon mensualmente tras una noche de ayuno. Después de ser anestesiados ligeramente con ácido 3-aminobenzoico éster (100 µg / ml), se pesaron colectivamente, utilizándose como parámetro de crecimiento el Coeficiente Térmico de Crecimiento (Cho, 1992):

$$TGC = (P_1^{1/3} - P_0^{1/3}) \times (\Sigma D^\circ)^{-1}$$

Donde P_0 y P_1 son el peso inicial y el final de los peces, respectivamente, y ΣD° es la suma de los grados de temperatura del agua a las 10 de la mañana en ese periodo de tiempo.

La tasa de conversión de alimento se calculó como:

$$FCR = \text{Alimento ingerido (Kg)} / \text{Ganancia de peso (Kg)}$$

En cada muestreo se sacrificaron 15 animales (5 animales por tanque), a los que se sacó sangre de los vasos caudales mediante jeringas heparinizadas. La sangre se centrifugó a 3000 g durante 20 minutos a 4°C. El plasma se separó en alícuotas y se congeló a -30°C hasta su posterior análisis.

En estos mismos animales, se extrajo el hígado y se calculó el índice hepatosomático:

$$IHS = 100 \times \text{peso del hígado/peso del pez}$$

3.2.3. Análisis de hormonas y metabolitos

Los niveles de triglicéridos (TG) en plasma fueron determinados mediante el uso de un kit comercial (GPO-Trinder, Sigma nº 337-B), basado en la determinación enzimática de glicerol total y glicerol libre a 540 nm (ver Apéndice 3.2.5.1).

Los niveles plasmáticos de cortisol fueron determinados mediante un kit comercial (DSL- 10- 2000 ACTIVE™ Cortisol EIA Kit, Diagnostic System Laboratories), basado en la competición del cortisol endógeno con el complejo cortisol-peroxidasa (Apéndice 3.2.5.2).

La cantidad de IGF-I total se determinó mediante radioinmunoensayo (RIA) (ver Apéndices 3.2.5.3 y 3.2.5.4), después de la extracción por crioprecipitación de las IGF-BPs (Shimizu y cols., 2000). La IGF-I recombinante de pagro (GroPep, Australia), con 100% de similitud aminoacídica con la IGF-I de dorada, se utilizó como trazador y estándar. Como anticuerpo primario se utilizó suero anti-IGF-I de barramundi (GroPep). La reacción cruzada de este anticuerpo con la IGF-I recombinante de dorada (Fine y cols., 1997), la IGF-I recombinante de pagro (GroPep) y la IGF-I recombinante de barramundi (GroPep) es del 100% (Fig. 3.1).

Los niveles plasmáticos de GH y SL se analizaron mediante RIAs homólogos, utilizando proteínas recombinantes de GH (Martínez-Barberá y cols., 1995) y SL (Company y cols., 2001) como marcadores y estándares (Apéndices 3.2.5.3 y 3.2.5.4).

Las formas recombinantes de GH y SL de dorada se obtuvieron de acuerdo con los protocolos desarrollados en colaboración con el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Cádiz para éstas y otras hormonas de peces (Martínez-Barberá y cols., 1994; 1995; Astola y cols., 1996; Company y cols., 2001) (ver Apéndice 3.2.5.5).

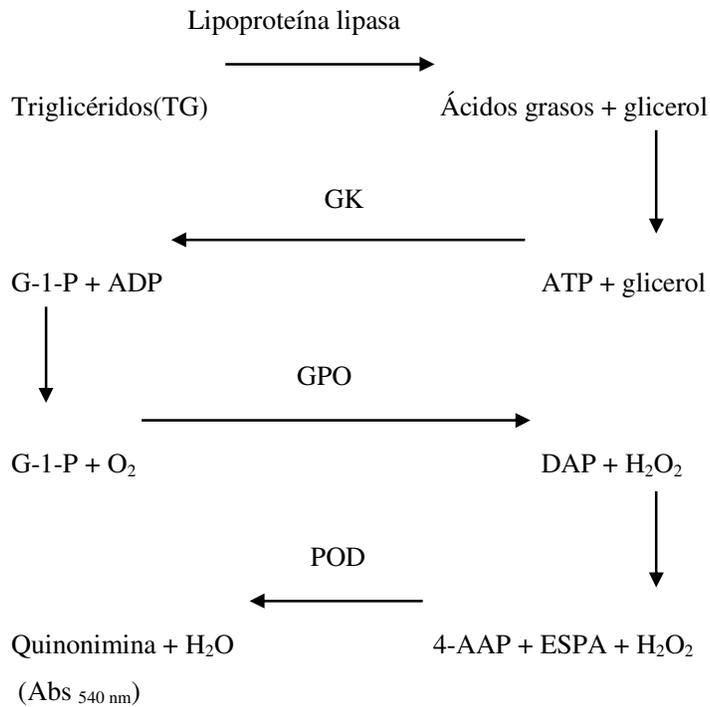
3.2.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos (media \pm error estándar) se llevó a cabo mediante ANOVA de una vía, seguido del test de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$). Los datos de crecimiento, ingesta y FCR de cada tanque se tomaron como unidades experimentales. El coeficiente de correlación de Pearson se utilizó para los análisis de correlación.

3.2.5. Apéndices

3.2.5.1. Fundamento de la determinación de triglicéridos en plasma

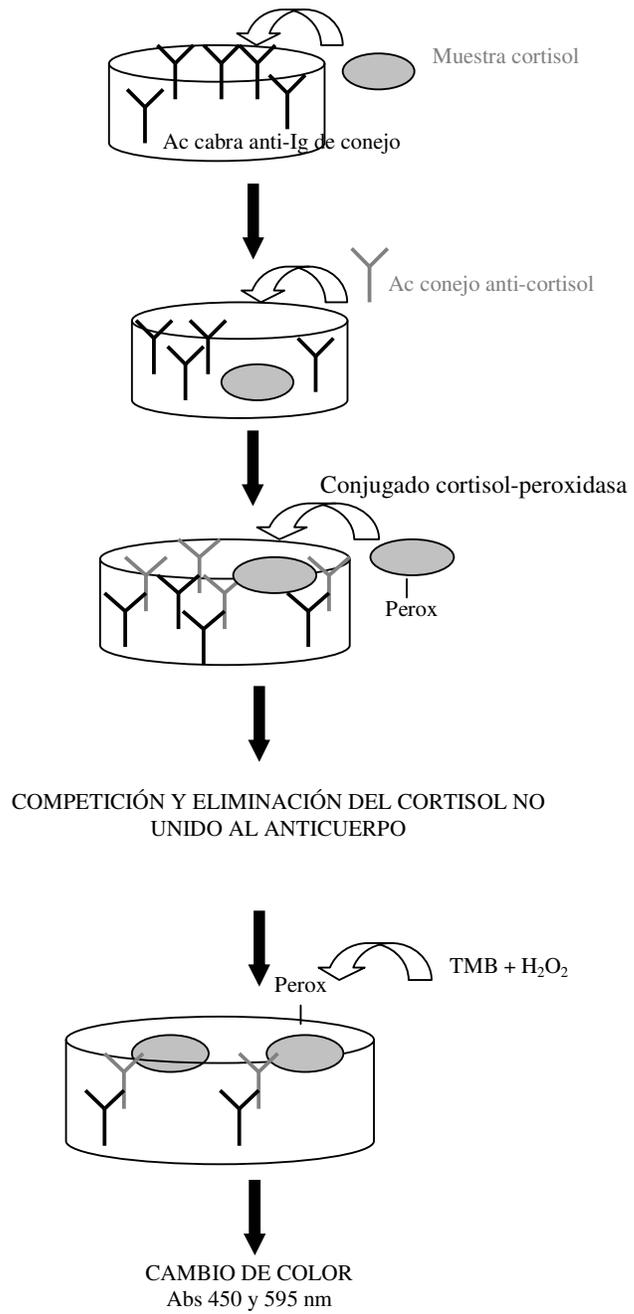
Glicerol total:



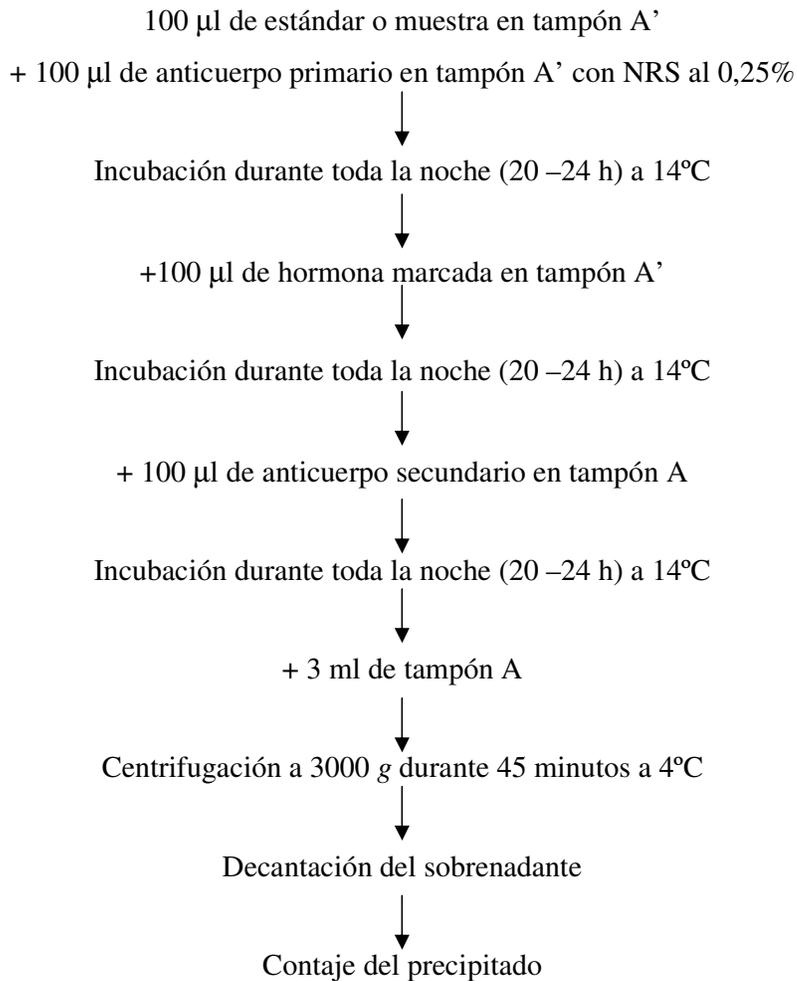
Glicerol libre: mismo procedimiento que el ensayo anterior pero sin tratar la muestra con lipoproteína lipasa.

Concentración TG (nM)= glicerol total - glicerol libre

3.2.5.2. Fundamento de la determinación de cortisol en plasma



3.2.5.3. Radioinmunoensayo de GH, SL e IGF-I



- *Tampón A*: Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ (6H₂O) 10 mM, azida sódica al 0,05% (pH = 7,5).
- *Tampón A'*: Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ (6H₂O) 10 mM, azida sódica al 0,05%, Tritón X-100 al 0,1% y BSA al 1% (pH = 7,5).
- *NRS*: suero preimmune de conejo.

Tabla 3.1. Cantidades de trazador y anticuerpo en los RIAs de GH, SL e IGF-I.

	GH	SL	IGF-I
Trazador (cpm/100 µl)	12000-14000	14000	15000-20000 (GroPep)
Anticuerpo primario (conejo)	1:4000	1:64000	1:8000
IgG (cabra anti-conejo)	1:20 (Biogenesis)	1:20 (Biogenesis)	1:20 (Biogenesis)
ED ₅₀ (ng/ml)	2,1-2,3	2,1-2,3	0,7-0,8
Sensibilidad (ng/ml)	0,1-0,15	0,1-0,15	0,05

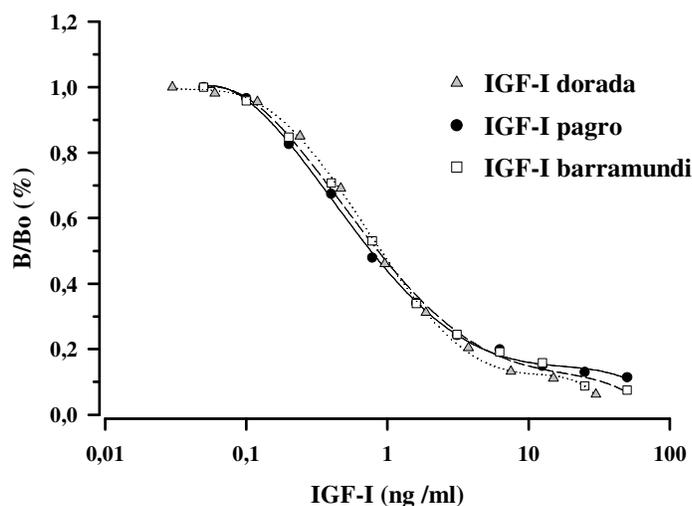


Figura 3.1. Curvas de desplazamiento de IGF-I recombinante de dorada y barramundi en el RIA de IGF-I basado en la utilización de IGF-I recombinante de pagro como estándar y trazador.

3.2.5.4. Radioyodación (GH, SL e IGF-I)

El marcaje de GH y SL para su uso en los RIAs se llevó a cabo por el método de la cloramina T. Para ello, 5-10 µg de proteína se disuelven en 2-3µl de NaOH 10 mM, añadiéndose a continuación 6-7µl de tampón fosfato 0,3 M (Na₂HPO₄ 150 mM; NaH₂PO₄ 150 mM, NaCl al 0,1%, pH = 7,2). A esta mezcla de reacción se añaden 5µl de cloramina T en tampón fosfato (0,4 mg/ml) y 5µl de ¹²⁵I (100 µCi / µl). La solución resultante se incuba durante 2 minutos y 45 segundos a temperatura ambiente, y se para la reacción con 5 µl de metabisulfito sódico en tampón fosfato (0,4 mg/ml). El yodo libre se separa de la hormona marcada por filtración en gel en una columna de Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia). Como eluyente se utiliza Tris-HCl 20 mM (pH = 7,2) suplementado con azida sódica al 0,05% y seroalbúmina bovina (BSA) al 1%.

Para separar las formas monoméricas marcadas, la fracción obtenida de las columnas Sephadex G-25 se vuelve a cromatografiar en una columna Sephacryl S-200 (50 x 0,7 cm), eluída con tampón Tris-HCl 20 mM suplementado con NaCl 0,15M, azida sódica al 0,02% y BSA al 0,3%, pH = 7,5. El flujo de la columna es de 30 ml/h. Dicha columna se calibra previamente con un estándar de BioRad: γ-globulina bovina (158 kDa), ovoalbúmina de pollo (44 kDa), mioglobina de caballo (17 kDa) y vitamina B-12 (1,35 kDa). Se recogen las fracciones monoméricas y se diluyen con glicerol (1:1) para su almacenamiento a -20°C hasta su uso.

Para el marcaje de IGF-I el procedimiento es el mismo, con la excepción de que la proteína liofilizada se disuelve con HCl 10 mM en lugar de NaOH 10 mM.

3.2.5.5. Expresión y purificación de GH y SL

Para la expresión de GH y SL de dorada se ha utilizado la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* transformada con el vector PET-3a. La expresión se induce con IPTG a una concentración final de 0,5 mM cuando el cultivo alcanza una densidad óptica de 0,6 a 600 nm. Tras una incubación de 4 horas a 37°C en agitación, se centrifuga el cultivo a 5000 g durante 15 minutos a 4°C. Después de la eliminación del sobrenadante, el precipitado se resuspende en PBS y se centrifuga a 5000 g durante 15 minutos a 4°C.

El precipitado se resuspende de nuevo en Tris-EDTA (50 ml/250 ml cultivo inicial) con Tritón X-100 al 1% y PMSF 0,5 mM pH = 8. Después de sonicar las células, éstas se centrifugan a 15000 g durante 30 minutos a 4°C y se resuspenden los cuerpos de inclusión con Tris-EDTA-Tritón (50 ml/ 250 ml cultivo inicial), dejándolas en agitación toda la noche a 4°C. A continuación, los cuerpos de inclusión se centrifugan cuatro veces a 15000 g durante 30 minutos a 4°C, lavándolos con Tris-EDTA (50 ml/ 250 ml cultivo inicial). Tras la última centrifugación, se elimina el sobrenadante y la proteína recombinante se guarda como cuerpo de inclusión a -80°C hasta su uso.

En el momento de utilizar los cuerpos de inclusión, éstos se resuspenden en cloruro de guanidino 6 M con β -mercapto-etanol al 1%, dejándolos en incubación 1 hora a temperatura ambiente en agitación. A continuación, se dializan para la correcta renaturalización en tampón bicarbonato amónico 50 mM a 4°C en agitación. Una vez congeladas y liofilizadas las proteínas, éstas se mantienen a -20°C hasta su purificación mediante HPLC o FPLC.

La correcta renaturalización de la proteína expresada se comprueba mediante electroforesis en gel de acrilamida al 15% (1 hora a 200V) en condiciones no reductoras (ver Fig. 3.2).

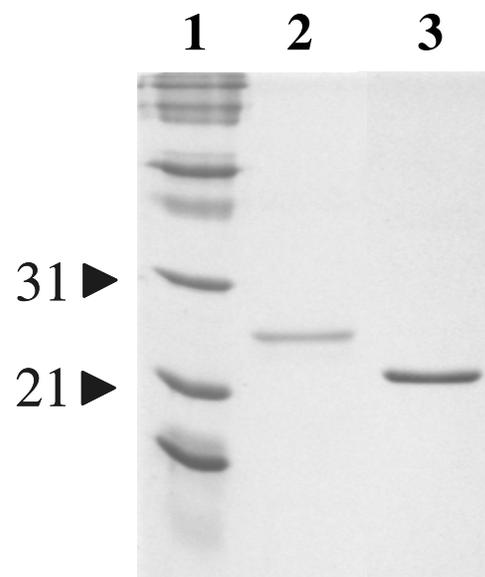


Figura 3.2. Gel de acrilamida al 15% (condiciones no reductoras) teñido con Coomassie. 1, estándar BioRad Broad Range; 2, SL recombinante de dorada; 3, GH recombinante de dorada.

3.4. Resultados

Los peces del engorde 1 (de primavera a primavera) crecieron de forma rápida en el periodo de marzo ($24,5 \pm 0,1$ g) a octubre de 1999 ($285 \pm 1,5$ g), alcanzando 372 ± 3 g en mayo del 2000 (Fig. 3.3 B). Al inicio del engorde, la ingesta de alimento aumentó del 0,9% en primavera hasta el 1,95% a mitad de verano, con un FCR acumulado de $1,10 \pm 0,01$. Posteriormente, la ingesta disminuyó y se mantuvo sobre la ración de mantenimiento durante el otoño e invierno, alcanzando el FCR un valor de $1,5 \pm 0,01$ a mitad de la primavera.

El engorde 2 se llevó a cabo de verano a verano (Fig. 3.3 C), y los peces crecieron de forma rápida desde julio ($28,03 \pm 0,1$ g) a octubre de 1999 ($129,9 \pm 0,5$ g), disminuyendo la ingesta de alimento del 2,5% al 1,2%. Los peces crecieron lentamente durante el otoño e invierno (FCR = $1,7 \pm 0,06$), llegando a un peso final de $427,5 \pm 8,9$ g en agosto del 2000. La ingesta de alimento de estos peces aumentó del 0,6% al inicio de la primavera al 1,1% a mitad del verano, con un FCR de $1,27 \pm 0,02$; con lo que se alcanzó un valor acumulado de $1,31 \pm 0,01$.

El engorde 3 se realizó de otoño a otoño (Fig. 3.3 D) y la ingesta inicial de los peces se mantuvo en 0,6% desde noviembre de 1999 a febrero del 2000, con un FCR de $1,38 \pm 0,01$. Tras lo cual, la ingesta de alimento aumentó, alcanzándose un máximo a principios de verano (1,7%), para disminuir hasta el 1% al inicio del otoño. El peso final de los peces fue de $385,9 \pm 2$ g, con un FCR de $1,06 \pm 0,01$ de febrero a agosto del 2000, que alcanzó un valor acumulado de $1,13 \pm 0,01$ al final del engorde.

En todos los engordes el coeficiente de variación dentro de cada tanque no superó el 11-15% durante toda la experiencia.

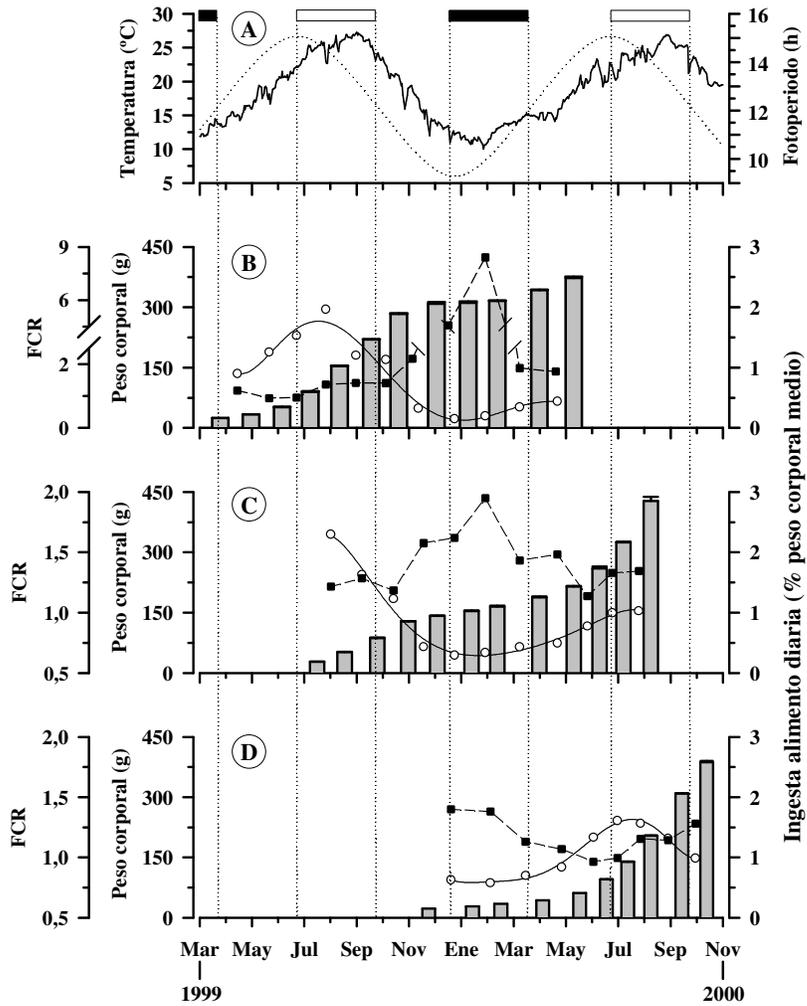


Figura 3.3. (A) Cambios estacionales de fotoperiodo y temperatura. Peso corporal (barras), ingesta de alimento (○) y tasa de conversión (FCR, ■) de los peces cultivados durante todo el periodo experimental (B, engorde 1; C, engorde 2; D, engorde 3). Los datos son la media ± error estándar de los tres tanques de engorde. La duración del periodo estival e invernal está indicada en la parte superior de la figura.

En el engorde 1, los niveles plasmáticos de GH aumentaron progresivamente durante la primavera, observándose un pico claro en la primera mitad del verano. Durante el periodo otoño-invierno, la GH permaneció baja, aumentando de nuevo en la siguiente primavera (Fig. 3.4 A). En el engorde 2, el ciclo que mostró la GH fue similar, y se observó un aumento en la concentración de GH plasmática en los dos periodos estivales (Fig. 3.4 B). En el engorde 3, el valor medio de la concentración plasmática de GH fue el mismo que en el engorde 1 y 2, pero el rango de variación a lo largo de todo el periodo experimental fue menor, no siendo estadísticamente significativo el aumento primaveral-estival (Fig. 3.4 C).

Tanto entre las experiencias de engorde como dentro de cada una de ellas, la concentración de GH siguió los cambios en el comportamiento alimenticio, encontrándose una correlación positiva ($r = 0,62$; $P < 0,0001$) entre la ingesta de alimento y los niveles plasmáticos de GH (Fig. 3.5).

Tal y como se muestra en la Figura 3.6, los cambios estacionales de IGF-I fueron estadísticamente significativos con independencia del periodo de engorde. En consonancia con las tasas de crecimiento, el rango de variación anual de las concentraciones de IGF-I fue del orden del 200%. El mayor crecimiento y concentración de IGF-I circulante se alcanzó en el periodo estival, existiendo una fuerte correlación positiva ($r = 0,82$; $P < 0,001$) entre la IGF-I y las medidas de crecimiento (Fig. 3.7).

En el engorde 3, el valor medio de SL circulante fue claramente inferior al detectado en los engordes 1 y 2 (Fig. 3.8 C). En estos dos engordes, la SL plasmática mostró un patrón marcadamente estacional y opuesto al descrito para la GH (Fig. 3.8 A y B). Los niveles más bajos de SL se observaron durante la época estival, con un incremento de 5 a 10 veces al final del otoño.

En todos los engordes, los niveles plasmáticos de cortisol fueron bajos (>5 ng/ml) desde finales de otoño hasta inicios de la primavera, aumentando en gran medida durante la estación cálida (25-100 ng/ml) (Fig. 3.9).

Los triglicéridos plasmáticos mostraron un pico en la época invernal, aunque la hipertrigliceridemia fue más pronunciada en peces pequeños (engorde 3) que en grandes (engordes 1 y 2) (Fig. 3.10). El tratamiento estadístico de los datos mostró una clara correlación positiva entre la trigliceridemia y el índice hepatosomático ($r = 0,95$; $P < 0,0001$), que alcanzó un valor máximo de 3,5% en el invierno del engorde 3 (engordes 1 y 2: 2 – 2,5%).

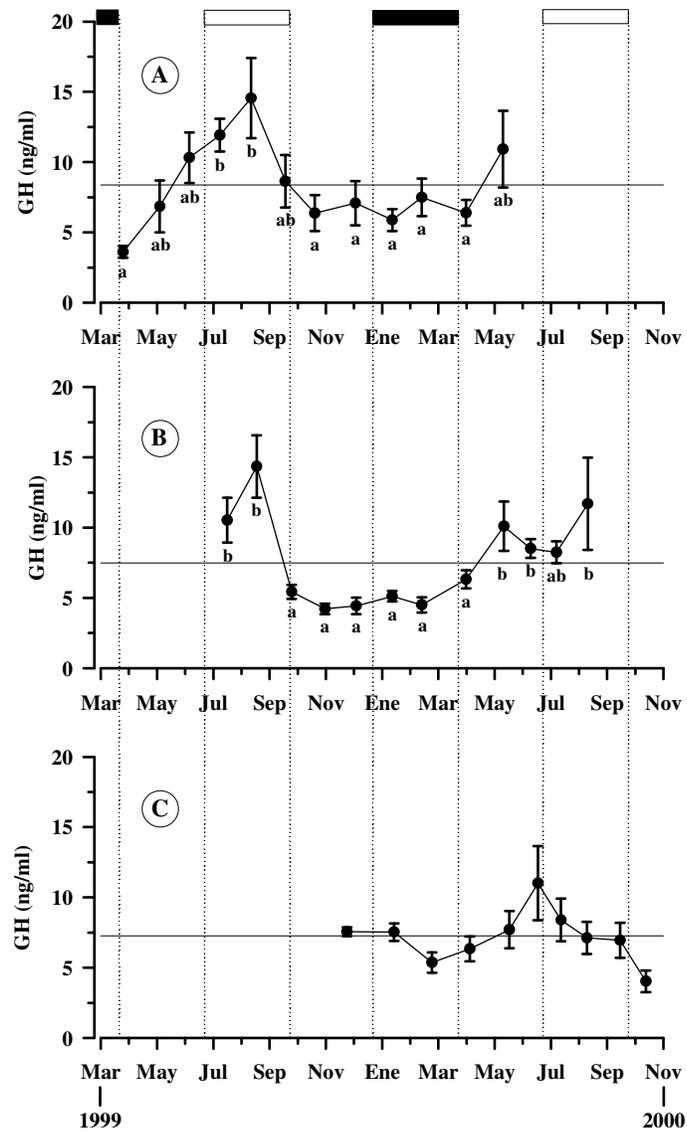


Figura 3.4. Cambios estacionales en los niveles plasmáticos de GH (A, engorde 1; B, engorde 2; C, engorde 3). Los datos son la media \pm error estándar de 12-15 animales. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$; Student-Newman-Keuls). La duración del periodo estival e invernal está indicada en la parte superior de la figura. La línea horizontal es el valor medio de las medidas a lo largo de todo el periodo experimental.

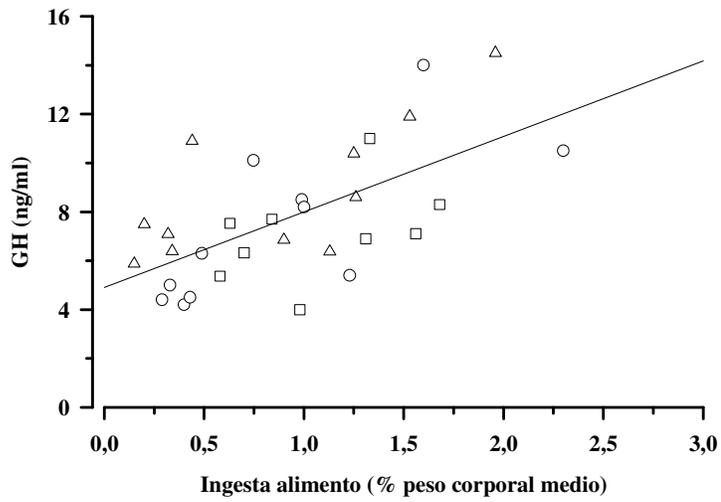


Figura 3.5. Correlación entre los niveles plasmáticos de GH y la ingesta de alimento (engorde 1: ▽; engorde 2: O; engorde 3: □). Índice de correlación de Pearson ($r = 0,62$; $P < 0,001$).

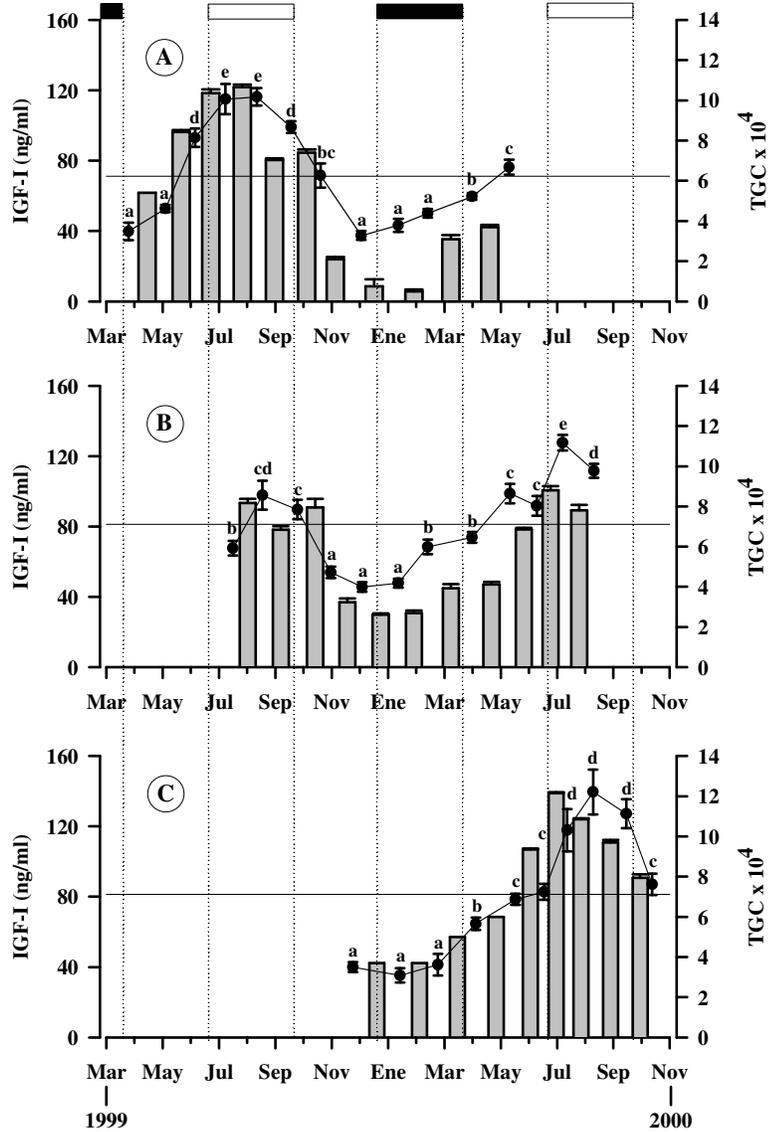


Figura 3.6. Cambios estacionales en los niveles plasmáticos de IGF-I (A, engorde 1; B, engorde 2; C, engorde 3). Los datos son la media \pm error estándar de 12-15 animales. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$; Student-Newman-Keuls). La duración del periodo estival e invernal está indicada en la parte superior de la figura. La línea horizontal es el valor medio de las medidas a lo largo de todo el periodo experimental.

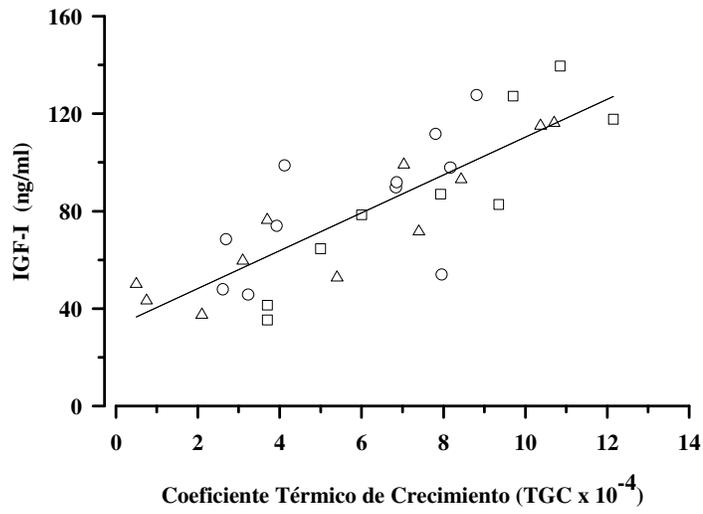


Figura 3.7. Correlación entre los niveles totales de IGF-I plasmática y el Coeficiente Térmico de Crecimiento (TGC) (engorde 1: ▽; engorde 2: O; engorde 3: □). Índice de correlación de Pearson ($r = 0,82$; $P < 0,001$).

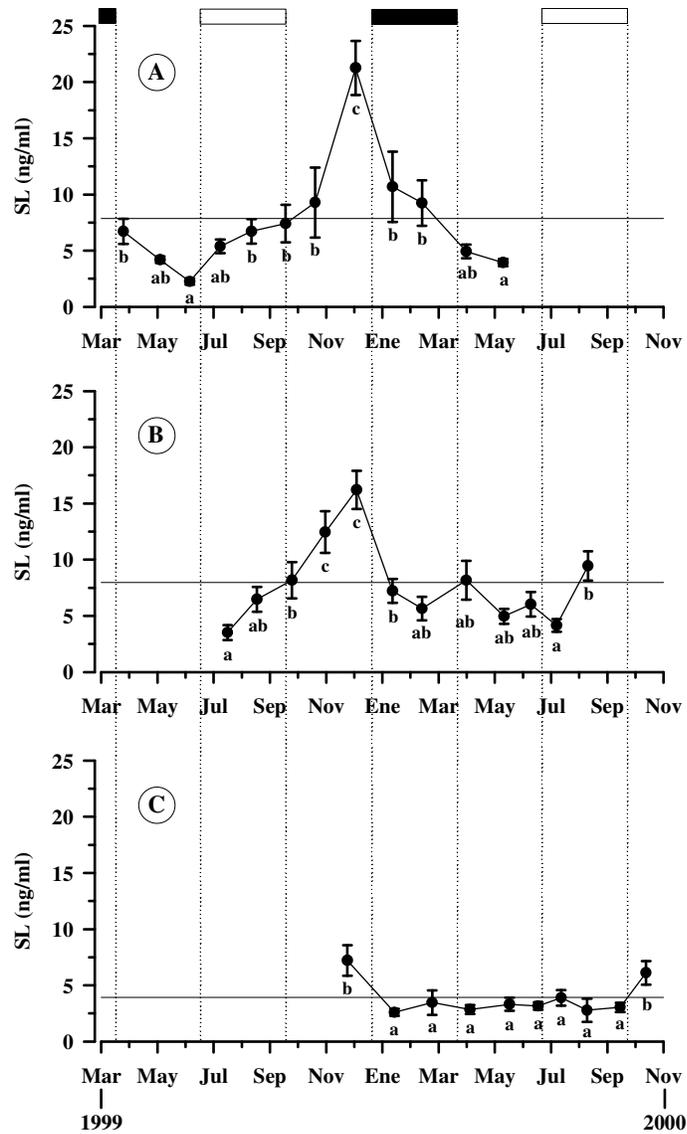


Figura 3.8. Cambios estacionales en los niveles plasmáticos de SL (A, engorde 1; B, engorde 2; C, engorde 3). Los datos son la media \pm error estándar de 12-15 animales. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$; Student-Newman-Keuls). La duración del periodo estival e invernal está indicada en la parte superior de la figura. La línea horizontal es el valor medio de las medidas a lo largo de todo el periodo experimental.

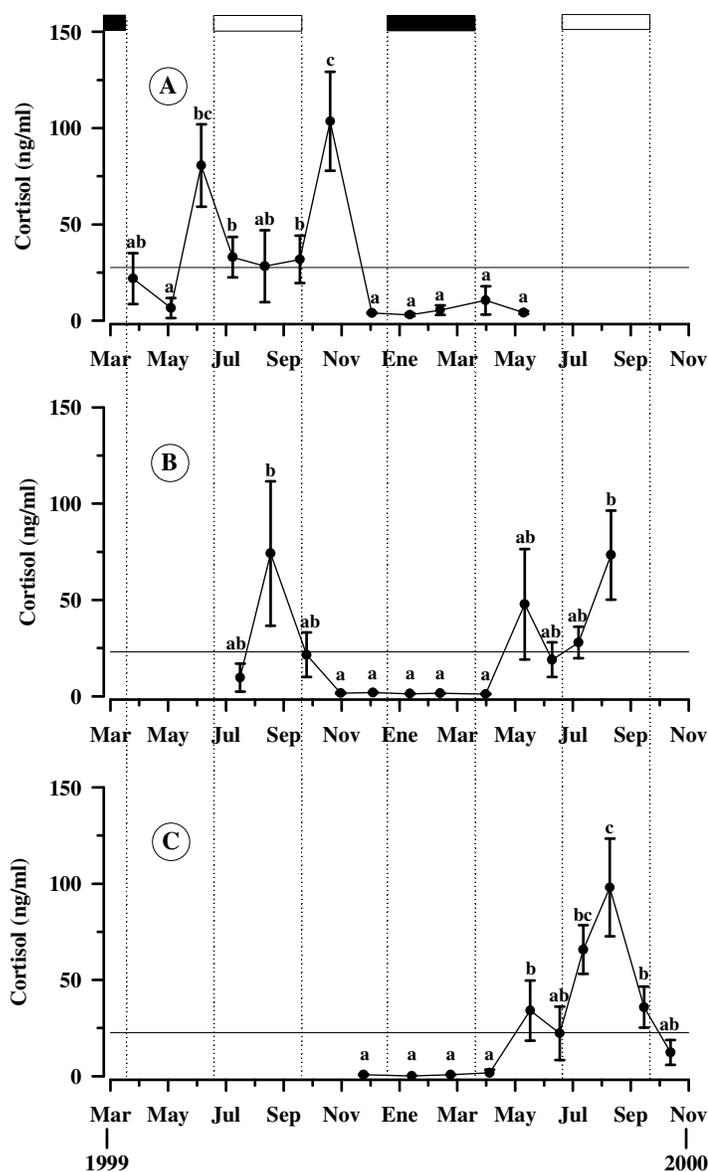


Figura 3.9. Cambios estacionales de los niveles plasmáticos de cortisol (A, engorde 1; B, engorde 2; C, engorde 3). Los datos son la media \pm error estándar de 12-15 animales. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$; Student-Newman-Keuls). La duración del periodo estival e invernal está indicada en la parte superior de la figura. La línea horizontal es el valor medio de las medidas a lo largo de todo el periodo experimental.

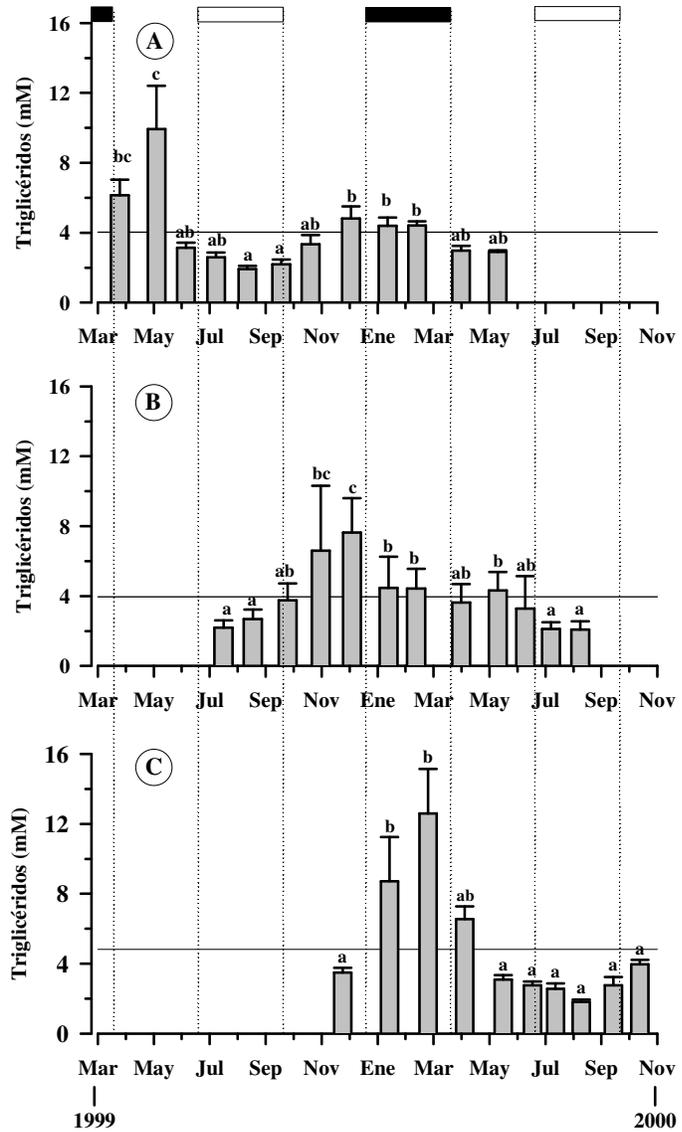


Figura 3.10. Cambios estacionales de los niveles plasmáticos de triglicéridos (A, engorde 1; B, engorde 2; C, engorde 3). Los datos son la media \pm error estándar de 12-15 animales. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$; Student-Newman-Keuls). La duración del periodo estival e invernal está indicada en la parte superior de la figura. La línea horizontal es el valor medio de las medidas a lo largo de todo el periodo experimental.

3.5. Discusión

La dorada es una de las especies de mayor interés para la acuicultura mediterránea y, en la actualidad, sus huevos y larvas se encuentran disponibles durante la mayor parte del año (Smart y Prickett, 1997). Esta especie muestra un comportamiento activo de ingesta marcado por el fotoperiodo, con un pico en las primeras horas del día durante la estación cálida, que se traslada a la tarde en el periodo invernal. Sin embargo, la ingesta de alimento es pobre a temperaturas por debajo de los 16°C, dando lugar a un bajo crecimiento desde noviembre hasta abril en nuestra latitud. De ahí que nuestros ciclos de engorde sean entre 1 y 3 meses más largos que los realizados en zonas templadas con una temperatura media anual de 21–23°C (Islas Canarias, Mar Rojo). Sin embargo, cuando se comparan los TGCs de verano con los valores de referencia (6–10 x 10⁴; ver Kaushik, 1998), se observa que, en nuestro caso, éstos estuvieron claramente en un rango superior. Ello sugiere que después de la parada invernal del crecimiento se produce algún tipo de crecimiento compensatorio.

Es de reseñar que en nuestro estudio la ingesta de alimento se adecuó a un tamaño de ración predeterminado. Ello no aumentó el grado de dispersión de los animales, a pesar de que las doradas actualmente en cultivo han permanecido genéticamente salvajes y no se han seleccionado sistemáticamente (Knibb y cols., 1997; Gorshkov y cols., 1997). Este crecimiento homogéneo en condiciones de alimentación restringida también se ha encontrado en otros peces, como la lubina (Boujard y cols., 1996) y el corégono (Jobling y cols., 1999). Sin embargo, en trucha arco iris y salmónidos, el comportamiento territorial y las jerarquías sociales se ven agudizados en condiciones de alimentación restringida (Jobling y Koskela, 1996; Ryer y Olla, 1996).

El crecimiento implica un aumento tanto en número como en tamaño de las fibras musculares, coincidiendo las fases de rápido crecimiento con los periodos de reclutamiento de fibras. En dorada, este proceso está minimizado por encima de los 100 gramos de peso (Rowlerson y cols., 1995). Sin embargo,

la hiperplasia e hipertrofia muscular presentan un fuerte componente genético, influenciado por una gran variedad de factores ambientales y nutricionales, como el fotoperiodo y la temperatura (ver Johnston, 1999). Así pues, tanto en éste como en otros estudios previos (Petridis y Rogdakis, 1996), el periodo otoñal parece ser la época más ventajosa para el inicio de los engordes de dorada, ya que se observa una mejora del FCR. Ello viene a corroborar que la celularidad muscular y el rendimiento final del crecimiento dependen tanto del tamaño corporal como de la historia previa de los animales.

Del presente trabajo también se deduce que el ciclo de GH es similar en todos los engordes, pero el rango de variación a lo largo del año fue distinto. Probablemente, este hecho se debió a un diferente estado energético y percepción de las señales ambientales. En salmónidos, el fotoperiodo se ha considerado el principal factor ambiental que afecta a la dinámica de la GH. En estos animales, el incremento del fotoperiodo aumenta la GH plasmática durante la esmoltificación (McCormick y cols., 2000; Nielsen y cols., 2001). En dorada, estudios previos mostraron la coincidencia de los cambios del fotoperiodo con los niveles plasmáticos de GH (Pérez-Sánchez y cols., 1994b). Sin embargo, el presente estudio aporta evidencias de que existe una fuerte correlación entre ingesta de alimento y GH. Así pues, la regulación positiva de la concentración de GH circulante durante la época estival puede ser percibida como una señal de necesidad energética más que como una señal de crecimiento.

Este punto de vista es coherente con estudios previos en dorada, donde los niveles plasmáticos de GH disminuyen progresiva y significativamente con el aporte energético de la dieta, mientras que aumentan con el ayuno (Company y cols., 1999a) y la merma del valor nutritivo de la fuente de proteínas de la dieta (Gómez-Requeni y cols., 2003; 2004). En tilapia se ha encontrado una correlación inversa entre la ingesta de alimento y GH (Toguyeni y cols., 1996), pero no siempre ocurre lo mismo en salmónidos (Storebakken y cols., 1991; Pierce y cols., 2001). Por tanto, la sincronización del eje somatotrópico varía entre las especies de peces, aunque estudios *in vivo* e *in vitro* en carpa dorada indican que el neuropéptido Y (NPY) puede ser un factor

fundamental para integrar la estimulación de la ingesta y la secreción de GH (ver Lin y cols., 2000).

Ensayos de radiorreceptores han puesto de relieve un carácter marcadamente estacional de la población de RGHs hepáticos en dorada (Pérez-Sánchez y cols., 2003). Estos cambios en la población de RGHs hepáticos están estrechamente relacionados con los niveles circulantes de IGF-I y, aunque la regulación transcripcional de RGHs es todavía incipiente en peces (ver Capítulo 6), los resultados obtenidos en este apartado ponen de relieve una estrecha correlación entre la IGF-I plasmática y las tasas de crecimiento, con independencia del periodo de engorde.

En salmónidos también hay evidencias de una estrecha correlación entre crecimiento e IGF-I plasmática (Beckman y cols., 1998; Pierce y cols., 2001). No obstante, otros autores no han conseguido poner de manifiesto tal correlación (Silverstein y cols., 1998; Devlin y cols., 2000), lo que podría atribuirse al efecto distorsionador de las proteínas de transporte de IGFs (IGFBPs), capaces de potenciar o inhibir la acción anabólica de la IGF-I (Duan, 1998; Shimizu y cols., 1999). En cualquier caso, el hecho de que ratones *knock-out* para la IGF-I hepática no presenten alteraciones significativas del crecimiento (ver Le Roith y cols., 2001) nos hace pensar en la existencia, al menos en vertebrados superiores, de mecanismos compensatorios.

El cortisol es el marcador por excelencia del nivel de estrés en peces y otros vertebrados (ver Wendelaar-Bonga, 1997). Así pues, los niveles circulantes de cortisol aumentan rápidamente en peces en respuesta a: manipulación, confinamiento, pobre calidad del agua y exposición a tóxicos. Es más, abundante bibliografía demuestra que el aumento del cortisol plasmático tiene un efecto negativo sobre la ingesta, el crecimiento, el factor de condición y la conversión de alimento (Pottinger y Pickering, 1992; Fox y cols., 1997; Gregory y Wood, 1999). Asimismo, en dorada (Rotllant y cols., 2000a, b) y otras especies de peces (Pickering y cols., 1991; Farbridge y Leatherland, 1992; Auperin y cols., 1997) se ha observado que el aumento crónico del cortisol está relacionado con el descenso de las concentraciones plasmáticas de GH. Por tanto, al igual que en

mamíferos, el exceso de cortisol puede ser capaz de regular negativamente la secreción de GH a través de un aumento del tono hipotalámico de somatostatina, lo que enmascararía cualquier efecto estimulador a nivel hipofisario (ver Giustina y Wehrenberg, 1992).

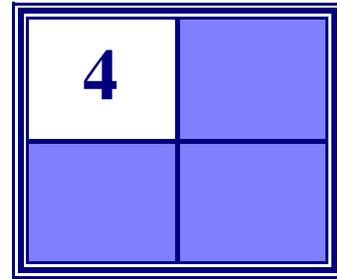
La hormona liberadora de la corticotropina (CRH) es un estimulador muy conocido de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la hormona estimulante de los melanocitos (α -MSH) y la β -endorfina (Rotllant y cols., 2001). No obstante, además de su acción liberadora sobre los péptidos POMC, estudios llevados a cabo en carpa dorada han demostrado que la CRH actúa como una potente sustancia anoréxica (De Pedro y cols., 1993; 1997). En nuestro caso, las doradas crecieron eficientemente sin mostrar síntomas externos de estrés ni enfermedad. Sin embargo, en todos los engordes se observó un aumento importante de los niveles plasmáticos de cortisol durante la estación cálida, con temperaturas que superan los 28°C. En esta época del año, la activación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal puede ser un hecho normal en nuestra latitud. Ello introduce un factor poco previsible que actúa sobre la ingesta, el crecimiento y el eje somatotrópico; disminuyendo la eficiencia energética y restringiendo el periodo de rápido crecimiento.

Zhu y Thomas (1998) demostraron en el corvinón ocelado que los niveles plasmáticos de SL están bajo el control inhibitorio de la luz recibida por órganos fotorreceptores. Por el contrario, en la trucha arco iris la adaptación al color del fondo no afecta a los niveles plasmáticos de SL (Kakizawa y cols., 1995a), aunque éstos se ven alterados por agentes estresantes (Rand-Weaver y cols., 1993). En trucha, también existen evidencias de cambios estacionales en los niveles circulantes de SL, aunque éstos parecen estar más relacionados con la temperatura que con el fotoperiodo (Rand-Weaver y cols., 1995).

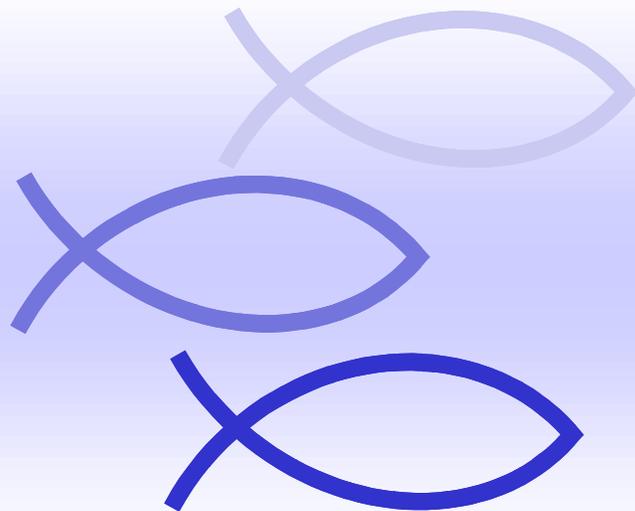
En lo que respecta a la dorada, el presente trabajo puso de manifiesto un aumento más que notable de la SL a finales de otoño. No obstante, tal incremento sólo fue evidente una vez alcanzado un determinado tamaño crítico (>100g, engordes 1 y 2). Durante la primera fase del engorde 3 (otoño-invierno, <50gr) este fuerte incremento de SL no sólo no se dio, sino que los

animales durante la fase invernal siguieron comiendo por encima de la ración de mantenimiento. Ello estuvo ligado a un claro estado de hipertrigliceridemia acompañado de una importante deposición de grasa a nivel hepático (incremento del índice hepatosomático). Por consiguiente, parece concluyente que el incremento otoñal de SL después del periodo estival de crecimiento y relleno de reservas energéticas se ve propiciado por un determinado tamaño crítico y nivel de adiposidad. El hecho de que experiencias previas en dorada hayan puesto de manifiesto una clara correlación positiva entre SL circulante y nivel de ingesta (Company y cols., 2001) está en consonancia con esta hipótesis de trabajo.

A modo de resumen, el presente estudio proporciona claras evidencias de una diferente regulación de la SL y del eje somatotrópico. Las implicaciones a nivel fisiológico son todavía difíciles de establecer, aunque la SL y la GH podrían actuar coordinadamente en la regulación del crecimiento, la ingesta y el grado de adiposidad. En este sentido, el aumento de los niveles circulantes de GH durante la estación cálida, en consonancia con la activación de la ingesta, favorecería la asimilación de la proteínas de la dieta para fines anabólicos (acción mediada por las IGFs), y de los lípidos como substratos energéticos (acción lipolítica no mediada por las IGFs). Por el contrario, una vez alcanzado un tamaño crítico, la SL podría actuar como marcador metabólico de un excedente de energía, sin descartar una posible acción sobre el disparo del proceso reproductor, de modo similar al descrito para la leptina de vertebrados superiores. En este contexto, trabajos recientes en nuestro laboratorio han demostrado *in vivo* una acción lipolítica de la SL recombinante de dorada que no afecta a la producción de IGF-I (Vega-Rubín de Celis y cols., 2003) pero que inhibe transitoriamente la ingesta (Vega-Rubín de Celis y cols., en preparación). Por consiguiente: 1) la GH actuaría como un factor de crecimiento con capacidad lipolítica ante una demanda energética en periodos de crecimiento o de ayuno forzado durante la fase estival; y 2) la SL podría actuar como factor de adiposidad y de inhibición de ingesta con capacidad lipolítica durante el periodo otoñal e invernal.



**Bases nutricionales y endocrinas de la
interacción entre periodo de engorde y el
régimen de alimentación**



4.1. Introducción

4.2. Material y Métodos

4.2.1. Animales y condiciones de cultivo

4.2.2. Diseño experimental

4.2.3. Parámetros hormonales y de composición corporal

4.2.4. Análisis estadístico

4.2.5. Apéndices

4.2.5.1. Fundamento de la determinación de proteínas
por el método de Kjeldahl

4.2.5.2. Protocolo básico de la determinación de lípidos
totales por el método de Folch

4.3. Resultados

4.4. Discusión

4.1. Introducción

En la naturaleza, la disponibilidad de alimento no es constante, por lo que a menudo los animales se enfrentan a periodos de privación o restricción de alimento como parte de su ciclo vital. Cuando la disponibilidad de alimento vuelve a reestablecerse, el animal recupera peso a lo largo de un periodo de crecimiento acelerado cuya intensidad y duración depende de la crudeza del periodo de restricción de alimento y de la especie en estudio (ver Capítulo de Introducción). Este fenómeno-crecimiento compensatorio- también se da en animales de granja y ha sido descrito para una gran variedad de especies de peces, tales como: trucha arco iris (Weatherlay y Gill, 1981; Quinton y Blake, 1990; Teskeredzic y cols., 1995; Jobling y Koskela, 1996), pescardo (Russell y Wooten, 1992), pez gato (Kim y Lovell, 1995; Gaylord y Gatlin, 2001), salmón (Nicieza y Metcalfe, 1997), carpa híbrida (Hayward y cols., 1997) y tilapia (Melard y cols., 1998).

Los mecanismos últimos que rigen el crecimiento compensatorio son todavía objeto de debate, aunque se ha especulado sobre su posible aplicación en cultivos de peces de interés comercial en el área mediterránea (lubina, dorada). La presión evolutiva ha hecho que este crecimiento explosivo durante la fase de crecimiento compensatorio sea especialmente evidente en especies de peces adaptadas a aguas frías (Schwarz y cols., 1985; Kim y Lovell, 1995; Hayward y cols., 1997). Por tanto, es de suponer que especies como la lubina y la dorada, adaptadas a zonas templadas de regiones meridionales, no sean el mejor modelo de crecimiento compensatorio en peces. Sin embargo, voluntaria o involuntariamente, la práctica de la acuicultura ha hecho que se seleccionen sistemáticamente individuos con una alta capacidad de ingesta pero no necesariamente con una alta eficiencia de conversión del alimento. De ahí el interés en determinar en qué medida regímenes de alimentación restringida mejoran la eficiencia del cultivo.

Este aspecto constituye la base del presente estudio, en el que a su vez se considera la interacción del régimen de alimentación con el periodo de inicio del ciclo de engorde sobre parámetros biométricos, nutricionales y hormonales, con especial atención a las posibles alteraciones en las variaciones circunales de GH y SL (ver Capítulo 3).

4.2. Material y Métodos

4.2.1. Animales y condiciones de cultivo

Juveniles de dorada (10-20 g) procedentes del mismo stock atlántico (FMD, Burdeos) se alimentaron a saciedad durante 3-4 semanas (periodo de aclimatación), antes de ser distribuidos aleatoriamente en tanques de 3000 litros (2,4 metros de diámetro, 0,6 metros de altura) con circuito abierto de agua de mar (2 renovaciones/ hora) (ver Fig. 4.1).

El contenido en oxígeno del agua de salida no fue inferior al 85% de saturación. La densidad final del cultivo no superó los 20 Kg/m³. Los animales fueron cultivados en condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura (40° 5'N; 0° 10'E), con un rango de temperatura de 11°-14°C en invierno y de 20-27°C en verano. Los peces fueron alimentados durante toda la experiencia con dietas basadas en harinas de pescado (Proaqua, España) 2 veces al día en el periodo estival y una vez al día durante el periodo invernal (4 o 5 veces por semana). El tamaño del gránulo de pienso aumentó (1,5, 2, 3 y 5 mm de diámetro) conforme crecieron los peces sin cambiar la relación proteína/energía (49% proteína; 22% lípidos).



Figura 4.1. Tanques experimentales de 3000 litros.

4.2.2. Diseño experimental

Se realizaron tres experiencias de engorde con distinta época de inicio: engorde 1 (marzo 1999 - noviembre 1999), engorde 2 (julio 1999 - julio 2000) y engorde 3 (noviembre 1999 - octubre 2000). Al inicio de cada engorde se establecieron dos grupos experimentales (dos réplicas de 200 animales/tanque) con regímenes de alimentación diferentes:

- RA-1: Régimen de alimentación restringida.
- RA-2: Régimen de alimentación a saciedad visual (*ad libitum*).

La ración de los grupos RA-1 en cada ciclo de engorde se ajustó diariamente para asegurar un comportamiento activo de la ingesta -ingesta de comida en la superficie del agua- (Fig. 4.2).

Los peces se muestrearon mensualmente tras una noche de ayuno. Después de ser anestesiados ligeramente con ácido 3-aminobenzoico éster (100 µg / ml), se pesaron colectivamente, utilizándose como parámetro de crecimiento el Coeficiente Térmico de Crecimiento (Cho, 1992):

$$TGC = (P_1^{1/3} - P_0^{1/3}) \times (\Sigma D^\circ)^{-1}$$

Donde P_0 y P_1 son el peso inicial y el final de los peces, respectivamente, y ΣD° es la suma de los grados de temperatura del agua a las 10 de la mañana en ese periodo de tiempo.

La tasa de conversión de alimento se calculó como:

$$FCR = \text{Alimento ingerido (Kg)} / \text{Ganancia de peso (Kg)}$$

A intervalos regulares (2-3 meses) se tomaron muestras de sangre de 10 peces por régimen de alimentación. La sangre se extrajo de los vasos caudales (jeringas heparinizadas) centrifugándose a 3000 g durante 20 minutos a 4°C. El plasma se separó en alícuotas y se congeló a -30°C hasta su posterior análisis. Estos mismos peces se trituraron y los homogenados se liofilizaron para los análisis de composición corporal.

El índice de acreción proteica (IP) se calculó como el cociente entre proteínas y lípidos corporales.

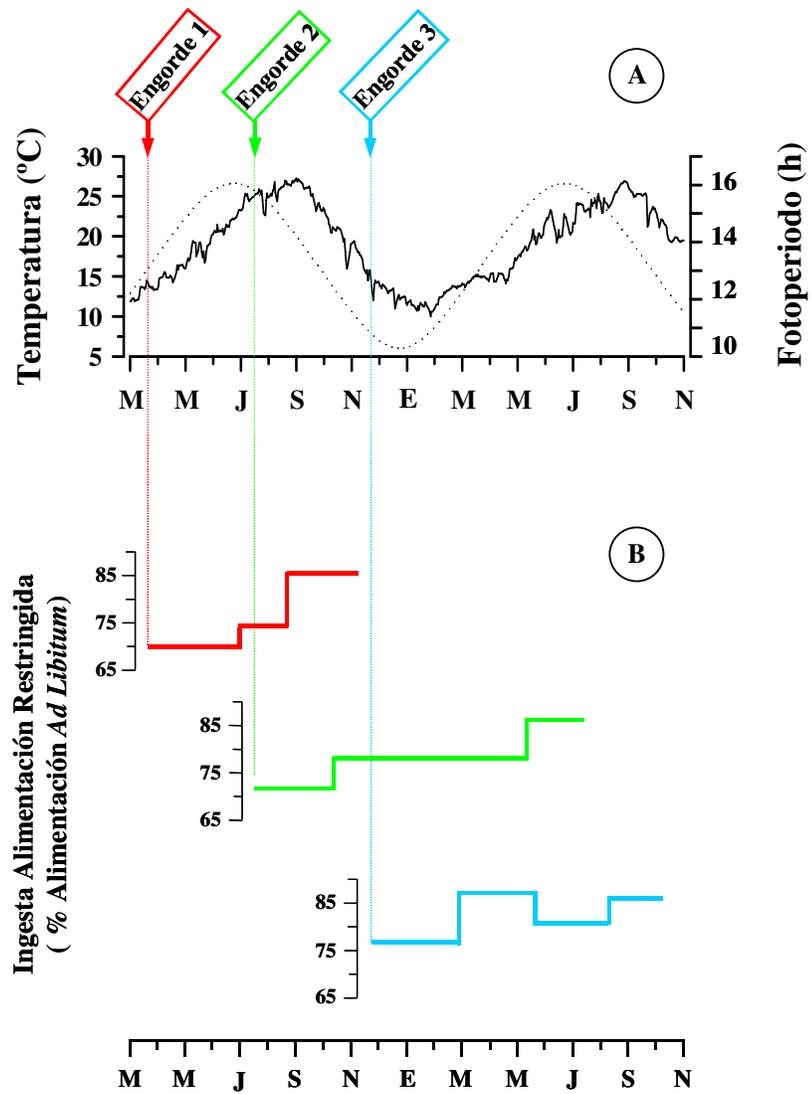


Figura 4.2. (A), Estacionalidad del fotoperiodo (línea de puntos) y temperatura (línea continua) a lo largo del periodo experimental. (B), Patrón de alimentación del grupo RA-1 en los tres engordes (porcentaje de la ración de los animales alimentados *ad libitum*).

4.2.3. Parámetros hormonales y de composición corporal

Los niveles plasmáticos de GH, IGF-I y SL se determinaron mediante radioinmunoensayo (RIA), tal y como se ha descrito en el Capítulo 3 (Apéndices 3.2.5.3 y 3.2.5.4).

Las muestras de composición corporal (homogenados de animales enteros) se liofilizaron para la determinación del contenido de proteínas (Apéndice 4.2.5.1), lípidos (Folch y cols., 1957; Apéndice 4.2.5.2) y cenizas (combustión a 600°C durante 2 horas). Previamente, de cada muestra se tomó una alícuota para la determinación del contenido en agua (deseccación a 105°C durante 24-48 horas).

4.2.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos (media \pm error estándar) se llevó a cabo mediante ANOVA de una o dos vías, seguido del test de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$). Los datos de crecimiento, ingesta, conversión del alimento y composición corporal de cada tanque se tomaron como unidades experimentales.

4.2.5. Apéndices

4.2.5.1. Fundamento de la determinación de proteínas por el Método de Kjeldahl

El fundamento de este método radica en que la mayor parte de los compuestos nitrogenados, al ser calentados en presencia de ácido sulfúrico, se descomponen en forma de amoníaco. Dicho amoníaco se fija mediante ácido bórico en forma de ión amonio. La posterior valoración del borato con ácido clorhídrico, proporciona una medida de la cantidad de nitrógeno presente en la muestra. El proceso consiste en tres etapas:

Digestión o mineralización: En dicho proceso se calienta la muestra a 400°C durante 3 horas en presencia de ácido sulfúrico concentrado (ver Fig. 4.3). Con el fin de acelerar la reacción se añade un catalizador. A temperatura elevada, el carbono de la muestra se oxida a dióxido de carbono por la acción del ácido sulfúrico, el cual se reduce a su vez en dióxido de azufre. El dióxido de azufre es un agente reductor muy potente, capaz de transformar el nitrógeno en su forma más reducida- el amoníaco-.



Figura 4.3. Digestor para el análisis del contenido de nitrógeno en muestras biológicas.

Destilación: Tras dejar enfriar la muestra, se añade un exceso de sosa e inmediatamente se recoge el amoníaco desprendido mediante un espiral refrigerado cuya salida está sumergida en una disolución saturada de ácido bórico (ver Fig. 4.4). Dicho ácido es extremadamente débil, de forma que prácticamente todo el ión borato existente en la disolución proviene de la reacción de este ácido con el amoníaco:



Figura 4.4. Destilador para el análisis del contenido de nitrógeno en muestras biológicas.

Valoración: Se valora el borato existente, mediante una disolución patrón de ácido clorhídrico de normalidad conocida:



Para calcular el porcentaje de nitrógeno existente en la muestra se aplica la siguiente fórmula:

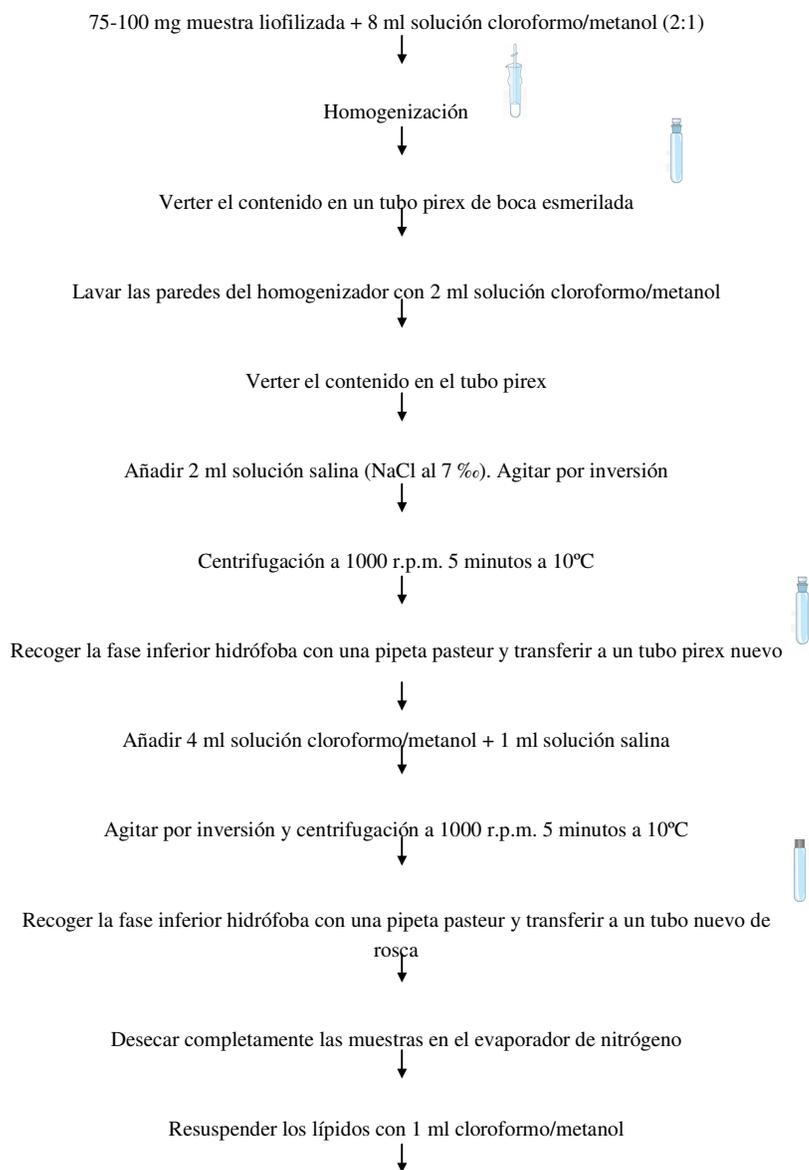
$$\%N = [1,4 \times N \times (V - V_0)] / P$$

Donde, N es la normalidad de la solución de clorhídrico; V es el volumen (en ml) del clorhídrico consumido en la valoración de la muestra; Vo es el volumen (en ml) del clorhídrico consumido en la valoración del blanco; y P es el peso (en gramos) de la muestra.

La estimación del contenido en proteína se calcula aplicando un factor de corrección (6,25):

$$\%P = 6,25 \times \%N$$

4.2.5.2. Protocolo básico de la determinación de lípidos totales por el Método de Folch



Transferir a un vial previamente tarado 



2 Lavados de las paredes del tubo con 200 μ l de solución cloroformo/metanol



Desecar completamente el vial en el evaporador de nitrógeno



Dejar toda la noche el vial en el desecador y pesar al día siguiente

4.3. Resultados

Con independencia del ciclo de engorde, la ingesta global de alimento en los animales con el régimen de alimentación restringida (RA-1) fue aproximadamente del 80% de la registrada en los animales alimentados *ad libitum* (RA-2) (Fig. 4.2). Esta reducción de la ingesta mejoró significativamente el FCR global (engorde 1: $1,21 \pm 0,01$ vs $1,40 \pm 0,05$; engorde 2: $1,30 \pm 0,01$ vs $1,53 \pm 0,02$; engorde 3: $1,13 \pm 0,01$ vs $1,32 \pm 0,02$).

En los tres ciclos de engorde, la restricción inicial de la ingesta disminuyó las tasas de crecimiento. En el engorde 1 (inicio en primavera) y engorde 3 (inicio en otoño), este régimen de restricción del alimento no supuso un incremento posterior de las tasas de crecimiento. En el engorde 2 (inicio en verano), no se detectaron diferencias significativas de crecimiento durante la estación fría, pero en la fase estival (primavera-verano) se observó una aceleración del crecimiento en relación con las tasas de crecimiento mostradas por los animales alimentados a saciedad (Tabla 4.1).

Independientemente del engorde y de la época del año, el contenido corporal de proteínas se mantuvo relativamente constante (15-17%). Por el contrario, la deposición grasa varió entre el 10 y 19%. Este aumento estuvo asociado a una pérdida del contenido en agua (Tabla 4.1). En el engorde 1, la restricción de alimento disminuyó inicialmente el contenido en grasa sin que se detectaran diferencias significativas a lo largo del resto del ciclo de engorde (verano-otoño). En el engorde 2, no se observaron diferencias significativas de contenido graso durante los siete primeros meses de cultivo, aunque en la fase final se puso de relieve una disminución del nivel de adiposidad en el grupo RA-1. En el engorde 3, no se detectó un efecto significativo del régimen de alimentación sobre el contenido graso en ninguno de los tiempos de muestreo.

Tabla 4.1. Ingesta de alimento, peso corporal, coeficiente térmico de crecimiento (TGC), conversión de alimento y composición corporal del engorde 1, 2 y 3. Cada valor es la media \pm error estándar del duplicado de tanques.

	Fecha	Ingesta Alimento (g)	Peso Corporal (g)	TGC x 10 ⁻⁴	FCR	Composición corporal		
						Agua (%)	Proteínas (%)	Lípidos (%)
<i>Ad libitum</i>	24/03/99		25,1 \pm 0,1aX			68,7 \pm 0,4dX	15,8 \pm 0,3aX	10,6 \pm 0,4aX
(RA- 2)	24/06/99	64,8 \pm 0,1aY	81,6 \pm 0,1bY	8,80 \pm 0,01bY	1,17 \pm 0,02	64,5 \pm 0,3cX	15,8 \pm 0,2aX	14,2 \pm 0,5bY
	18/08/99	146,6 \pm 2,2bY	189,5 \pm 1,8cY	10,45 \pm 0,15cX	1,39 \pm 0,03	62,4 \pm 0,4bX	16,4 \pm 0,4abX	15,6 \pm 0,6bcX
	09/11/99	226,3 \pm 0,1cY	348,4 \pm 4,6dY	7,00 \pm 0,01aX	1,48 \pm 0,08	61,3 \pm 0,2aX	16,7 \pm 0,2bX	15,2 \pm 0,2cX
Restringida	24/03/99		25,5 \pm 0,1aX			68,6 \pm 0,3cX	15,8 \pm 0,3aX	10,6 \pm 0,3aX
(RA- 1)	24/06/99	45,3 \pm 0,1aX	70,8 \pm 0,1bX	7,70 \pm 0,01aX	1,01 \pm 0,01	67,6 \pm 0,3cY	15,1 \pm 0,2aX	11,7 \pm 0,9aX
	17/08/99	110,1 \pm 0,2bX	169,0 \pm 0,1cX	10,25 \pm 0,50cX	1,13 \pm 0,01	63,5 \pm 0,3bY	16,4 \pm 0,2abX	14,7 \pm 0,1bX
	09/11/99	195,6 \pm 1,7cX	317,3 \pm 0,5dX	6,90 \pm 0,01aX	1,33 \pm 0,01	62,3 \pm 0,3aY	17,4 \pm 0,2bY	14,9 \pm 0,2bX
ANOVA (<i>P</i> Valor)								
Régimen Alimentación		< 0,001	< 0,001	0,006	0,011	< 0,001	0,788	0,004
Tiempo de muestreo		< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,011	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Interacción		0,014	0,001	0,026	0,518	0,002	0,022	0,026

Engorde 2	Fecha	Ingesta Alimento (g)	Peso Corporal (g)	TGC x 10 ⁻⁴	FCR	Composición corporal		
						Agua (%)	Proteínas (%)	Lípidos (%)
<i>Ad libitum</i>	15/07/99		27,8 ± 0,1aX			67,6 ± 0,1dX	15,1 ± 0,1aX	11,6 ± 0,3aX
(RA-2)	14/09/99	80,7 ± 0,1aY	92,3 ± 0,1bY	9,50 ± 0,01dY	1,29 ± 0,01aY	63,4 ± 0,2cX	16,0 ± 0,1bY	14,9 ± 0,5bX
	09/12/99	102,7 ± 0,1bY	142,1 ± 0,2cY	4,10 ± 0,02aX	1,49 ± 0,01bY	63,2 ± 0,1cX	16,0 ± 0,2bY	14,6 ± 0,2bX
	18/02/00	139,4 ± 1,0dY	188,2 ± 0,2dY	5,20 ± 0,01bX	1,48 ± 0,01bY	63,1 ± 0,2cX	16,2 ± 0,2bY	14,5 ± 0,3bX
	17/05/00	111,5 ± 2,4cY	247,0 ± 0,5eY	3,80 ± 0,10aX	2,03 ± 0,02cY	59,7 ± 0,2bX	16,4 ± 0,1bX	18,1 ± 0,2dY
	14/07/00	178,8 ± 21,1eX	369,8 ± 6,2fY	7,35 ± 0,35cX	1,48 ± 0,06bY	57,9 ± 0,2aX	16,3 ± 0,2bX	19,6 ± 0,2cY
Restringida	15/07/99		27,7 ± 0,1aX			67,6 ± 0,1dX	15,1 ± 0,1aX	11,6 ± 0,3aX
(RA-1)	15/09/99	59,2 ± 0,1aX	80,3 ± 0,1bX	8,20 ± 0,01dX	1,13 ± 0,01aX	63,5 ± 0,7cX	15,1 ± 0,1aX	14,5 ± 0,5bX
	09/12/99	81,5 ± 0,1bX	121,6 ± 0,3cX	4,81 ± 0,05bY	1,18 ± 0,06bX	63,3 ± 0,4cX	15,4 ± 0,1aX	14,6 ± 0,2bX
	17/02/00	109,7 ± 0,7dX	167,3 ± 0,7dX	5,20 ± 0,01cX	1,26 ± 0,01cX	63,1 ± 0,3cX	15,6 ± 0,1aX	14,8 ± 0,3bX
	18/05/00	87,8 ± 0,4cX	220,9 ± 1,5eX	3,75 ± 0,15aX	1,66 ± 0,06dX	61,5 ± 0,2bY	16,5 ± 0,1bX	16,4 ± 0,2cX
	12/07/00	154,1 ± 0,5eX	342,9 ± 0,6fX	8,25 ± 0,15dY	1,26 ± 0,02cX	60,3 ± 0,2aY	16,5 ± 0,1bX	17,1 ± 0,1dX
ANOVA (P Valor)								
Régimen de Alimentación		< 0,001	< 0,001	0,440	< 0,001	< 0,001	0,048	< 0,001
Tiempo de muestreo		< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Interacción		0,007	0,050	0,011	0,032	< 0,001	0,014	< 0,001

Engorde 3	Fecha	Ingesta Alimento (g)	Peso Corporal (g)	TGC x 10 ⁻⁴	FCR	Composición corporal		
						Agua (%)	Proteínas (%)	Lípidos (%)
<i>Ad libitum</i> (RA-2)	22/11/99		22,6 ± 0,1aX			67,1 ± 0,5	16,8 ± 1,1	12,3 ± 0,3
	23/02/00	21,0 ± 0,1aY	37,2 ± 0,1bX	4,4 ± 0,1aY	1,48 ± 0,01	65,4 ± 0,1	15,5 ± 0,2	13,7 ± 0,4
	15/05/00	34,9 ± 0,1bX	66,6 ± 0,1cX	5,6 ± 0,1bX	1,20 ± 0,01	64,1 ± 0,1	15,3 ± 0,2	15,6 ± 0,4
	08/08/00	190,9 ± 3,3cY	222,6 ± 2,9dY	10,8 ± 0,2dX	1,23 ± 0,01	61,4 ± 0,4	16,2 ± 0,2	16,9 ± 0,4
	10/10/00	264,8 ± 9,6dY	411,6 ± 5,4eY	8,9 ± 0,1cX	1,40 ± 0,04	60,4 ± 0,2	17,3 ± 0,2	17,6 ± 0,2
Restringsida (RA-1)	22/11/99		22,7 ± 0,1aX			67,1 ± 0,5	16,8 ± 1,1	12,3 ± 0,3
	22/02/00	15,7 ± 0,1aX	34,4 ± 0,1bX	3,7 ± 0,1aX	1,38 ± 0,01	65,2 ± 0,2	15,6 ± 0,1	13,6 ± 0,4
	16/05/00	29,8 ± 0,1bX	61,8 ± 0,1cX	5,5 ± 0,1bX	1,08 ± 0,01	64,9 ± 0,3	15,1 ± 0,2	14,5 ± 0,5
	07/08/00	150,7 ± 0,3cX	202,4 ± 1,2dX	10,6 ± 0,1dX	1,05 ± 0,01	61,2 ± 0,2	16,5 ± 0,1	17,1 ± 0,1
	11/10/00	217,9 ± 1,1dX	385,9 ± 2,0eX	8,9 ± 0,1cX	1,19 ± 0,01	60,0 ± 0,2	16,9 ± 0,2	17,4 ± 0,2
ANOVA (P Valor)								
Régimen Alimentación		< 0,001	0,004	< 0,001	< 0,001	0,925	0,855	0,318
Tiempo de muestreo		< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
		< 0,001	0,031	< 0,001	0,354	0,765	0,765	0,405

Cuando existe una interacción significativa, se realiza una comparación ANOVA II vías. Las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre los tiempos de muestreo dentro de cada régimen alimenticio (P < 0,05). Las distintas letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los regímenes de alimentación para un mismo tiempo de muestreo.

La Fig. 4.5 resume los cambios observados en el índice de acreción proteica. Independientemente del engorde, este índice disminuyó con el incremento en tamaño de los peces. Los niveles más bajos se registraron en el engorde 2 con peces alimentados a sociedad (RA-2).

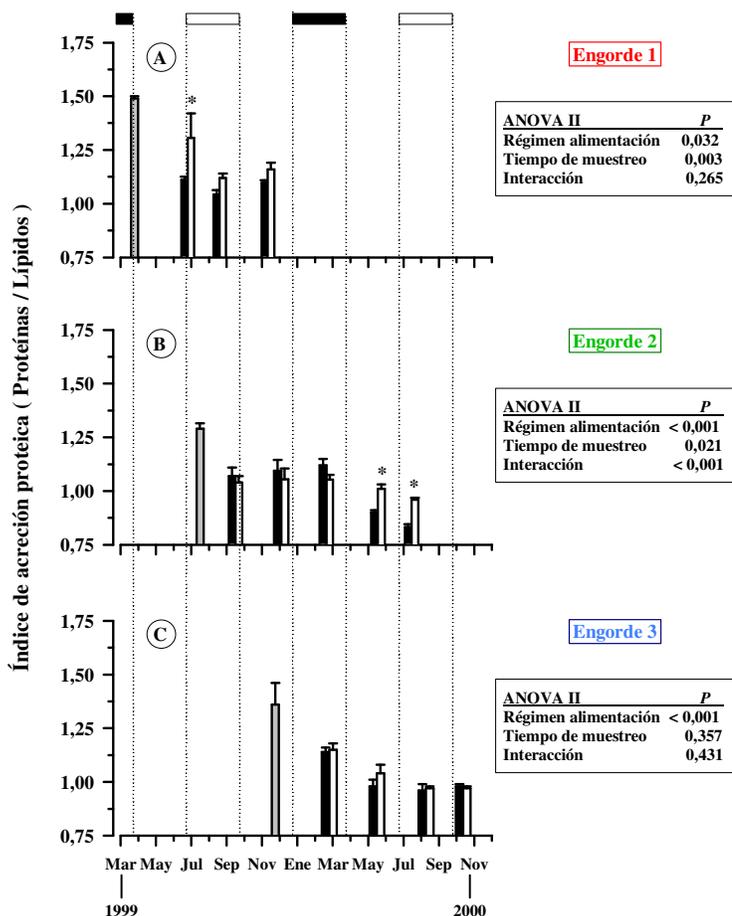


Figura 4.5. Índice de acreción proteica (media \pm error estándar) a lo largo de los ciclos de engorde (A, engorde 1; B, engorde 2; C, engorde 3). Régimen de alimentación: ■, RA-2; □ RA-1. ■, Inicio de la experiencia. La duración del periodo estival e invernal está indicada en la parte superior de la figura. *, Diferencias significativas entre RA-1 y RA-2 en cada tiempo de muestreo (P <0,05).

Los niveles plasmáticos de GH variaron estacionalmente, observándose los niveles más bajos durante la estación fría (Fig. 4.6). En el engorde 1, los animales de los dos regímenes de alimentación mostraron altas concentraciones de GH al inicio del verano, pero este pico de GH fue más persistente en RA-1. Un patrón similar se observó en el engorde 2 al final del ciclo (estación cálida), siendo los niveles plasmáticos de GH mayores en el grupo RA-1 que en el RA-2. En el engorde 3, no se registraron diferencias significativas entre los dos grupos en ningún tiempo de muestreo.

Independientemente del ciclo de engorde, los niveles plasmáticos de IGF-I mostraron cambios estacionales estadísticamente significativos, siguiendo el patrón de las variaciones circanuales de crecimiento (Fig. 4.7). No se observó un efecto significativo del régimen de alimentación en los engordes 1 y 2. En el engorde 3, los peces alimentados de forma restringida mostraron un descenso transitorio durante la primavera en comparación con los homólogos del RA-2.

En la Fig. 4.8 se muestra la interacción entre el régimen de alimentación y el inicio del ciclo de engorde con los niveles plasmáticos de SL. En el engorde 1, durante la estación cálida no se observó ningún efecto significativo del régimen de alimentación. Sin embargo, a mitad del otoño, los niveles plasmáticos de SL en los peces de alimentación restringida permanecieron sin cambios, mientras que en los peces de alimentación *ad libitum* (RA-2) se produjo un marcado incremento. En el engorde 2, también se observó este incremento otoñal de las concentraciones plasmáticas de SL en ambos grupos de alimentación. Sin embargo, en el grupo de alimentación *ad libitum*, dicho incremento ya se detectó al final de la estación cálida, mientras que los peces de alimentación restringida mantuvieron sus concentraciones plasmáticas de SL relativamente bajas durante este periodo. En el engorde 3, el rango de variación a lo largo del año fue mucho menor y el régimen de alimentación no alteró de forma significativa los niveles plasmáticos de SL.

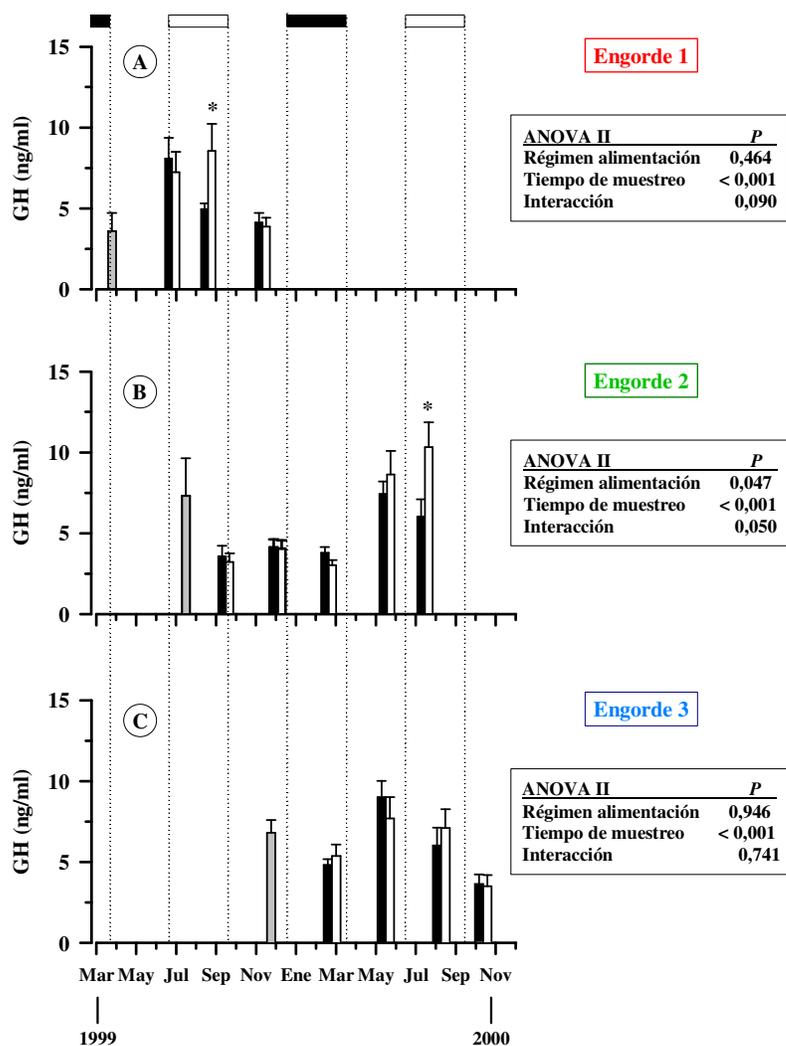


Figura 4.6. Cambios estacionales de los niveles plasmáticos de GH (media \pm error estándar). A, engorde 1; B, engorde 2; C, engorde 3. Régimen de alimentación: ■, RA-2; □ RA-1. ■, Niveles de GH a tiempo cero. La duración del periodo estival e invernal está indicada en la parte superior de la figura. *, Diferencias significativas entre RA-1 y RA-2 en cada tiempo de muestreo ($P < 0,05$).

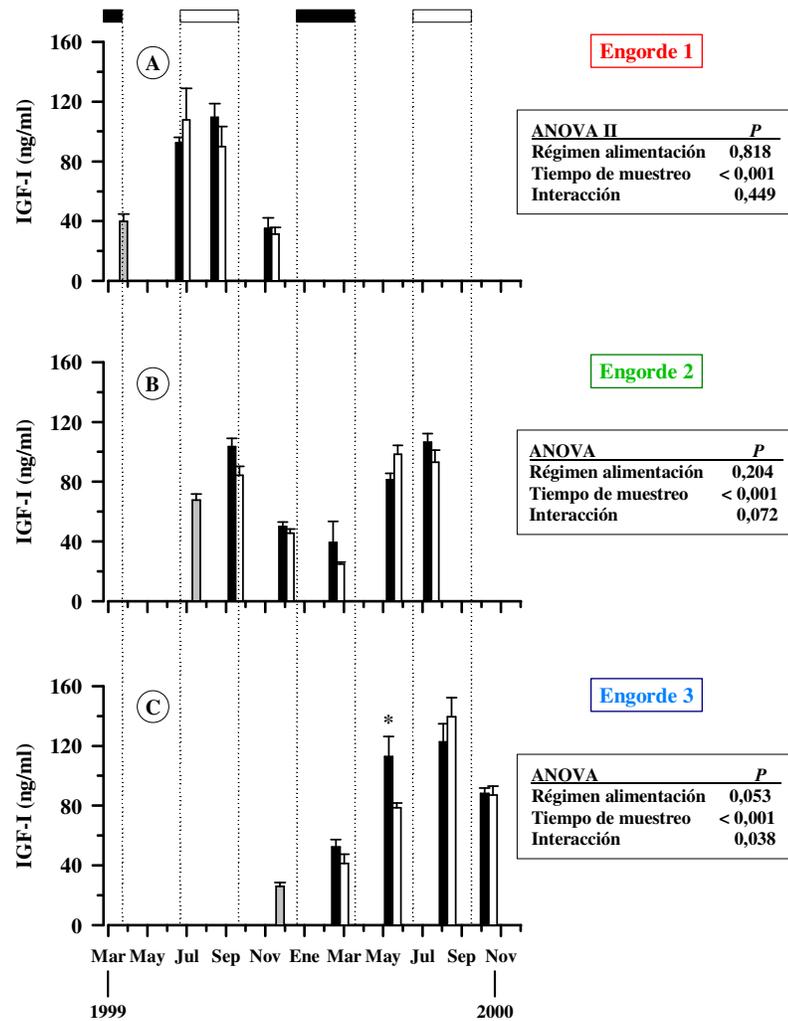


Figura 4.7. Cambios estacionales de los niveles plasmáticos de IGF-I (media \pm error estándar). A, engorde 1; B, engorde 2; C, engorde 3. Régimen de alimentación: ■, RA-2; □ RA-1. ■, Niveles de IGF-I a tiempo cero. La duración del periodo estival e invernal está indicada en la parte superior de la figura. *, Diferencias significativas entre RA-1 y RA-2 en cada tiempo de muestreo ($P < 0,05$).

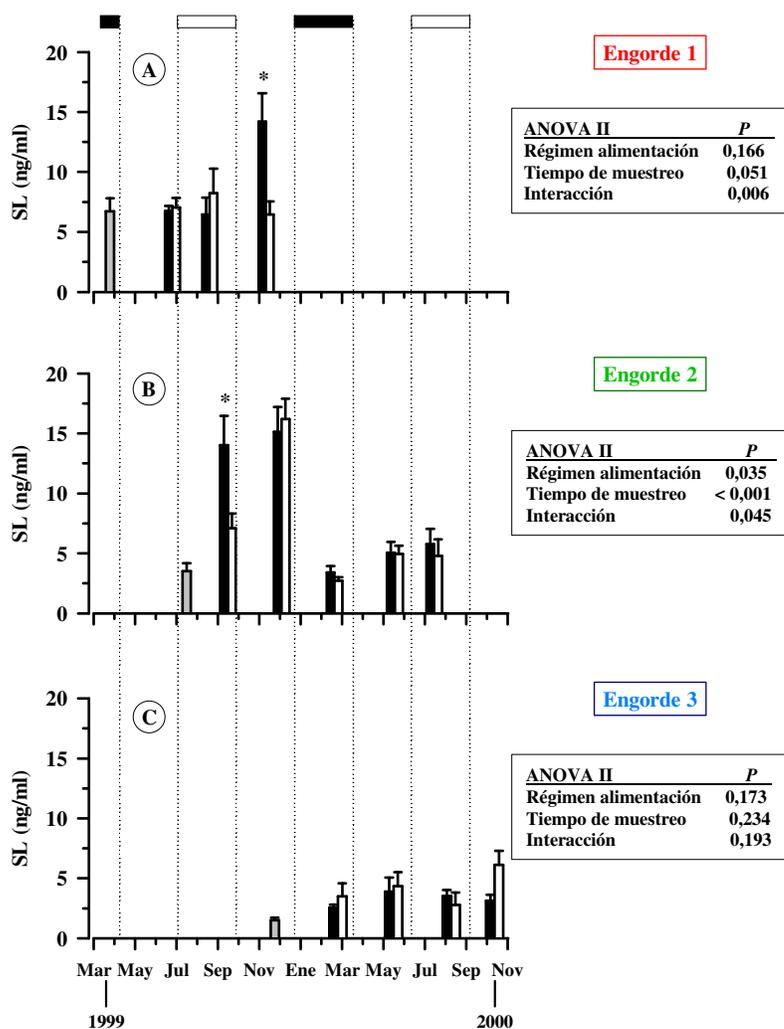


Figura 4.8. Cambios estacionales de los niveles plasmáticos de SL (media \pm error estándar). A, engorde 1; B, engorde 2; C, engorde 3. Régimen de alimentación: ■, RA-2; □ RA-1. ■, Niveles de SL a tiempo cero. La duración del periodo estival e invernal está indicada en la parte superior de la figura. *, Diferencias significativas entre RA-1 y RA-2 en cada tiempo de muestreo ($P < 0,05$).

4.4. Discusión

Una de las cuestiones pendientes en la producción de muchas especies acuícolas es la adecuación de las pautas de alimentación al potencial de crecimiento. El uso de dietas hiperenergéticas ha facilitado el rápido crecimiento en algunas especies. Sin embargo, doradas alimentadas *ad libitum* con este tipo de dietas presentan un notable incremento de la adiposidad y una pobre conversión del alimento (Martí-Palanca y cols., 1996). Un estudio reciente ha puesto de relieve en esta misma especie que muchos de estos efectos no deseados se ven sensiblemente mitigados con la restricción del alimento, lo que pone mayor énfasis, si cabe, en la importancia de la optimización del patrón de ingesta (Company y cols., 1999a).

En el presente estudio, una vez alcanzada la talla comercial, la restricción del alimento sólo supuso una ligera disminución de la biomasa final (>7%). Sin embargo, la conversión final del alimento mejoró aproximadamente en un 15% en todos los ciclos de engorde. Se podría pensar que ello es simplemente consecuencia de una menor pérdida de alimento no ingerido. No obstante, si ello fuese así, difícilmente se puede explicar que los cambios de contenido graso de los animales en cultivo estén correlacionados tanto con la restricción de la ingesta como con la época del año y/o ciclo de engorde. Así pues, en el engorde 3, la restricción más severa de la dieta tuvo lugar durante el invierno y en ningún tiempo de muestreo se detectaron efectos significativos sobre la composición corporal. Por el contrario, en el engorde 1, la restricción en primavera redujo el contenido de grasas corporales y, en este grupo, el índice de acreción proteica permaneció alto a principios de verano. De forma similar, al final de la primavera e inicio del verano, este índice fue menor al final del engorde 2 en peces de alimentación restringida.

La movilización y distribución de los lípidos corporales también varía estacionalmente en salmónidos (Bell, 1998), y posiblemente existen unos determinados valores críticos para desencadenar un determinado proceso fisiológico (Shearer y

Swanson, 2000; Silverstein y cols., 1997; 1998). En la dorada y otras especies típicamente marinas, este campo permanece todavía prácticamente inexplorado, por lo que se requieren estudios específicos para determinar en qué medida el inicio de la pubertad y la mejora de la calidad del producto final pueden ser modulados por el nivel de adiposidad y el régimen de alimentación. En este contexto, experiencias llevadas a cabo en colaboración con el IATA (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos) han puesto de manifiesto que las propiedades físicas y organolépticas de doradas en cultivo se ven escasamente afectados por una restricción moderada de la ingesta. Sin embargo, los grupos de alimentación RA-1 suelen proporcionar una mayor sensación de frescura, lo que estaría correlacionado con un nivel menor de adiposidad de los animales finalmente destinados al consumo (Pérez y cols., 2002).

Al igual que en el Capítulo 3, los engordes llevados a cabo en el presente estudio confirmaron que el otoño (engorde 3) es la época más propicia- en nuestra latitud- para el inicio de los ciclos de engorde en dorada. Ello no es sorprendente, dado que éste es el que mimetiza en mayor medida el ciclo de crecimiento de la dorada en el medio salvaje. Así pues, la presión evolutiva debe haber ajustado convenientemente la acreción proteica y la reposición de las reservas energéticas a las variaciones estacionales de temperatura y fotoperiodo. De acuerdo con ello, la restricción de la ingesta en el engorde 3 no modificó el nivel de adiposidad en ninguno de los puntos de muestreo. Por el contrario, la restricción de la ingesta comportó cambios significativos en el nivel de adiposidad en los engordes 1 y 2, siendo ello más evidente en el engorde 3 (inicio y final en verano).

En relación con los niveles plasmáticos de GH, IGF-I y SL, los resultados obtenidos también están en consonancia con los mostrados en el Capítulo 3. Así pues, los niveles de GH circulante aumentaron durante la estación cálida con independencia del ciclo de engorde y del régimen de alimentación. Como era de esperar, los niveles circulantes de IGF-I aumentaron con el incremento estival de las tasas de crecimiento. Asimismo, se confirmó el claro incremento otoñal de la SL, lo que corrobora una vez más la diferente regulación de

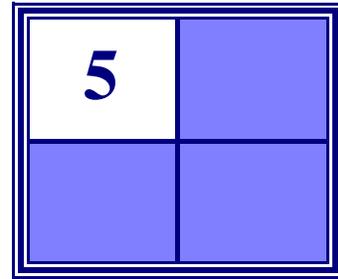
GH y SL. Ahora bien, la incidencia del régimen de alimentación sobre cada una de estas variables depende tanto del ciclo de engorde como del parámetro en cuestión.

No podemos obviar que el régimen de alimentación afecte de alguna manera a las IGF-BPs y, en consecuencia, a la fracción libre de IGF-I circulante (biológicamente activa). En cualquier caso, ello no es atribuible a cambios en la fracción total de IGF-I. Por el contrario, la restricción de alimento durante la fase primaveral en los engordes 1 y 2 comportó un incremento de la amplitud del pico de GH, lo que supuso una mayor persistencia de niveles altos de GH circulante durante la fase estival. En este contexto, debemos recordar, una vez más, que la GH ejerce una acción estimuladora del crecimiento en todos los vertebrados estudiados hasta la fecha (Le Bail y cols., 1993). De ahí que, en las últimas décadas, se hayan obtenido transgénicos de GH como una de las vías para acelerar el crecimiento en salmónidos (Du y cols., 1992; Devlin y cols., 1994; Mori y Devlin, 1999; Pitkanen y cols., 1999; Devlin y cols., 2001), tilapia (Martínez y cols., 1996; Rahman y cols., 1998) y otras especies de peces (Dunham y cols., 1987; Houdebine y cols., 1991; Rosochaki y cols., 1993; Nam y cols., 2001). No obstante, de forma natural, el incremento de los niveles circulantes de GH también se da en animales energéticamente comprometidos. Este incremento es consecuencia, al menos en parte, de la reducción del *feedback* negativo de la IGF-I hepática sobre la secreción hipofisaria de GH (ver Pérez-Sánchez, 2000). Esto a su vez, suele ser fiel reflejo de la desensibilización del hígado a la acción anabólica de la GH, lo que se pone de manifiesto con la disminución de la transcripción hepática de RGHs y de IGF-I (ver Gómez-Requeni y cols., 2004).

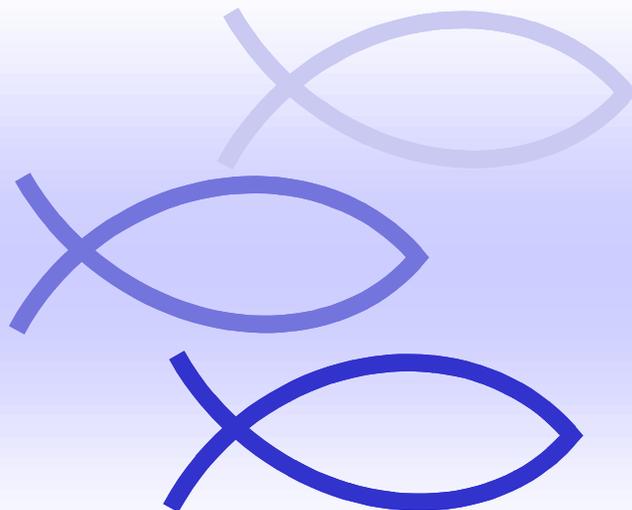
De acuerdo con estas premisas, la mayor amplitud del ciclo de GH- que va acompañado de cambios en el contenido graso del animal- debe interpretarse como una mayor demanda energética, fruto de la restricción de la ingesta en determinados periodos- *critical windows*- del ciclo de engorde. Por el contrario, el incremento estacional de la SL, tal y como se apuntaba en el capítulo anterior, debe ser percibida por el animal como una señal de adiposidad más que de demanda energética. Esta hipótesis de trabajo se ve corroborada en el presente modelo

experimental, al observarse en el engorde 1 y, más claramente, en el engorde 2, que la restricción de alimento comporta un retraso del pico estacional de SL.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, la manipulación del régimen de alimentación, y concretamente la restricción moderada de la ingesta, puede ser especialmente beneficiosa en los ciclos de engorde más alejados del modelo salvaje. Ello puede representar una herramienta de interés para minimizar a escala industrial el impacto medio ambiental de las explotaciones marinas. Así como preservar un determinado contenido graso, sin detrimento del alto valor comercial y de los efectos beneficiosos derivados de estas estrategias de alimentación sobre el estado inmunopatológico de los animales en cultivo (Capítulo 5).



**Efecto del régimen de alimentación sobre el estado
inmunopatológico de animales en cultivo**



- 5.1. Introducción
- 5.2. Material y métodos
 - 5.2.1. Animales y diseño experimental
 - 5.2.2. Muestreos
 - 5.2.3. Análisis histopatológico
 - 5.2.4. Análisis inmunológico
 - 5.2.5. Análisis estadístico
- 5.3. Resultados
 - 5.3.1. Análisis parasitológico
 - 5.3.2. Mortalidades y análisis bacteriano
 - 5.3.3. Análisis histopatológico
 - 5.3.4. Análisis inmunológico
- 5.4. Discusión

RESUMEN. En este capítulo se estudió la posible influencia del régimen de alimentación sobre el estado inmunopatológico de la dorada en dos experiencias de engorde con inicio en distinta época del año (engorde 1 = Marzo; engorde 2 = Junio). El estudio histopatológico incluyó un examen parasitológico y bacteriológico. Como mecanismos de defensa inespecíficos se analizó el estallido respiratorio en leucocitos aislados de riñón anterior, la lisozima sérica y la actividad hemolítica del complemento por la vía alternativa (ACH_{50}). De acuerdo con ello, el estado de inmunocompetencia no sólo no fue perjudicado por la restricción del alimento, sino que aparentemente se vio activado en algunos aspectos. No se detectaron diferencias en cuanto a la prevalencia de infecciones bacterianas, siendo *Vibrio harveyi* una de las más prevalentes, especialmente en los meses cálidos. Los peces con régimen de alimentación restringida mostraron menos alteraciones histopatológicas en hígado e intestino, una mortalidad significativamente más baja y una menor prevalencia de infecciones parasitarias; excepto para el caso de *Cryptosporidium molnari*.

Parte de los resultados expuestos en este capítulo han sido publicados en la revista *Aquaculture* (2003) **220**, 707-724.

5.1. Introducción

La mayor parte de especies de peces susceptibles de cultivo en países desarrollados (carnívoros) usan preferentemente las proteínas de la dieta como fuente de energía (Kaushik y Cowey, 1991). No obstante, existe un cierto margen de maniobra para sustituir las proteínas por lípidos, por lo que uno de los objetivos en acuicultura –a lo largo de los últimos años- ha sido promover el desarrollo de dietas hiperenergéticas (alto contenido graso). En el caso de los salmónidos se han llegado a utilizar a escala industrial dietas con un nivel de inclusión de grasa superior al 30% (Bell, 1998; Nordgarden y cols., 2002). En la dorada, este nivel de inclusión es más limitado (Martí-Palanca y cols., 1996; Company y cols., 1999a). En cualquier caso, el volumen de los depósitos grasos, su localización y composición son aspectos que repercuten negativamente en la calidad del producto final, ya que ello modifica el valor nutricional, las propiedades organolépticas, así como el grado de preservación y valoración de un producto finalmente destinado al consumo humano (Sheehan y cols., 1996; Gjedrem, 1997; Einen y Skrede, 1998).

Otro efecto no deseado del excesivo nivel de adiposidad son las consecuencias que de ello se derivan sobre el estado de inmunocompetencia (Balfry y Higgs, 2001). De hecho, el uso de regímenes de alimentación que implican periodos de privación de alimento ha sido una estrategia utilizadas para aumentar el grado de resistencia ante determinadas enfermedades o procesos infecciosos. Así pues, Kim y Lovell (1995) con la introducción de ciertos periodos de ayuno, consiguieron aumentar en pez gato el grado de resistencia entérica. En esta misma especie, Okwoche y Lovell (1997) obtuvieron resultados similares frente a otros agentes patógenos. Por tanto, el estado nutricional del huésped puede modificar las posibilidades de éxito de determinados agentes infecciosos, bien sea por los efectos sobre el estado de inmunocompetencia y/o por el retraso sobre la capacidad proliferativa/infecciosa del agente patógeno (Lall, 1988).

Todo ello proporciona una evidencia clara de que la manipulación de la composición de la dieta y/o régimen de alimentación representa una herramienta útil con la que incidir sobre el crecimiento, el estado de inmunocompetencia y la capacidad de respuesta frente a determinados procesos infecciosos capaces de hacer peligrar el rendimiento del cultivo en explotación. De acuerdo con estas premisas, el objetivo de este apartado fue abordar el efecto de algunas de las estrategias de alimentación propuestas en el Capítulo 4 sobre los siguientes aspectos:

- 1) Estado de inmunocompetencia.
- 2) Intensidad y prevalencia de agentes patogénicos.
- 3) Función hepática (esteatosis).
- 4) Integridad gastrointestinal.

5.2. Material y Métodos

5.2.1. Animales y diseño experimental

Nada más llegar a las instalaciones de cultivo del IATS, juveniles de dorada procedentes del mismo stock atlántico (FMD, Burdeos) se muestrearon para el análisis parasitológico y bacteriológico. Tras este primer muestreo, los animales se distribuyen aleatoriamente en tanques de fibra de vidrio de 2,4 m de diámetro y 0,6 m de altura, y fueron alimentados a saciedad durante 2-3 semanas (periodo de aclimatación).

De los ciclos de engorde abordados en el Capítulo 4, en este estudio sólo se siguieron los engordes 1 y 2 (engorde 1: marzo 1999 a octubre 1999; engorde 2: julio 1999 a julio del 2000). Tal y como se detalla en el capítulo anterior, en cada engorde se establecieron dos regímenes de alimentación:

- RA-1: Régimen de alimentación restringida.
- RA-2: Régimen de alimentación a saciedad visual (*ad libitum*).

La ración de los grupos RA-1 en cada ciclo de engorde se ajustó diariamente para asegurar un comportamiento activo de la ingesta –ingesta de comida en la superficie del agua- (Fig. 5.1).

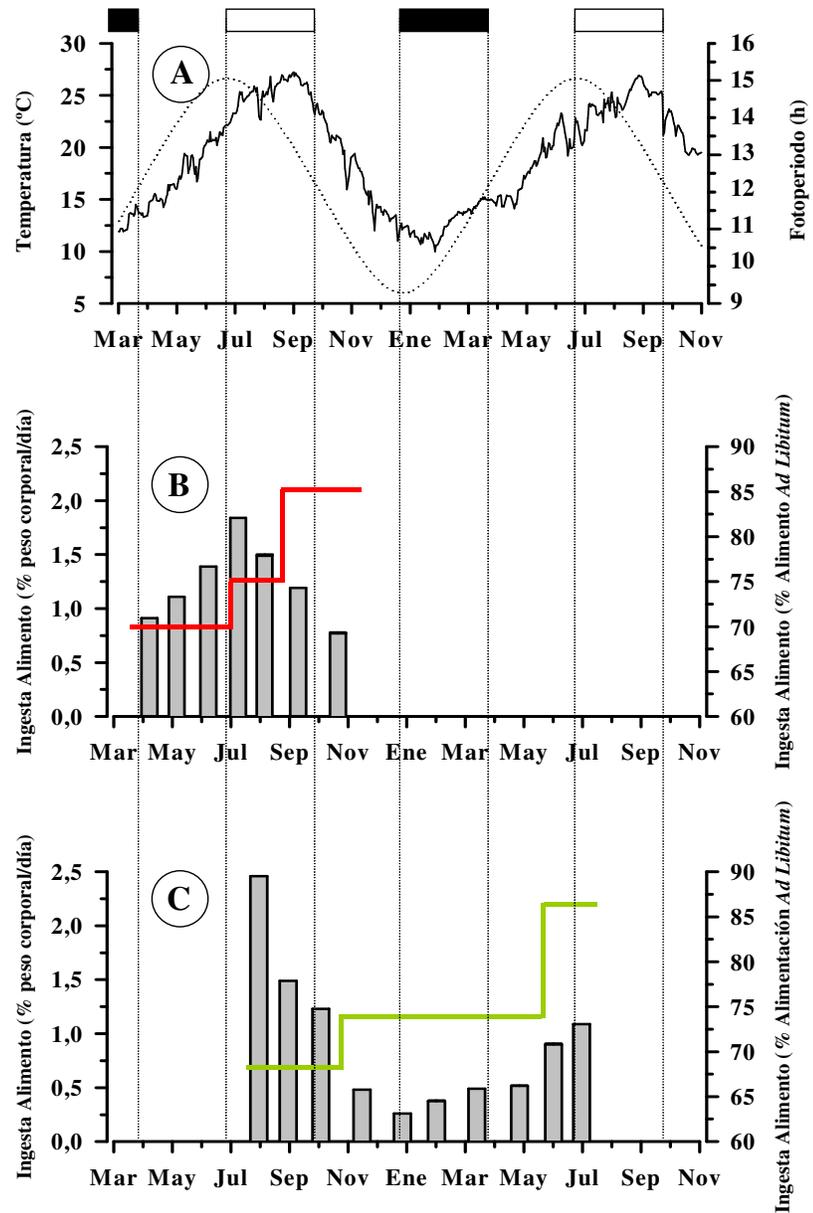


Figura 5.1. (A), Estacionalidad del fotoperiodo (línea de puntos) y temperatura (línea sólida) a lo largo del periodo experimental. Patrón de alimentación del grupo RA-1 en el engorde 1 (B) y 2 (C). La ingesta está representada en tanto por ciento del peso corporal (barras) y como porcentaje de la ración de los animales alimentados *ad libitum* (líneas). La duración del periodo estival e invernal está indicada en la parte superior de la figura

5.2.2. Muestreos

Las Tablas 5.1 y 5.2 muestran el programa de muestreos y el peso medio de los animales a lo largo de la experiencia.

Nada más llegar los animales a nuestras instalaciones, 20 peces fueron elegidos al azar para ser sacrificados y comprobar así su estado patológico inicial. Posteriormente, cada tres o cuatro meses, se muestrearon 20 peces de cada grupo para su análisis histológico y parasitológico (a los 6 y 12 meses para los engordes 1 y 2, respectivamente). El examen bacteriológico también se realizó cuando se dieron casos de mortalidad y/o morbilidad.

En los ensayos de estallido respiratorio -con leucocitos aislados de riñón anterior- se sacrificaron ocho peces de cada régimen de alimentación al final del periodo de engorde. En el engorde 2, se realizó un muestreo extra a los 6 meses de la entrada de los animales.

Al final de los engordes, se extrajo sangre de 15 peces por grupo experimental mediante punción de los vasos caudales. El suero fue congelado a -80°C hasta su posterior análisis.

Tabla 5.1. Peso corporal (media \pm error estándar) de las doradas muestreadas a lo largo de los engordes 1 y 2.

Engorde	Tiempo de muestreo (Fecha / meses desde la entrada)		Régimen de Alimentación (RA)	Peso (g)
1	Mar 99	0	-	21,26 \pm 0,76
			1	65,73 \pm 3,48
	Jun 99	3	2	79,60 \pm 3,17
			1	273,22 \pm 11,82
	Sep 99	6	2	299,06 \pm 11,53
2	Jun 99	0	-	9,06 \pm 0,32
			1	75,50 \pm 2,54
	Sep 99	3	2	94,51 \pm 3,37
			1	147,41 \pm 5,52
	Dic 99	6	2	167,00 \pm 10,71
			1	186,63 \pm 8,74
	Abr 00	9	2	213,11 \pm 10,71
			1	344,80 \pm 7,93
	Jul 00	12	2	373,93 \pm 15,99

Tabla 5.2. Calendario de muestreo (en meses) para cada tipo de examen desde la entrada a las instalaciones de cultivo (MM = suceso de mortalidad o morbilidad).

Tipo de estudio	Engorde	
	1	2
Histopatológico	0, 3, 6	0, 3, 6, 9, 12
Parasitológico	0, 3, 6	0, 3, 6, 9, 12
Bacteriológico	0, MM	0, MM
Inmunológico		
Ensayo serológico	6	12
Ensayo celular	6	6, 12

5.2.3. Análisis histopatológico

Se estudiaron posibles daños histopatológicos en diferentes órganos, especialmente hígado e intestino. Con este propósito, se fijaron porciones de tejido en tampón formalina al 10%, y, tras ser embebidos en resina Technovit-7100 (Kulzer, Heraeus, Alemania), los cortes (1-3 μm) se tiñeron con azul de toluidina (TB).

La presencia de parásitos se analizó tras el examen en fresco de los tejidos. La prevalencia de infección de cada parásito se calculó como el porcentaje de peces infectados en cada grupo de muestreo. La intensidad de infección se evaluó semi-cuantitativamente de acuerdo con una escala de 1+ a 6+. Esta escala estuvo basada en el número de estadios parasitarios en el campo del microscopio a 300x.

Las muestras para análisis bacteriológico de riñón anterior, obtenidas siguiendo los procedimientos de esterilidad estándar, se sembraron en placas de agar marino (AM) (Scharlau Chimie) o en placas con ATS (Agar Tríptico de Soja) suplementado con 1,5% de NaCl (Scharlau Chimie). En los peces enfermos se recogieron muestras adicionales procedentes del hígado y riñón anterior, así como de heridas o úlceras externas después de un lavado con etanol al 70%. Las placas se incubaron a 20-25°C durante 48-72 h. Tras una primera selección de las colonias, éstas se incubaron de nuevo 10 días. El crecimiento para cada colonia fue contabilizado como sigue: 0 = ausencia de crecimiento, 0-1 = trazas de crecimiento (de 1 a 9 colonias), 1-4 = crecimiento significativo (10 o más colonias).

La identificación de las colonias bacterianas se realizó después de la purificación por siembra repetida en placas de AM y diagnóstico fenotípico. Ello supuso determinaciones de: reacción Gram, oxidasa, requerimiento de Na^+ , luminiscencia, pigmentación, metabolismo fermentativo de la glucosa, arginina hidrolasa, lisina y ornitina descarboxilasa, producción de indol, reacción de Voges-Proskauer, fermentación de la sucrosa en placas de agar con tiosulfato-citrato-sales biliares-sucrosa (TCBS), crecimiento a 4 y 40°C, hidrólisis de caseína, alginato y

almidón. Así como el uso de las siguientes fuentes de carbono y energía: L-arabinosa, D-xilosa, D-manosa, D-celobiosa, sucrosa, lactosa, D-melibiosa, D-sorbitol, D-gluconato, D-glucuronato, 2-cetoglutarato, 3-hidroxitirato y putrescina.

Como características adicionales, en algunas cepas se determinó: morfología y motilidad celular en preparaciones en fresco, actividad catalasa, reducción de nitrato a nitrito, producción de gas procedente de la fermentación de la glucosa y la utilización de compuestos orgánicos como fuentes únicas de carbono adicionales (hasta 60). La conservación de las bacterias aisladas se realizó en tubos con agar marino semisólido a temperatura ambiente y en oscuridad. Para la conservación a largo plazo, estas bacterias se mantuvieron a -80°C en caldo marino y 20 % de glicerol.

5.2.4. Análisis inmunológico

Lisozima sérica: Se analizó mediante análisis turbimétrico (Ellis, 1990) adaptado a placas de 96 pocillos. De forma breve, el *Micrococcus lysodeikticus* liofilizado (0,3 mg/ml) (Sigma) en tampón fosfato sódico 0,05 M pH =6,2, se utilizó como sustrato para la lisozima sérica. El suero, por triplicado y diluido 1:2 (10 μ l) se añadió a 200 μ l de una suspensión bacteriana. Después de 0,5 y 4,5 minutos, se midió la absorbancia a 450 nm. Una unidad de actividad lisozima se definió como la cantidad de enzima que provoca un descenso en la absorbancia de 0,001 por min.

Complemento sérico: Se utilizaron eritrocitos de oveja para la determinación de la lisis por la vía alternativa del complemento (VAC). Los eritrocitos fueron obtenidos de sangre defibrinada de oveja (SRBC, Biomedics, España), y utilizados durante un periodo máximo de 4 días. El SRBC fue lavado tres veces con tampón veronal salino (VBS), y diluido en VBS-EGTA (VBS, enriquecido con Mg^{2+} y EGTA, pH =7,6) a una concentración final de $2,5 \times 10^8$ células/ml. Los triplicados diluidos en VBS-EGTA (100 μ l) se mezclaron con 25 μ l de SRBC en placas de 96 pocillos. Las placas se incubaron durante 100 minutos a 20°C en agitación constante y después se centrifugaron durante 5 minutos a 1250 g (4°C) para eliminar el SRBC sobrante. El sobrenadante (100 μ l) de cada pocillo se pipeteó cuidadosamente a una placa de 96 pocillos y se leyó la absorbancia a 415 nm. El valor de Y (porcentaje de SRBC lisado en cada dilución) fue definido de igual forma que en Sunyer y Tort (1995). El factor de dilución del suero, X , se representó de forma logarítmica vs Y , utilizando la ecuación de Von Krogh, $\log X$ vs. $\log Y/(1-Y)$. La ACH_{50} se definió como la dilución con un 50% de hemolisis.

Actividad del estallido respiratorio: Las preparaciones enriquecidas de leucocitos de riñón anterior se obtuvieron por medio del procedimiento descrito por Muñoz y cols. (1998). Las células fueron ajustadas a una concentración de 10×10^6 células/ml en medio L-15 (medio Leibovitz, enriquecido con NaCl al 0,1%, BioWhittaker), tras lo cual se pipetearon 50 μ l en

placas de 96 pocillos. La producción de anión superóxido se midió mediante la prueba del *nitroblue tetrazolium* (NTB), con la adaptación de Muñoz y cols. (2000): Las células se incubaron con 50 µl de solución NBT (2 mg/ml, Sigma) o bien con 50 µl de NBT y acetato mirístico de forbol (PMA, 2 µg/ml, Sigma) durante 1 hora a 22-24°C en cámara húmeda. Se hicieron tres réplicas para cada pez y la reacción se paró por fijación de las células en metanol. Después de lavar dos veces con metanol al 70%, los pocillos se secaron al aire y el formazán resultante (insoluble) se disolvió con 120 µl de NaOH 2 M y 140 µl de dimetil sulfóxido (Sigma). La lectura de absorbancia se realizó a 620 nm.

5.2.5. Análisis estadístico

Para analizar el efecto del régimen de alimentación sobre la prevalencia de infección de patógenos se utilizó el test ji-cuadrado ($P < 0,05$) (Sokal y Rohlf, 1981). Este test también se utilizó para analizar la asociación entre mortalidades y régimen de alimentación. Las diferencias en lisozima sérica y actividad del complemento entre los grupos experimentales se analizaron mediante ANOVA de una vía o ANOVA por rangos, seguidos del test Student-Newman-Keuls o el test de Dunn, respectivamente. El test t-Student se utilizó para analizar las diferencias de estallido respiratorio entre los dos regímenes de alimentación ($P < 0,05$).

5.3. Resultados

5.3.1. Análisis parasitológico

Al inicio de cada engorde no se detectaron niveles significativos de parásitos en los peces analizados. La figura 5.2 muestra la prevalencia e intensidad de infección en los muestreos posteriores. La clamidia *Epitheliocystis* fue el único patógeno encontrado en branquias. Entre los endoparásitos, el mixosporidio *Leptotheca sparidarum* fue uno de los más prevalentes en el engorde 1, mientras que los coccidios (*Eimeria sparis*, *Goussia sparis*) y los microsporidios fueron raros.

Cuando se agruparon los datos de los engordes 1 y 2 según el régimen de alimentación, la intensidad de la infección fue muy parecida en ambos casos. Sin embargo, todos los parásitos mostraron una mayor prevalencia de infección en los grupos RA-2, excepto el coccidio *Cryptosporidium molnari* (Fig. 5.3). En cualquier caso, este coccidio no se detectó en el engorde 1, y todos los peces positivos aparecieron en un sólo muestreo en el engorde 2 (9 meses después de la entrada en las instalaciones de cultivo).

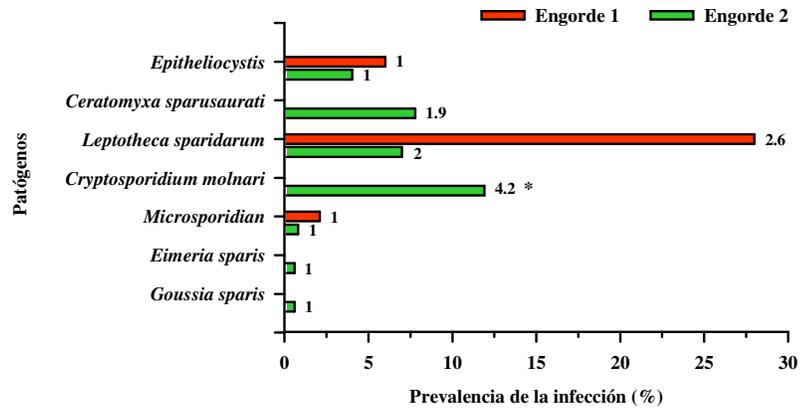


Figura 5.2. Prevalencia (barras) e intensidad (número al lado de cada barra) de infección de los patógenos detectados en las dos experiencias de engorde. *, muestra la significación (P <0,05) de la asociación entre prevalencia de infección y régimen de alimentación.

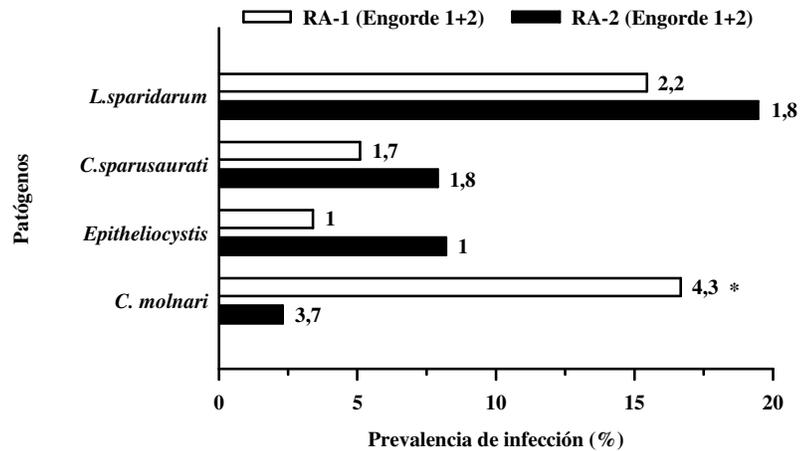


Figura 5.3. Prevalencia (barras) e intensidad (número al lado de cada barra) de infección de los patógenos más prevalentes en cada régimen de alimentación. Los datos de los engordes 1 y 2 se han fusionado para un mismo régimen de alimentación. *, muestra la significación (P <0,05) de la asociación entre la prevalencia de infección y régimen de alimentación.

5.3.2. Mortalidades y análisis bacteriano

En el tiempo cero (entrada de los animales en las instalaciones de cultivo del IATS), el crecimiento en los aislamientos bacterianos fue significativo en el 35,3% (engorde 1) y 50% (engorde 2) de los animales muestreados. En el engorde 1, las bacterias predominantes fueron: *V. fisheri*, *V. harveyi*, *V. splendidus*, *V. ichthyenteri-like*, *Vibrio sp.*, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* y *Pseudoalteromonas haloplanktis*. En el engorde 2, *V. harveyi* fue la bacteria predominante (70%), seguida de *Vibrio ichthyenteri-like* (40%); mientras que *V. fisheri* y *Marinomonas vaga* tuvieron escasa presencia (10%). En todos los casos, la intensidad del crecimiento bacteriano nunca fue mayor de 2.

La tasa de mortalidad -engordes 1 y 2- durante el transcurso de la experiencia fue mayor en los peces del grupo RA-2 que en los peces procedentes de los grupos RA-1. El estudio estadístico mostró una asociación entre la tasa de mortalidad y el régimen de alimentación en el engorde 1 (1,5 % vs 4,1 %) para un nivel de significatividad de $P < 0,05$. En cualquier caso, las mortalidades registradas fueron bajas, proporcionando un número pequeño de peces sintomáticos o moribundos para la realización de aislamientos bacterianos. A pesar de ello, *Ph. damsela* subsp. *damsela* se aisló en todos los peces con crecimiento bacteriano significativo, pero nunca como cultivo puro. Por el contrario, *Vibrio harveyi* estuvo presente en el 31% de los aislamientos bacterianos de forma pura y otros vibrios mostraron porcentajes más bajos. La asociación más frecuente fue *Ph. damsela* subsp. *damsela* y *V. harveyi*. En los peces positivos, la intensidad del crecimiento nunca fue menor de 4 y no se observaron diferencias entre los dos regímenes de alimentación.

5.3.3. Análisis histopatológico

La Tabla 5.3 resume las diferencias histopatológicas encontradas entre los grupos experimentales. A los tres meses del inicio del engorde, el 60% de los peces del grupo RA-2 en el engorde 1 (junio) tenían el hígado graso, mientras que ninguno en el grupo RA-1. Al final de septiembre, estos valores aumentaron al 86% y 56%, respectivamente, aunque no aparecieron signos de esteatosis. En cambio, en el engorde 2, y especialmente en el grupo RA-2, se encontró un alto porcentaje de hígados grasos en septiembre (3 meses desde el inicio). En este grupo, el nivel más bajo de grasa hepática se observó durante los meses fríos (diciembre); mientras que el mayor grado de adiposidad hepática se registró en abril en los peces con alimentación restringida (RA-1). A los 3 y 12 meses del inicio del engorde 2, esta acumulación de lípidos en el hígado condujo a la esteatosis en el 10% y 6,7% de los peces muestreados (ver Fig. 5.4).

La observación al microscopio óptico de los enterocitos del intestino posterior mostró generalmente un mayor porcentaje de peces con vacuolas lipídicas en los peces con alimentación *ad libitum* (RA-2). Al final del engorde 2, este fenómeno tuvo una mayor persistencia en los peces RA-1. Sin embargo, en los peces RA-2 fue más frecuente una pérdida de integridad de la barrera epitelial y una hinchazón de los enterocitos dentro del lumen intestinal. Algunas veces, incluso, con una leve respuesta celular inflamatoria en la submucosa (ver Fig. 5.5). No se observaron parásitos intestinales en ninguno de los peces examinados.

Tabla 5.3. Porcentaje de animales con signos histopatológicos en cada tiempo de muestreo de los engordes 1 y 2.

Meses desde la entrada	Engorde 1						Engorde 2					
	3		6		3		6		9		12	
	RA-1	RA-2	RA-1	RA-2	RA-1	RA-2	RA-1	RA-2	RA-1	RA-2	RA-1	RA-2
Régimen de alimentación	0	60	56	86	55	90	45	30	10,5	52,6	33,3	66,6
Enriquecimiento lipídico del hígado	0	0	0	0	0	10	0	0	5	0	0	6,7
Esteatosis hepática	15	40	11,1	16,7	10	15	5	0	5	0	46,7	20
Vacuolización intestinal	10	15	0	5,6	0	0	0	0	0	0	0	6,7
Desprendimiento de la mucosa												

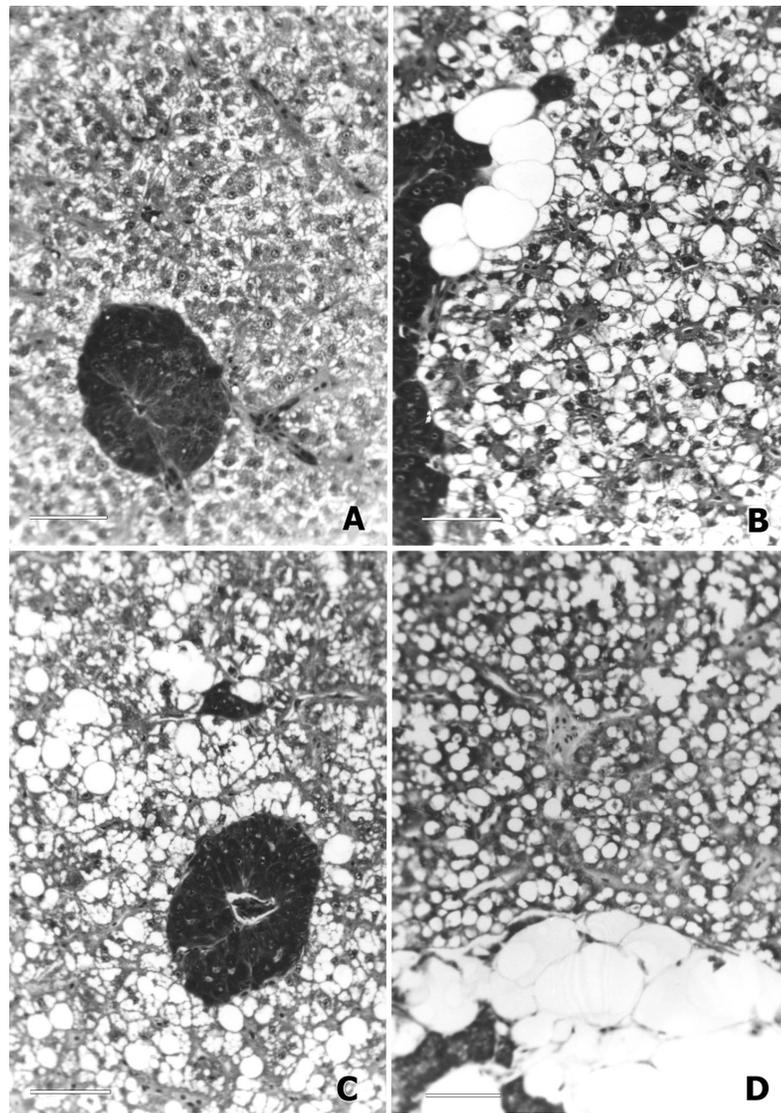


Figura 5.4. Microfotografías de secciones de hígados de doradas bajo distintos regímenes de alimentación. A, hígado normal de peces RA-1 al final de la primavera; B, hígado graso de peces RA-1 al inicio del otoño; C, alta acumulación de lípidos en peces RA-2 al inicio del otoño; D, esteatosis hepática de peces RA-2 al final del verano. Barras = 50 μ m.

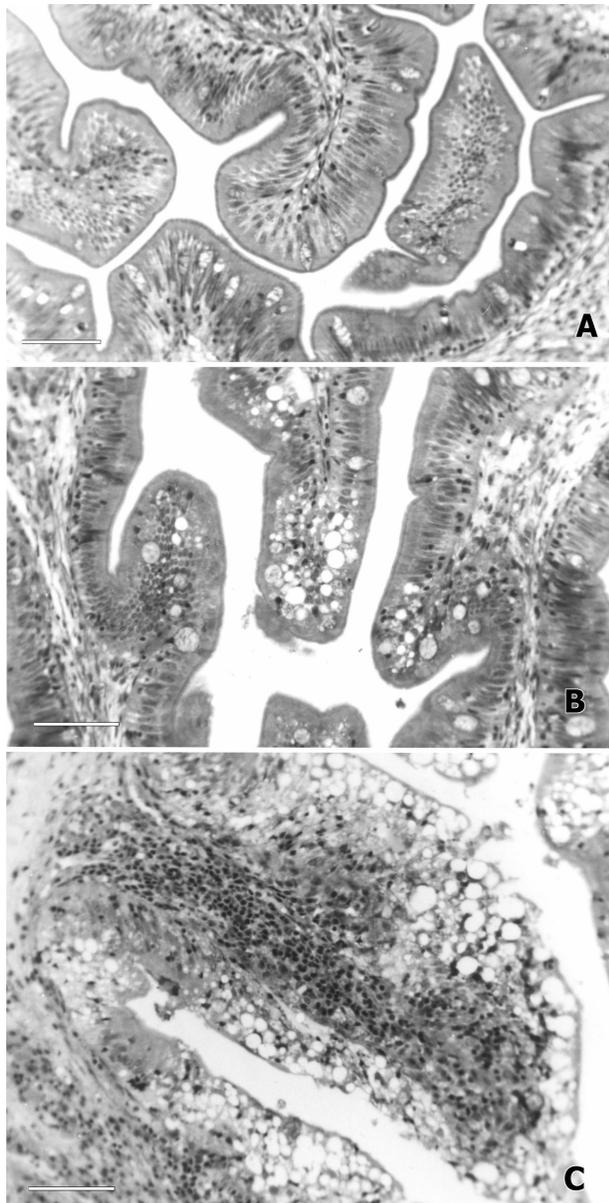


Figura 5.5. Microfotografías de secciones de intestinos de doradas bajo diferentes condiciones experimentales. A, intestino normal de peces RA-1 al inicio del otoño; B, leve vacuolización lipídica de los enterocitos de peces RA-2 al final de la primavera; C, alta vacuolización lipídica con fragilidad del epitelio e inflamación de la submucosa de peces RA-2 al final de la primavera. Barras = 50 μ m.

5.3.4. Análisis inmunológico

Los valores de lisozima sérica y actividad del complemento se muestran en la Tabla 5.4. En los engordes 1 y 2, ninguno de estos dos parámetros mostró cambios significativos en respuesta al régimen de alimentación. La mayor actividad de lisozima sérica se observó en peces del engorde 2. Por el contrario, los peces del engorde 1 mostraron una menor actividad de la vía alternativa del complemento.

La Fig. 5.6 muestra el resultado del estallido respiratorio en leucocitos aislados de riñón anterior. En presencia de PMA, la producción de anión superóxido fue mayor en los animales bajo el régimen de alimentación restringida, aunque ello sólo fue estadísticamente significativo al final del engorde 2.

Tabla 5.4. Lisozima sérica y actividad del complemento por la vía alternativa (ACH_{50} , media \pm error estándar) en los engordes 1 y 2. Letras distintas indican diferencias significativas entre los dos regímenes de alimentación ($P < 0,05$).

Grupo	Lisozima (unidades/ml)	ACH_{50} (unidades/ml)
Engorde 1 RA-1	376,9 \pm 14,0 ^a	33,0 \pm 2,68 ^a
Engorde 1 RA-2	364,1 \pm 14,2 ^a	37,7 \pm 1,85 ^a
Engorde 2 RA-1	398,7 \pm 27,0 ^a	18,8 \pm 2,84 ^b
Engorde 2 RA-2	469,2 \pm 29,6 ^b	17,5 \pm 3,02 ^b

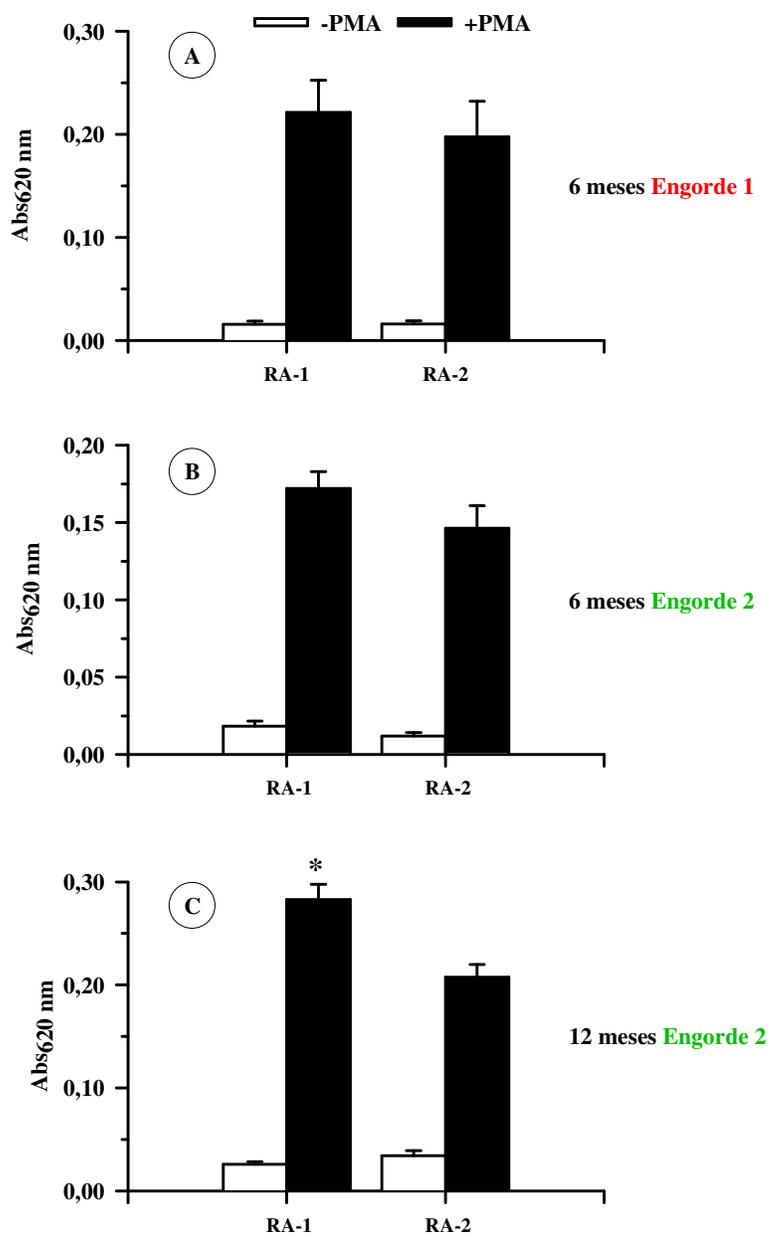


Figura 5.6. Producción intracelular de anión superóxido por los leucocitos de riñón anterior de animales bajo los dos regímenes de alimentación en los engordes 1 (A) y 2 (B, C). Los datos están expresados como media \pm error estándar de ocho peces.

5.4. Discusión

Tanto en mamíferos (Coop y Holmes, 1996; Coop y Kyriazakis, 1999; Valderrábano y cols., 2002) como en peces (Thomas y Woo, 1990; Whali y cols., 1995), suele darse cierta asociación entre la composición del alimento y la incidencia de infecciones parasitarias. De hecho, en salmón se han propuesto sistemas de alimentación específicos para reducir la incidencia de infecciones parasitarias (Lyndon y Toovey, 2000). Asimismo, en lubina se ha encontrado una correlación positiva y estadísticamente significativa entre el contenido de lípidos en la dieta y la prevalencia de infección por *Ceratomyxa* spp. (Sitjá-Bobadilla y Pérez-Sánchez, 1999). De acuerdo con ello, el presente estudio mostró diferencias en cuanto a la prevalencia de infección de patógenos entre ambos regímenes de alimentación; siendo siempre mayor en peces procedentes de alimentación *ad libitum*, excepto para el coccidio *C. molnari*. Por el momento no tenemos ninguna explicación satisfactoria al respecto, aunque es de reseñar que la presencia de este coccidio se ha relacionado con mortalidades por goteo en juveniles de dorada (Álvarez-Pellitero y Sitjá-Bobadilla, 2002).

Epitheliocystis fue el único patógeno de branquias que se detectó, aunque éste mostró una alta prevalencia. En otros trabajos, este parásito se ha asociado con la presencia de otros ectoparásitos y episodios de mortalidades (Cruz e Silva y cols., 1997; Padrós y Crespo, 1995). Los endoparásitos más prevalentes fueron los mixosporidios *Ceratomyxa sparusaurati* y *Leptotheca sparidarum*, y, en anteriores estudios, se correlacionaron con mortalidades por goteo (Palenzuela y cols., 1997; Sitjá-Bobadilla y Álvarez-Pellitero, 2001).

Varios autores han puesto de relieve el efecto de la composición de la dieta sobre la incidencia de infecciones bacterianas. Así pues, en la seriola coreana hay evidencias de mortalidades asociadas a infecciones naturales de *Ph. damsela piscicida* en animales alimentados con materias primas alternativas como fuente de proteína (Maita y cols., 1998). En nuestro estudio, no se detectó un efecto significativo del régimen de alimentación sobre los aislamientos bacterianos. Sin embargo,

las tasas de mortalidad fueron más altas en los animales alimentados *ad libitum*, y la mayoría de peces positivos fueron infectados por dos o más cepas bacterianas, lo cual refuerza la importancia de las infecciones mixtas. Las Vibrionaceas fueron el grupo más representado en los aislamientos positivos, siendo *V. harveyi* la especie más abundante especialmente durante los meses cálidos. Esta especie es también muy abundante en aguas y bivalvos de la zona mediterránea (Arias y cols., 1999; Pujalte y cols., 1999) y en doradas cultivadas durante la época estival (Pujalte y cols., 2003).

En los peces, el hígado es el órgano por excelencia para la síntesis *de novo* de ácidos grasos, por lo que alteraciones y/o disfunciones hepáticas suelen ser un fiel reflejo de trastornos producidos por el régimen de alimentación. El tamaño de la ración también puede considerarse un factor de trastorno y, en nuestro caso, la ingesta de alimento *ad libitum* estuvo asociada a una mayor acumulación de lípidos en el hígado. Este hecho fue especialmente evidente después de la acumulación de reservas energéticas al final del verano, lo que se vio reflejado en un alto porcentaje de animales con esteatosis hepática.

La presencia de vacuolas lipídicas en el intestino se ha descrito en varias especies de peces, y son consideradas formas temporales de reserva, particularmente cuando la tasa de absorción excede a la capacidad de síntesis de lipoproteínas. Durante la fase larvaria de algunas especies de peces se ha descrito una sobrecarga de lípidos en los enterocitos del epitelio intestinal (Deplano y cols., 1989; Padrós y cols., 1993; Díaz y cols., 1997). Dicha sobrecarga puede dar lugar a la rotura y pérdida de integridad del epitelio intestinal tanto en larvas (Padrós y cols., 1993; Crespo y cols., 2001) como en peces adultos (Deplano y cols., 1989; Burrells y cols., 1999; Olsen y cols., 2000). En nuestro caso, los peces con alimentación *ad libitum* mostraron una alta frecuencia de vacuolización, por lo que la descamación del epitelio fue mayor en este grupo que en los peces de alimentación restringida. La subsiguiente pérdida de integridad de la barrera del epitelio intestinal puede conducir a una disfunción intestinal y desequilibrio osmótico. Además, supone una importante vía de entrada para bacterias patógenas u otros microorganismos que en condiciones normales no

supondrían ninguna amenaza. Estos resultados están en consonancia con el trabajo de Mobin y cols. (2001), donde los altos niveles de ingesta de larvas y juveniles de breca están correlacionados con una mayor mortalidad e inflamación de la mucosa intestinal.

La relación existente entre la dieta y la capacidad de respuesta del sistema inmunológico ha sido motivo de numerosos estudios (Landolt, 1989; Blazer, 1992; Waagbø, 1994). Sin embargo, todavía es materia de discusión la tasa de ingesta más conveniente; especialmente, cuando los requerimientos nutricionales para un máximo crecimiento no coinciden con los del óptimo funcionamiento del sistema inmunológico. Por tanto, la cuestión de fondo es definir el umbral mínimo de ingesta para cada especie y época del año sin merma significativa del crecimiento, del estado de inmunocompetencia y de la calidad del producto final. En nuestro caso, la restricción de alimento propuesta mejoró entre un 15-20% la tasa de conversión de alimento (ver Capítulo 4). Además, la producción de anión superóxido (estallido respiratorio) por leucocitos aislados del riñón anterior aumentó considerablemente, aunque sólo fue significativo al final del engorde 2. En la lubina, 7 semanas de ingesta con dietas hiperenergéticas son suficientes para disminuir la actividad del estallido respiratorio (Sitjá-Bobadilla y Pérez-Sánchez, 1999), lo cual podría reflejar diferencias entre especies. En cualquier caso, parece lógico suponer que la modificación de la composición de la dieta es un factor de distorsión más importante que una restricción moderada de la ingesta. De hecho, la incorporación en la dieta de vitaminas C y E, β -glucan, levamisol y levadura provocan un aumento notable del estallido respiratorio en dorada (Castro y cols., 1999; Mulero y Meseguer, 1998; Ortuño y cols., 1999; 2001; 2002).

La lisozima y la actividad hemolítica del complemento por la vía alternativa son otros dos factores importantes implicados en los mecanismos de defensa naturales (Alexander e Ingram, 1992). Gran parte de la bibliografía relacionada con el tema muestra el efecto de la composición del alimento sobre estos parámetros, mientras que son prácticamente inexistentes los trabajos relacionados con el efecto del tamaño de la ración. En el presente estudio, el régimen de alimentación no modificó

ninguno de estos dos parámetros. Otros autores, tampoco han encontrado en otras especies de peces un efecto significativo de determinados componentes de la dieta (Christiansen y cols., 1995; Thompson y cols., 1995; El-Mowafi y cols., 1997; Andersen y cols., 1998; Page y cols., 1999). Sin embargo, en la propia dorada se ha descrito un aumento de la actividad del complemento a través de dietas suplementadas con vitamina C (Montero y cols., 1999b; Ortuño y cols., 1999), acetato α -tocoferol (Ortuño y cols., 2000) y vitamina E (Montero y cols., 1999b; Ortuño y cols., 2001). Asimismo, ciertas deficiencias en vitamina E (Montero y cols., 2001), α -tocoferol y los ácidos grasos ω -3 (Montero y cols., 1998), reducen la actividad hemolítica del complemento por la vía alternativa. Por el contrario, la incorporación de extractos de levadura no tiene efectos significativos (Ortuño y cols., 2002).

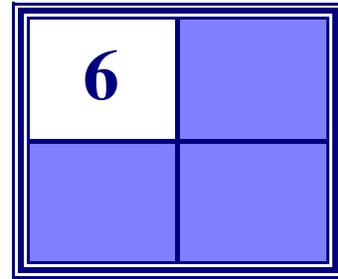
Por tanto, parece ser que la repuesta de los mecanismos de defensa inespecífica es bastante variable entre las especies de peces y los experimentos realizados. Es más, se ha de tener en cuenta que la actividad del complemento fue particularmente baja en el engorde 2 en comparación con el 1. Sin embargo, se obtuvo una tendencia opuesta para la lisozima, la cual tendió a aumentar en el engorde 2. Es interesante reseñar que este antagonismo entre lisozima y actividad del complemento también se ha puesto de manifiesto con niveles altos de densidad de cultivo (Montero y cols., 1999a).

A modo de resumen, se pueden extraer dos grandes conclusiones de este trabajo:

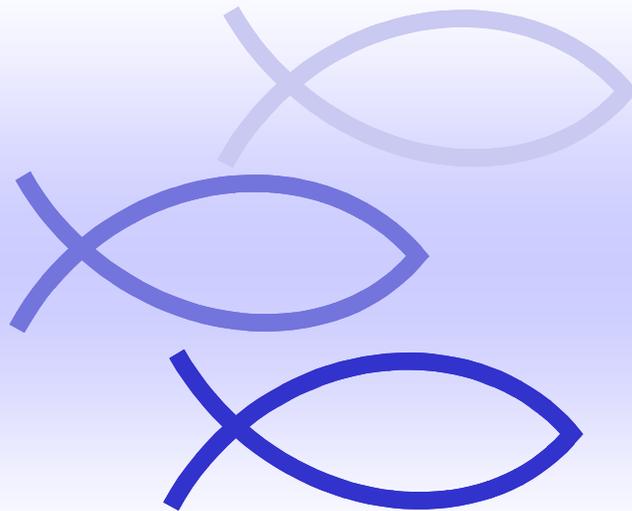
- Los peces de alimentación restringida tuvieron una menor tasa de mortalidad, menos alteraciones histopatológicas y una menor prevalencia de infección para la mayoría de los parásitos detectados.
- La restricción de alimento no sólo no alteró el estado de inmunocompetencia, sino que parece mejorarlo en algunos aspectos (estallido respiratorio).

Esta modulación nutricional puede haber actuado a través de cualquiera de los mecanismos ya estudiados por Klansing (1998). Los datos apuntan hacia unos efectos reguladores

indirectos mediados por el sistema endocrino (Weyts y cols., 1999; Pérez-Sánchez, 2000), y por cambios en la integridad del epitelio intestinal, lo que puede facilitar la entrada de patógenos oportunistas y/o especialmente virulentos.



**Caracterización molecular y regulación
transcripcional del receptor de la hormona
del crecimiento**



6.1. Introducción

6.2. Material y Métodos

6.2.1. Extracción de ARN

6.2.2. Clonación y secuenciación

6.2.3. Northern blot

6.2.4. *Screening* del procesamiento alternativo mediante RT-PCR

6.2.5. *Cross-linking*

6.2.6. Expresión tisular (PCR- en tiempo real-)

6.2.7. Regulación estacional de la expresión hepática de RGH e IGF-I (primavera vs verano)

6.2.8. Análisis estadístico

6.2.9. Apéndices

6.2.9.1: Esquema básico del 5' y 3'RACE

6.2.9.2: Esquema básico del Northern blot

6.2.9.3: Esquema básico de PCR- en tiempo real- (método SYBR Green I)

6.2.9.4: Modelo de cuantificación por PCR- en tiempo real-

6.3. Resultados y discusión

6.3.1. *Screening* de RGHs: organización genómica

6.3.2. *Cross-linking*: glicosilación

6.3.3. Regulación transcripcional

RESUMEN. El receptor de la hormona del crecimiento de dorada se clonó y secuenció mediante RT-PCR. La pauta abierta de lectura codifica para una proteína madura de 609 aminoácidos con una región hidrofóbica de transmembrana y todos los motivos característicos de los RGHs. El análisis de la secuencia reveló una identidad aminoacídica del 96% con el RGH de chopa y del 76% con el receptor de rodaballo. Pero esta identidad disminuye al 52% en el caso del RGH de carpa dorada. Mediante PCR- en tiempo real- se demostró la existencia de variaciones estacionales en la expresión hepática del RGH e IGF-I. Es de reseñar que el incremento estival en la expresión de estos genes estuvo correlacionado con el incremento de los niveles circulantes de GH e IGF-I. La búsqueda exhaustiva de isoformas del RGH de dorada por Northern blot, 3'RACE y *screening* mediante PCR del extremo 3' no reflejó la existencia de un procesamiento alternativo de ARN mensajero. En consonancia con ello, el análisis de *cross-linking* reveló la existencia de dos únicas bandas que se corresponderían con las formas glicosilada y no glicosilada del receptor anclado a membrana. Tanto en dorada como en rodaballo, el análisis de la estructura genómica reveló un alto grado de conservación de la estructura exón-intrón, con la presencia de un intrón exclusivo de peces, que en la chopa posibilita la existencia de una forma larga con una inserción de unos 100 pb en la región intracelular. En el caso del rodaballo, la región divergente y el 3'UTR de la forma truncada anclada a membrana están codificados por el extremo 5' del intrón 9/10. Todo ello pone de relieve que tanto la presencia como los mecanismos de generación de los RGHs en peces y vertebrados superiores presentan un carácter marcadamente específico.

Parte de los resultados expuestos en este capítulo han sido publicados en las revistas: *Comparative Biochemistry and Physiology B*. (2003) **136**, 1-13; y *Fish Physiology and Biochemistry* (en prensa).

6.1. Introducción

Los efectos de la hormona del crecimiento (GH) sobre el metabolismo y el crecimiento son el resultado de la interacción de esta proteína con un receptor específico de la membrana citoplasmática (RGH). Ello supone la formación de homodímeros (dos moléculas de receptor con una única molécula de GH) que inician una cascada de fosforilaciones de tirosinas y proteínas y que dan lugar a la acción biológica de la GH (Argetsinger y Carter-Su, 1996; Zhu y cols., 2001). En base a sus características estructurales, estos receptores se han incluido en la superfamilia de receptores citoquina de clase I, que incluye, entre otros, a los receptores de la prolactina (PRL), la leptina, la eritropoyetina, el factor estimulante de colonias de granulocitos y varias interleuquinas (ver Kopchick y Andry, 2000).

Sin embargo, los RGHs representan una población bastante heterogénea y, en algunos vertebrados superiores, se han registrado distintas variantes, que incluyen tanto a proteínas de transporte de la hormona del crecimiento (GHBP) como a formas truncadas ancladas a la membrana citoplasmática (ver Edens y Talamantes, 1998). Las formas truncadas compiten con las formas largas por la unión a la GH, actuando como un factor de inhibición al no poder desencadenar o transmitir ninguna señal intracelular (Barnard y Waters, 1997; Ross, 1999). Estas variantes de RGH - mediante escisión proteolítica- son también el substrato preferente para la formación de GHBPs circulantes (Ross y cols., 1997). Sin embargo, dependiendo de la especie, la GHBP es el resultado de escisiones proteolíticas o del procesamiento alternativo del ARNm (Moutoussamy y cols., 1998). Además, ambos mecanismos pueden coexistir, como ocurre en el mono *Rhesus* (Martini y cols., 1997). De ser esto cierto, la divergencia evolutiva y los mecanismos de generación de las variantes de los RGHs podrían ser un fenómeno relativamente reciente a lo largo de la evolución de los vertebrados. En este sentido, estudios comparativos entre vertebrados superiores e inferiores podrían ayudar a una mejor comprensión de la función e importancia fisiológica de la GH.

Recientemente, se han realizado distintos estudios encaminados a la caracterización molecular de los RGHs en ciprínidos (Lee y cols., 2001) y pleuronectiformes (Calduch-Giner y cols., 2001). En carpa dorada, ensayos de Northern blot han mostrado la existencia de una única forma de RGH con un tamaño de 4 Kb. Sin embargo, en rodaballo, el análisis por 3'RACE reveló la existencia de un mensajero alternativo que codifica para una forma truncada, similar a la forma corta de los receptores de PRL y leptina de vertebrados superiores (Clevenger y Kline, 2001; Sweeney, 2002). En la actualidad, se ha clonado el RGH de otro perciforme de la familia Sparidae, la chopa, habiéndose detectado una isoforma larga con una inserción de 93 pb en el dominio intracelular (Tse y cols., 2003).

El objetivo de los trabajos abordados en este capítulo fue la caracterización molecular del RGH en un espárido mediterráneo, la dorada; habiéndose estudiado a nivel genómico los mecanismos implicados en la generación de las posibles isoformas de RGHs en varias especies de peces. Asimismo, aunque de forma incipiente, se han establecido las bases para el estudio de la regulación transcripcional tanto de IGF-I como de los RGHs de dorada.

6.2. Material y métodos

6.2.1. Extracción de ARN

Peces del stock en cultivo del IATS fueron anestesiados con ácido 3-aminobenzoico éster (100 mg/l). Tras lo cual, se procedió a extraer muestras de hígado, músculo blanco y tejido adiposo. Estos tejidos fueron congelados rápidamente en nitrógeno líquido y guardados a -80°C hasta su posterior análisis.

El ARN total fue extraído por el método del fenol-cloroformo- isotiocianato de guanidinio (Chomczynski y Sacchi, 1987), y el ARN poliadenilado fue purificado mediante PolyATracts (Promega, Madison, WI). La cantidad y pureza del ARN fueron calculadas mediante lectura de absorbancias a 260 y 280 nm, y su integridad fue comprobada mediante electroforesis en geles de agarosa-formaldehído.

6.2.2. Clonación y secuenciación

2µg de ARN total hepático se desnaturalizaron a 65°C durante 5 minutos, tratándose previamente con DNasa I. Inmediatamente después, se pusieron en hielo y fueron retrotranscritos con 200 unidades de SuperScript II (Life Technologies, Gaithersburg, MD), utilizando un oligo (dT)₁₇ como cebador de anclaje. Se incluyeron como controles negativos reacciones sin transcriptasa reversa. El producto resultante fue tratado con RNasa H (2 unidades) antes de la amplificación por PCR. Los cebadores degenerados con sentido (RGH1, RGH2) y antisentido (RGH3, RGH4) (Tabla 6.1) fueron diseñados de acuerdo con las secuencias disponibles en las bases de datos: RGH1 codifica para la región extracelular (ETFRCWW); RGH2 está localizado en el motivo citoplasmático Dominio 2 (DEPWVEFIE); RGH3 es parte de la región citoplasmática del Dominio 3 (DFYAQVSN); RGH4 está localizado 18 nucleótidos corriente arriba del codón de parada (Fig.6.1).

En la PCR, se amplificaron 2 µl de las reacciones de RT en un volumen total de 50 µl. La mezcla de reacción incluyó MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), 0,2 mM de cada dNTP, 1 µM de cebadores con sentido y antisentido, y 2,5 unidades de ADN Taq Platinum Polimerasa (Life Technologies). Se llevaron a cabo 35 ciclos con: una fase de desnaturalización a 94°C durante 60 segundos, una fase de emparejamiento a 54-56°C durante 90 segundos y una fase de extensión a 72°C durante 120 segundos; seguidos finalmente, de una fase de extensión a 72°C durante 15 minutos. El ADN amplificado se ligó en el vector pGEM-T (Promega), y fue utilizado para transformar células competentes de *Escherichia coli* (JM109). Los plásmidos recombinantes fueron purificados (SV Minipreps, Promega) y secuenciados por el método enzimático de cadena (ABI PRISM dRhodamine terminator cyler sequencing kit, PerkinElmer), utilizando los promotores T7 y SP6 de la región *polylinker* del plásmido.

La amplificación del extremo 5' mediante 5'RACE fue llevada a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (Life

Technologies) (ver Apéndice 6.2.9.1). Tras lo cual, el ARNm hepático (200 ng) fue retrotranscrito con un cebador específico (5'-CTGAACTCTCCAAACTT), localizado al final de la región extracelular. Después del tratamiento con RNasa H, el ADNc fue purificado (columna de filtración GlassMAX Spin Cartridge), y tratado con deoxinucleotidil transferasa terminal y dCTP (60 minutos a 4°C), para añadirle una cola de oligo-dC en el extremo 5'. La PCR se llevó a cabo con un cebador universal con una secuencia de poli-dG y un oligonucleótido específico (5'-AGATTGTCTGCTGGGTGTGCGGCTGCATCTCCAATG) como cebador antisentido.

La amplificación del extremo 3', mediante 3'RACE (ver Apéndice 6.2.9.1), se realizó a partir de ARN total hepático (2 µg), tratado con DNasa y retrotranscrito con un oligo (dT)₃₀ unido a la secuencia de anclaje (Clontech, Palo Alto, CA). La amplificación fue realizada con un cebador del receptor de dorada (5'-CCCTCTGGGCTCAGTTATGATGTCATGG), localizado en la región extracelular cerca del dominio transmembrana. El cebador antisentido codifica para la secuencia de anclaje. Esta PCR consistió en 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 68°C y 3 minutos a 72°C; con una fase final de extensión de 15 minutos a 72°C. A continuación, se llevó a cabo una PCR anidada (30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 90 segundos a 62°C y 3 minutos a 72°C, con una extensión final de 15 minutos a 72°C) con 1 µl de la primera reacción y un cebador con sentido (5'-GATGCAGCCGCACAC CCAGCAGACAATC) situado en la región extracelular.

Tabla 6.1. Secuencias de los cebadores utilizados en la clonación y secuenciación del RGH de dorada.

Cebadores	Secuencia
RGH1	5'-GGA GAC NTT YCG NTG YTG GTG GA
RGH2	5'-CGA CGA CTC CTG GGT TGA RTT YGT HGA
RGH3	5'-TGT CGG ACA CCT GGG CRT ARA ART C
RGH4	5'-AGC AGG TCT GKG STS HYG TAS CC

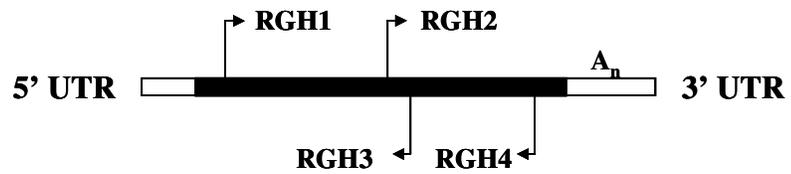


Figura 6.1. Representación esquemática de la estrategia utilizada para la clonación y secuenciación del RGH de dorada.

6.2.3. Northern blot

Dos sondas de ADN que codifican para la región extracelular o citoplasmática fueron generadas por RT-PCR a partir de ARN total hepático. La sonda de ADN extracelular comprende toda la región extracelular (681 nucleótidos), y fue amplificada por PCR con los cebadores 5'-CGGGGATCTGTGT TTGTG (con sentido) y 5'-CTCAGTCACTTGAA (antisentido). La sonda de ADN codificante para parte de la región citoplasmática (389 nucleótidos) fue amplificada por PCR con los cebadores RGH2 y RGH3 (ver Fig. 6.1). Las sondas recombinantes fueron escindidas del vector pGEM-T mediante cortes con enzimas de restricción, purificadas por gel y marcadas con 20 μ Ci [32 P] -dCTP con cebadores decanucleotídicos generados al azar (Decalabel DNA Labeling Kit, Fermentas, Hanover, MD).

El ARNm hepático (800 ng), utilizado en el Northern blot, fue separado en un gel de agarosa con formaldehído al 1% en condiciones desnaturalizantes, transferido a membranas de nailon mediante transferencia por vacío (BioRad, Hércules, CA) en tampón SSC 10x, y fijado posteriormente con UV (ver Apéndice 6.2.9.2). La prehibridación (3 horas) y la hibridación (toda la noche), con sondas extra o intracelulares, se llevaron a cabo a 65°C en fosfato sódico 0,5 mM (pH 7,2), EDTA 1 mM, SDS al 7%, y BSA al 1% (Church y Gilbert, 1984). Los lavados fueron realizados a temperatura ambiente en tampón SSC x1, con SDS al 0,1 % y tampón SSC x2 con SDS al 0,1 %, durante 15 minutos cada uno. Una vez secadas las membranas, éstas se expusieron durante 7 días a -80°C a las películas Biomax MS (Kodak, Rochester, NY) en casetes con pantallas intensificadoras.

6.2.4. Screening del procesamiento alternativo mediante RT-PCR

Mediante PCR también se llevó a cabo un *screening* en el extremo 3' de las posibles variantes de RGHS. Para ello se utilizaron dos cebadores específicos (sentido, 5'- GACTCCGT GTTCATTCAAGTGACTG; antisentido, 5'- TCCTCCTTCTCT GCAGCATCG) localizados corriente arriba de la región transmembrana y corriente abajo de los dominios citoplasmáticos 1 y 2.

La PCR consistió en 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 58°C y 2 minutos a 72°C, seguidos de una fase de extensión final de 15 minutos a 72°C. El ADN amplificado (2,5 µl) se corrió en geles de poliacrilamida al 12%. Los geles fueron fijados durante 30 minutos en ácido acético al 7,5% y teñidos con nitrato de plata al 0,8%; tras lo cual, fueron revelados con ácido cítrico 0,25 mM y formaldehído al 0,06%.

6.2.5. *Cross-linking*

Muestras de tejido hepático procedentes de animales adultos fueron homogeneizadas, y de ellos se obtuvieron preparaciones de membrana (Pérez-Sánchez y cols., 1994a) para su uso en los ensayos de *cross-linking* (Yao y Le Bail, 1999). De forma breve, las membranas hepáticas (50 mg de tejido inicial) fueron incubadas toda la noche a 14°C con GH marcada radiactivamente (200.000 cpm) (GH recombinante de dorada) con o sin proteína recombinante no marcada (2 µg). Después de un lavado con Tritón X-100 al 0,05% y agua destilada, se centrifugaron las muestras a 3000 g durante 10 minutos a 4°C. Los precipitados se resuspendieron con tampón HEPES 10 mM (pH 7,5) y se pusieron a incubar toda la noche con DSS fresco (concentración final de 2 mM) disuelto en DMSO. La solución fue lavada con tampón Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8).

Finalmente, las proteínas fueron centrifugadas a 3000 g durante 10 minutos a 4°C y resuspendidas en 250 µl de tampón de carga (Tris-HCl 200 mM, glicerol al 10%, SDS al 2% y azul de bromofenol al 0,001%). Tras la correspondiente separación electroforética en condiciones no reductoras (15 µl de carga por pocillo) en geles de acrilamida, las bandas del gel fueron transferidas (100 V, 60 minutos) a membranas PVDF (Immunoblot PVDF, BioRad) utilizando un Mini Trans-blot Transfer Cell (BioRad). Las membranas, una vez secas, se revelaron por autorradiografía tras 7 días de exposición a -80°C con películas Biomax MS.

6.2.6. Expresión tisular (PCR- en tiempo real)

Para analizar la expresión del RGH e IGF-I en tejidos diana de GH (hígado, músculo blanco y tejido adiposo), se validó un ensayo de PCR- en tiempo real- basado en el uso de SYBR Green I (ver Apéndice 6.2.9.3 y 6.2.9.4). La β -actina (*house-keeping gene*) se tomó como valor de referencia para corregir las posibles variaciones en las cargas de ARN. Los cebadores específicos para cada gen (Tabla 6.2) fueron diseñados con el Software Primer Express de Applied Biosystems (Foster City, CA).

Los cebadores de RGH amplificaron para un amplicón citoplasmático de 99 pb, comprendido entre las posiciones nucleotídicas 1026 y 1124. En el extremo 5' de la IGF-I de dorada no se produce procesamiento alternativo (Company y cols., 2001), por lo que los cebadores amplificaron para un único amplicón de 84 pb que comprende el péptido señal (Duguay y cols., 1996). Los cebadores de β -actina de dorada amplificaron un amplicón de 51 pb (Santos y cols., 1997).

Las construcciones plasmídicas (vector pGEM-T) fueron utilizadas como controles externos para cada gen. El plásmido del RGH fue el mismo que el utilizado para la construcción de la sonda de ADN citoplasmática del Northern blot. El plásmido de IGF-I fue obtenido después de la amplificación mediante RT-PCR de un fragmento de 570 pb (sentido, 5'-TTCGCCGGGCTTTGTCTT; antisentido 5'-CCCGCGTTGCCTCGACTT), comprendido entre el péptido señal y el dominio E. Los cebadores utilizados para el plásmido de β -actina fueron 5'-CGACGACAGGTCATACCA (sentido) y 5'-AGAAGCATTTGCGGTGGACG (antisentido). La concentración de plásmidos purificados fue calculada mediante lectura de la absorbancia a 260 nm.

El ARN total (0,5-1,5 μ g), procedente de los tejidos objeto de estudio, fue extraído, tratado con DNasa I y retrotranscrito con oligo-dT, tal y como se ha descrito anteriormente. La amplificación por PCR, y el correspondiente análisis, fue llevado a cabo en el sistema ABI PRISM 7700

Sequence Detection System (Applied Biosystems), utilizando placas de 96 pocillos MicroAmp optical. Las reacciones de 25 µl en cada pocillo contenían: SYBR Green PCR Master Mix 1x (Applied Biosystems), 0,05-1,00 µl de la reacción de RT, y 0,3-0,9 µM de cada cebador con sentido y antisentido. La concentración de los cebadores fue optimizada siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las muestras fueron analizadas por cuadruplicado, utilizando el siguiente protocolo: periodo de preincubación a 95°C durante 10 minutos, lo que provocó la activación de la polimerasa AmpliTaq Gold DNA y la desnaturalización del ADN. Las muestras fueron amplificadas mediante 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos (fase de desnaturalización) y de 60°C durante 60 segundos (fase de emparejamiento y extensión). Una vez finalizada la PCR, se llevó a cabo una última desnaturalización (inicio a 60°C y calentamiento progresivo hasta alcanzar los 95°C) para la obtención de las curvas de fusión. Para cada gen, se observó que la pérdida de fluorescencia para plásmidos y muestras de RT tenía lugar a la misma temperatura de fusión, lo que sugiere la amplificación del mismo producto. Los valores de fluorescencia obtenidos durante la fase de extensión se analizaron con el Software GeneAmp 5700 SDS. La concentración de cada transcrito fue normalizada en base a los valores detectados de β-actina.

Tabla 6.2. Cebadores específicos utilizados en la PCR- en tiempo real-

Gen	Cebadores
RGH	5'-ACC TGT CAG CCA CCA CAT GA (sentido)
	5'-TCG TGC AGA TCT GGG TCG TA (antisentido)
IGF-I	5'-TGT CTA GCG CTC TTT CCT TTC A (sentido)
	5'-AGA GGG TGT GGC TAC AGG AGA TAC (antisentido)
β-actina	5'-TCC TGC GGA ATC CAT GAG A (sentido)
	5'-GAC GTC GCA CTT CAT GAT GCT (antisentido)

6.2.7. Regulación estacional de la expresión hepática del RGH e IGF-I (primavera vs verano)

Sesenta juveniles de dorada con un peso inicial de $25,1 \pm 0,1$ g fueron cultivadas desde finales de marzo hasta finales de junio en condiciones de alimentación *ad libitum* con un pienso comercial que contenía 48% de proteína y 22% de lípidos. La conversión de alimento (alimento seco/ganancia peso) en ese periodo fue de 1,2 y la tasa de crecimiento específico (SGR) aumentó de 0,9 en abril a 1,8 en junio.

Al inicio y final del periodo de engorde, se muestrearon diez peces para muestras de sangre e hígado. El ARN fue retrotranscrito y utilizado para la cuantificación de los mensajeros del RGH e IGF-I mediante PCR- en tiempo real. Los niveles plasmáticos de GH e IGF-I se determinaron mediante radioinmunoensayos (RIA), tal y como se ha descrito en el Capítulo 3 (Apéndices 3.2.5.3 y 3.2.5.4).

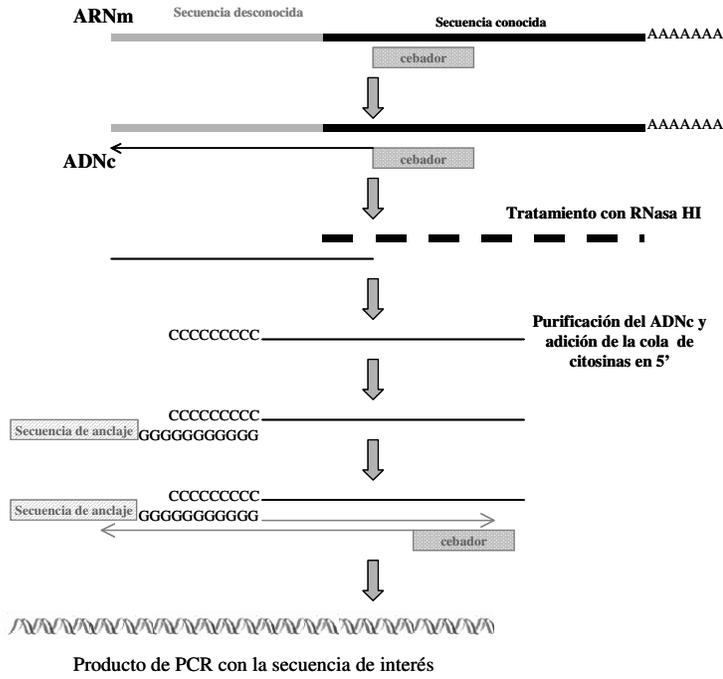
6.2.8. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante el test de t-Student cuando se compararon entre sí dos grupos experimentales. El test de Student-Newman-Keuls fue utilizado en las comparaciones múltiples de expresión génica de RGH e IGF-I en distintos tejidos ($P < 0,05$).

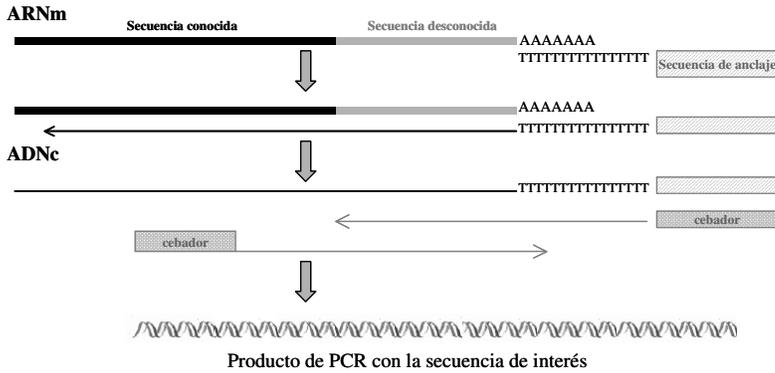
6.2.9. Apéndices

6.2.9.1. Esquema básico del 5' y 3'RACE

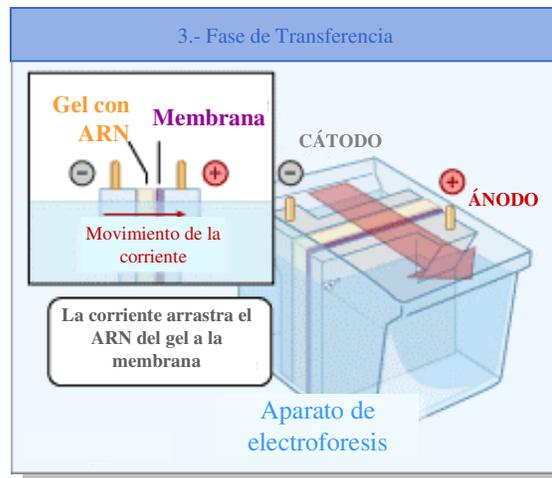
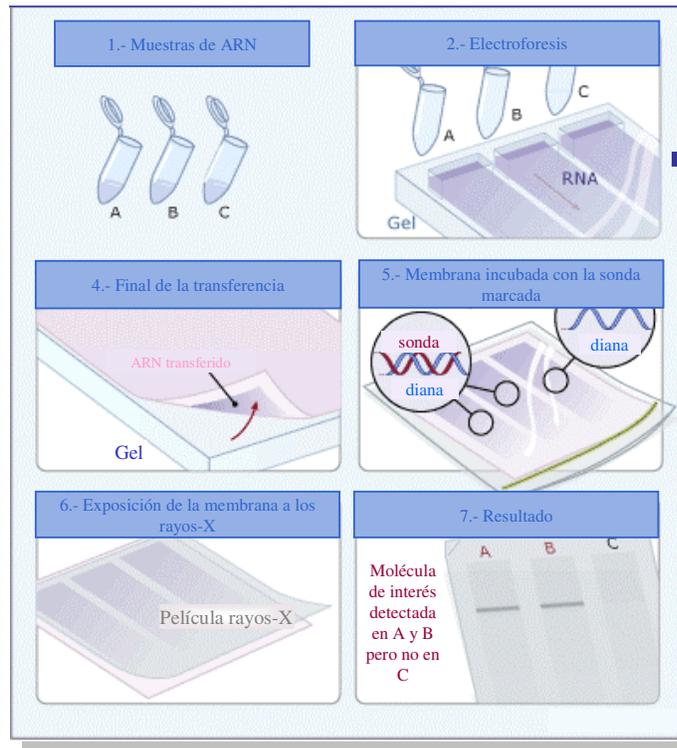
5' RACE



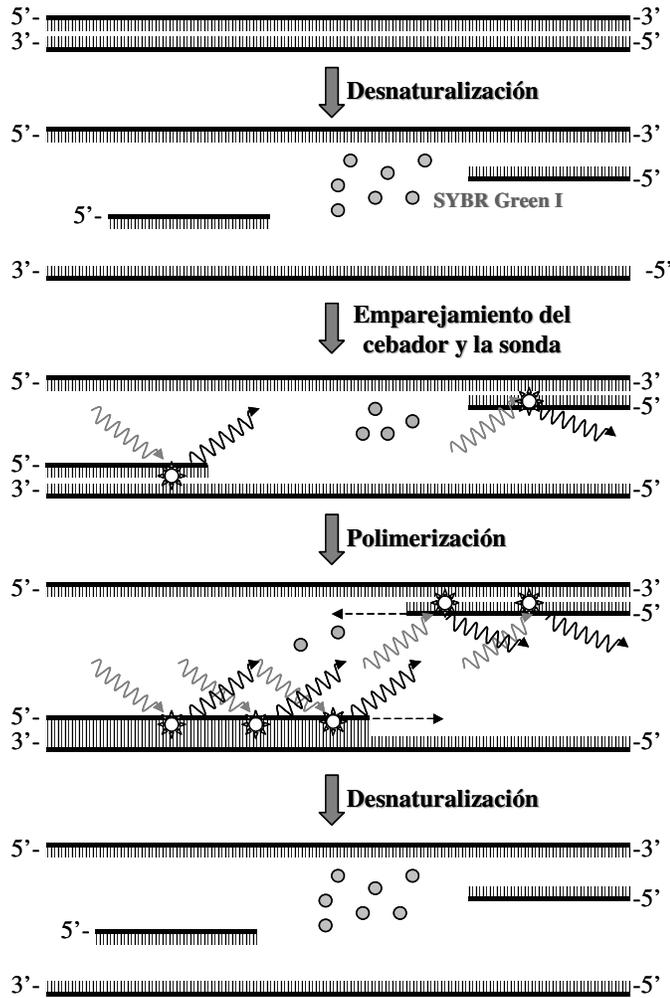
3' RACE



6.2.9.2. Esquema básico del Northern blot

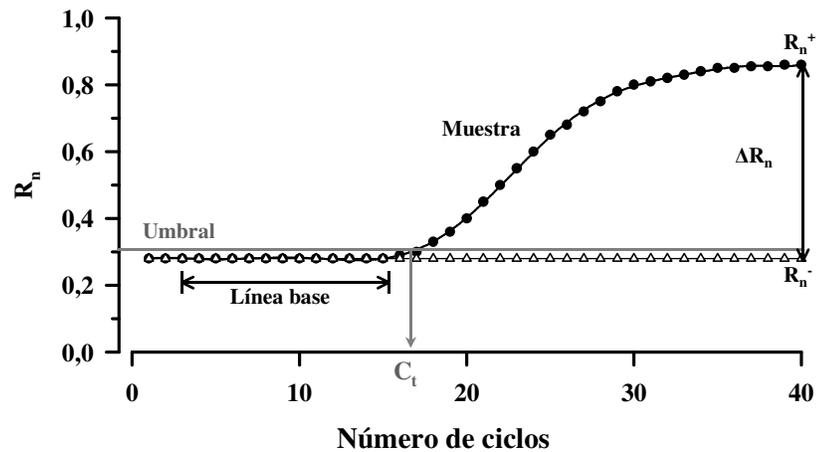


6.2.9.3. Esquema básico de PCR- en tiempo real- (método SYBR Green I)



El SYBR Green I es un marcador fluorescente que se une al ADN de doble cadena, por lo que permite valorar en cada ciclo la cantidad de ADN amplificado. Durante la desnaturalización, el SYBR Green I libre muestra poca fluorescencia. Cuando se alcanza la temperatura de emparejamiento unas pocas moléculas de SYBR Green I se unen a la doble cadena de ADN, dando lugar a la emisión de luz por excitación. Durante la polimerización, se unen cada vez más moléculas al nuevo ADN sintetizado y el incremento de la fluorescencia puede registrarse en tiempo real. En la desnaturalización, el SYBR Green I se libera y la fluorescencia vuelve a los niveles basales (Bustin, 2000).

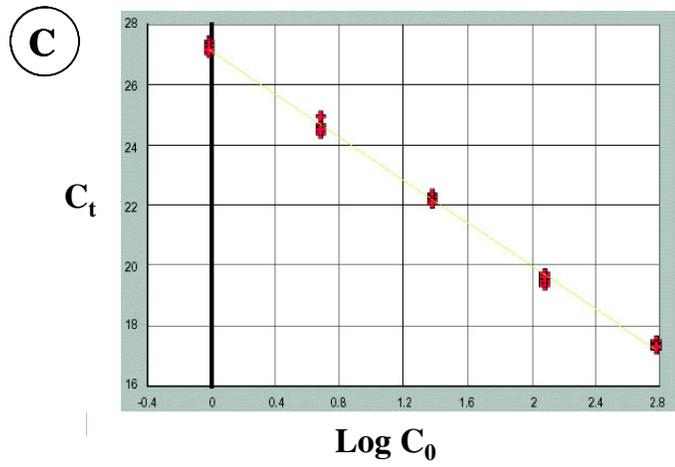
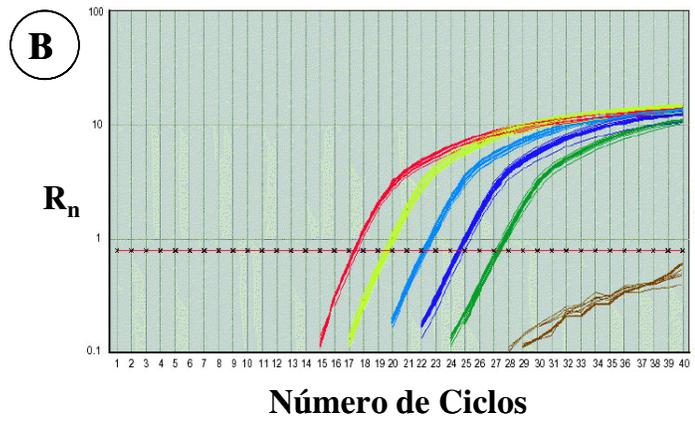
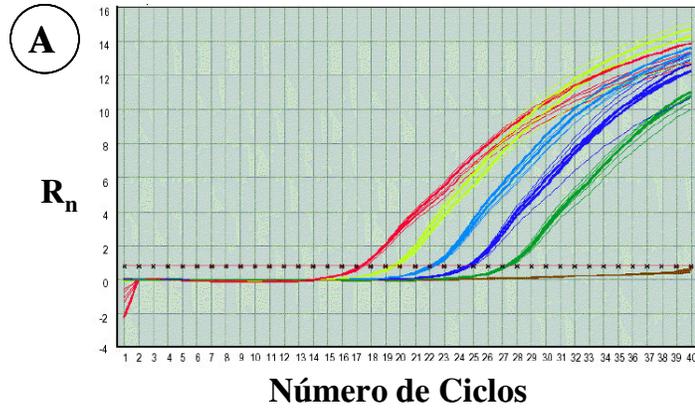
6.2.9.4. Modelo de cuantificación por PCR- en tiempo real-



La figura muestra el modelo teórico de amplificación y los términos utilizados en el análisis de los productos amplificados. En las fases iniciales de la PCR, sólo hay un pequeño cambio en la señal percibida. Ésta define la línea de base de la amplificación. Posteriormente, se detecta un incremento en la fluorescencia por encima de la línea de base, lo que va asociado a la presencia del producto de PCR amplificado. El parámetro C_t (ciclo umbral) es definido como el número de ciclos en que la fluorescencia supera el umbral fijado.

La técnica del PCR- en tiempo real- permite la cuantificación de los amplicones generados durante cada ciclo de PCR. Así pues, el aumento de la fluorescencia se corresponde con la cantidad de producto formado, y al comparar estos resultados con los obtenidos en la curva estándar, se pueden cuantificar los amplicones en cada ciclo.

En la página siguiente se muestra un ejemplo de PCR- en tiempo real- con el método SYBR Green I: (A) Cambio de la intensidad de fluorescencia frente al número de ciclos de PCR, (B) transformación logarítmica de los datos anteriores, y (C) representación logarítmica del número de copias frente al C_t .



6.3. Resultados y discusión

6.3.1. *Screening* de RGHs: organización genómica

Los receptores de GH y PRL de peces comparten las características estructurales de la superfamilia de receptores de citoquina clase I. De hecho, la existencia de dominios altamente conservados ha permitido el empleo de técnicas de RT-PCR para la clonación y secuenciación de los RGHs de peces.

En el presente estudio, se obtuvieron productos de ADN del tamaño esperado mediante la utilización de cebadores degenerados. La secuencia nucleotídica (1726 nt de longitud) codifica para una proteína de 575 aminoácidos. El análisis de dicha secuencia se completó por 3' y 5'RACE, encontrándose un péptido señal de 38 aminoácidos, seguido de una región extracelular de 227 aminoácidos con siete cisteínas, cinco sitios potenciales de N-glicosilación y un motivo de unión a ligando (FGEFS) propio del RGH (Fig.6.3). Asimismo, se ha caracterizado la región transmembrana (24 aminoácidos) y la región citoplasmática, que contiene ocho tirosinas y los Dominios 1 y 2. Es interesante destacar que el ensayo de 3'RACE, con cebadores específicos en la región extracelular, mostró una única banda. Ello implica que, a diferencia de lo que ocurre en rodaballo, en dorada no está presente, o muy poco representado, el mensajero o los mensajeros que codifican para formas truncadas de RGHs ancladas a la membrana citoplasmática (Calduch-Giner y cols., 2001).

Figura 6.3. Secuencia nucleotídica y aminoacídica del RGH de dorada. Los nucleótidos están numerados desde la primera base del codón de la metionina de inicio. Subrayado simple, péptido señal; doble subrayado, sitios potenciales de N-glicosilación; ■, cisteínas extracelulares; ■, tirosinas citoplasmáticas; —, región transmembrana. Número de acceso a GenBank: AF438176.



La Figura 6.4 muestra el alineamiento de las secuencias aminoacídicas del RGH de dorada con los RGHs de varias especies de vertebrados superiores e inferiores.

La secuencia consenso muestra la conservación de tres pares de cisteínas extracelulares que participan en la formación de puentes disulfuro (Fuh y cols., 1990). Sin embargo, las tres secuencias no publicadas de RGHs de salmón plateado y salmón japonés (números de acceso al GenBank: AB071216, AF403539 y AF403540), carecen de la quinta y sexta cisteína; no estando claro el significado funcional de este hecho. La séptima cisteína, que participa en humanos en la homodimerización del RGH (Zhang y cols., 1999), está presente en todos los vertebrados. Sin embargo, en *Xenopus* y peces, esta cisteína está localizada corriente arriba en lugar de corriente abajo del motivo FGEFS.

La secuencia del receptor de dorada muestra la existencia de cinco sitios de N-glicosilación, de los cuales, cuatro son comunes a todos los RGHs; lo que sugiere un alto grado de conservación a través de la evolución de vertebrados. De forma comparativa, el número de sitios de glicosilación es mayor en vertebrados inferiores, particularmente en peces (Tse y cols., 2003). Además, el quinto sitio de N-glicosilación, localizado en la posición aminoacídica 136-139 de la secuencia de dorada, es exclusivo de peces. Aunque no se conocen con certeza las implicaciones fisiológicas de este hecho, es posible que ello modifique la capacidad de unión del receptor al ligando (Szecowka y cols., 1990; Harding y cols., 1994).

Las tirosinas intracelulares juegan un papel clave en la fosforilación del receptor y en la activación de las STATs (Lobie y cols., 1995), iniciando los mecanismos de transmisión de señal del RGH. Los alineamientos de las secuencias de RGHs muestran la conservación de siete tirosinas citoplasmáticas. Ello sugiere que dichos mecanismos están muy conservados evolutivamente. No obstante, la tirosina en la posición aminoacídica 578 de dorada parece ser exclusiva de peces. Así pues, pueden existir diferencias entre peces y vertebrados superiores tanto en la estabilidad del homodímero como en la capacidad de unión del receptor y los mecanismos implicados en la transmisión de la señal intracelular.

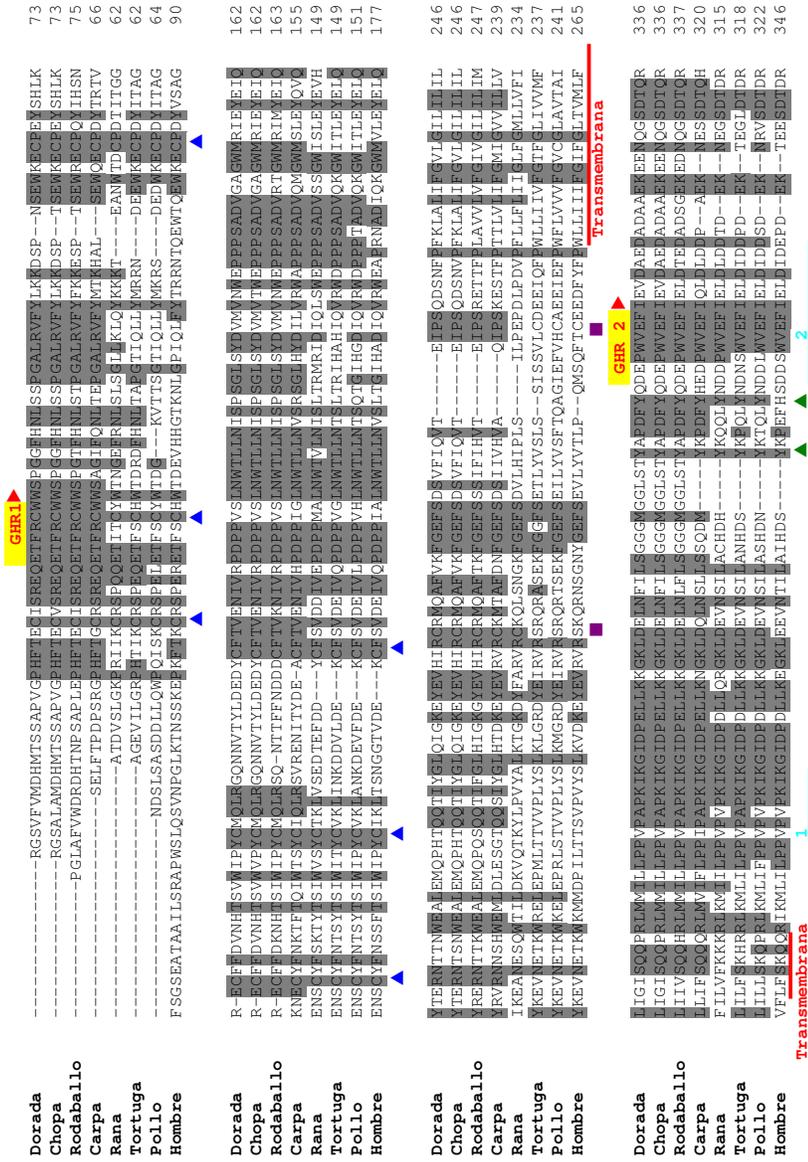


Figura 6.4. Alineamiento aminoacídico (CLUSTALX) de las proteínas maduras de RGHs de varias especies de vertebrados. ▲ y ■, cisteínas extracelulares; ▲, tirosinas citoplasmáticas; —, región transmembrana; 1, 2, Dominios 1 y 2 citoplasmáticos; ■, cebadores degenerados (GHR1, GHR2, GHR3, GHR4).

Dorada	LLD-PPQVSHHNTGCANAVSFPDDSSGRASCVDYDLHDQDTLMMLM-----ATLLPGQPEDSEDVVERAFVI-	406
Chopa	LLD-LPQVSHHNI GCANAVSFPDDSSGRASCVDYDLHDQDTLMMLM-----ATLLPGQPEAEDSDFVVSAPVI-	406
Rodaballo	LLA-LSQVSHHNI GCNSNAISFPDDSSGRASCVDYDLHDQDTLMMLM-----ATLLPGQPEGEASLLVEGASAS-	407
Carpa	LLGLSRSGSHVILNFKS-----DDSSGRASCMDPEIPPEED-----ATLLPGHSGRDNHPIVSRSSSIP	382
Rana	LLGE-EHRKNHCLGVK-----DDSSGRASCMDPEIPPEED-----ATLLPGHSGRDNHPIVSRSSSIP	397
Tortuga	LLGD-NHCKSHNCLGVK-----DDSSGRASCMDPEIPPEED-----ATLLPGHSGRDNHPIVSRSSSIP	400
Pollo	LLSD-DHLKSHCLGAK-----DDSSGRASCMDPEIPPEED-----ATLLPGHSGRDNHPIVSRSSSIP	404
Hombre	LLSS-DHEKSHNLGVK-----DDSSGRASCMDPEIPPEED-----ATLLPGHSGRDNHPIVSRSSSIP	427
▶ GHR 3 ◀		
Dorada	-----ERSERLVITGCGQTLNDFYAVSNVMSGGVVLSPGQQLRFQESTSAADEAQKKGSED-SEEK	476
Chopa	-----ERSERLMTGCGQTLNDFYAVSNVMSGGVVLSPGQQLRFQESTSAADEAQKKGSED-SEVK	476
Rodaballo	-----ERSKRALITGCGQTLNDFYAVSNVMSGGVVLSPGQQLRFQESTSAATEEKQNIKESDRGDEK	478
Carpa	D-----LGVQOTSEVKETPIKQPAV-SAVNDFYAVSDFTAGGVVLSPGQ-----LNSLLEK-KK-----EEE	442
Rana	G--SPKPEAKTCFVAVSENEFTSLVSAPIKMKRAKPSMDFFALVSDITFAGRLLLSPGQRKMNENEENCFVIOHP-----	473
Tortuga	PNTNIQEDNQSKLPFADSIESTREPVHTLNSQSGANTDFYAVSNVMSGGVVLSPGQTKRRRTQCEAYTEPAIPCQ-----	481
Pollo	PHTSTQSERESWPFADSTDSANPSVHTLNSQNSLNTDFYAVSDITFAGSVVLSPGQKKGRAOECSTE-----	479
Hombre	P-SVIOAEKNKPOP LFTGAESTHQAAHILNSNPSLSLNTDFYAVSDITFAGSVVLSPGQKKNKAGMSQCDMHPMVSILCO-----	507
▶ GHR 4 ◀		
Dorada	TORELOFOLLVDPPEGGGTTLSNARQI-----STPSTEMEGSYOTIHPQVETK-----PAATAENNSPVVILPDSQSOFF	551
Chopa	AQKELQFOLLVDPPEGGGTTLSNARQI-----STPSTEMEGSYOTIHPQVETK-----PAATAENNSPVVILPDSQSOFF	551
Rodaballo	KQKELQFOLLVDPPEGGGTTLSNARQI-----STPSTEMEGSYOTIHPQVETK-----PAATAENNSPVVILPDSQSOFF	551
Carpa	NEKKIOPQIVSD-----GATSENTARQI-----SAPVSESEGEQYOTFTQAVEGTGERGVGCPFSDSMPYLLIPEAFSPIL	519
Rana	-----ANLNPDSPIICSAVTAFAASKPRDTEASVKN-VIDDSFTTESLNIPEM-----NPFCA-EKASSYD	536
Tortuga	-----PNETTIDYAFCEADYKCKIAVTSQDAVEPHAQESENEDVSTIESLTTAE-----NPGRAIVEASSSE	546
Pollo	-----ONFTMDNAPFCADYKCKIAVTSQDAVEPHAQESENEDVSTIESLTTAE-----NPGRAIVEASSSE	544
Hombre	-----ENFLMDNAPFCADYKCKIPVAPHIKVESHIQFSLNQEDITFTIESLTTAAG-----RLGASMAETPSME	571
▶ GHR 4 ◀		
Dorada	APVADYTVQVEVBSQSHLLNPPPRQ-SPPCLFHHFTKALAAKMRVYGVVTPILLGNLSP	609
Chopa	APVADYTVQVEVBSQSHLLNPPPRQ-SPPCLFHHFTKALAAKMRVYGVVTPILLGNLSP	609
Rodaballo	APVSDYTVQVEVBTESHLLNPPPHQ-STPCLFQHPFKALPAMPVGVVTPILLGNLSP	609
Carpa	PPVSDYTVQVEVBAQSHLLNPPSSQPAICHSNKNKLPMPTEMGSLTDFLGNLTP	578
Rana	MPVSDYTSWHIINSQNIWNTVLP-----N-KEFLAECGMPTFOVKNYMK	583
Tortuga	MPVSDYTSIHHIHSPOGIVNATALP-----VDFKFLSCGVSTQVKNKILP	595
Pollo	MPVSDYTSIHHIHSPOGIVNATALP-----VDFKFLSCGVSTQVKNKILP	593
Hombre	MPVSDYTSIHHIHSPOGIVNATALP-----LPDKREFLSSCGVSTQVKNKIMF	620

Figura 6.4. (continuación)

Las GHs de mamíferos son capaces de interactuar con los RGHs de peces, ejerciendo un efecto acelerador *in vivo* sobre el crecimiento. Sin embargo, esta asunción no se da a la inversa. La única excepción es la GH de anguila (Le Bail y cols., 1993), posiblemente debido a que esta proteína está más relacionada con las GHs de mamíferos que con las de peces (Saito y cols., 1988). En base al principio de coevolución entre ligandos y receptores, posiblemente ello también es extrapolable a los RGHs. Así pues, la identidad aminoacídica de los RGHs de dorada y carpa dorada es del orden del 52%, manteniéndose en un 50% para la GH (Martínez-Barberá y cols., 1994; Law y cols., 1996). De modo similar, la comparación de los RGHs de dorada y rodaballo muestra una identidad del 76% para los RGHs, y del 73% para las GHs de las familias Sparidae y Pleuronectidae (Pendón y cols., 1994).

Tal y como se muestra en la Figura 6.5, el árbol filogenético basado en las secuencias aminoacídicas de RGHs refleja la misma agrupación que la actual jerarquía de vertebrados, estando los peces claramente agrupados y separados de las demás especies de vertebrados superiores. Sin embargo, esto no siempre es así, ya que las distancias filogenéticas entre los receptores de PRL (RPRL) de platija japonesa (Higashimoto y cols., 2001), tilapia (Sandra y cols., 1995), carpa dorada (Tse y cols., 2000), trucha (Le Rouzic y cols., 2001) y dorada (Santos y cols., 2001) son más grandes que las encontradas para otros grupos de vertebrados. La secuencia de RPRL más divergente es la de la dorada, la cual es entre 70-100 aminoácidos más corta que la de cualquier otro RPRL, como consecuencia de varias deleciones en la región citoplasmática.

Cuando se comparan las regiones citoplasmáticas de los RGHs de peces y vertebrados superiores se observa que éstas también son claramente divergentes. Así pues, las tirosinas citoplasmáticas y otras regiones clave, como el Dominio 1 y 2, están presentes en todas las especies, pero la distancia entre estos dominios es altamente variable.

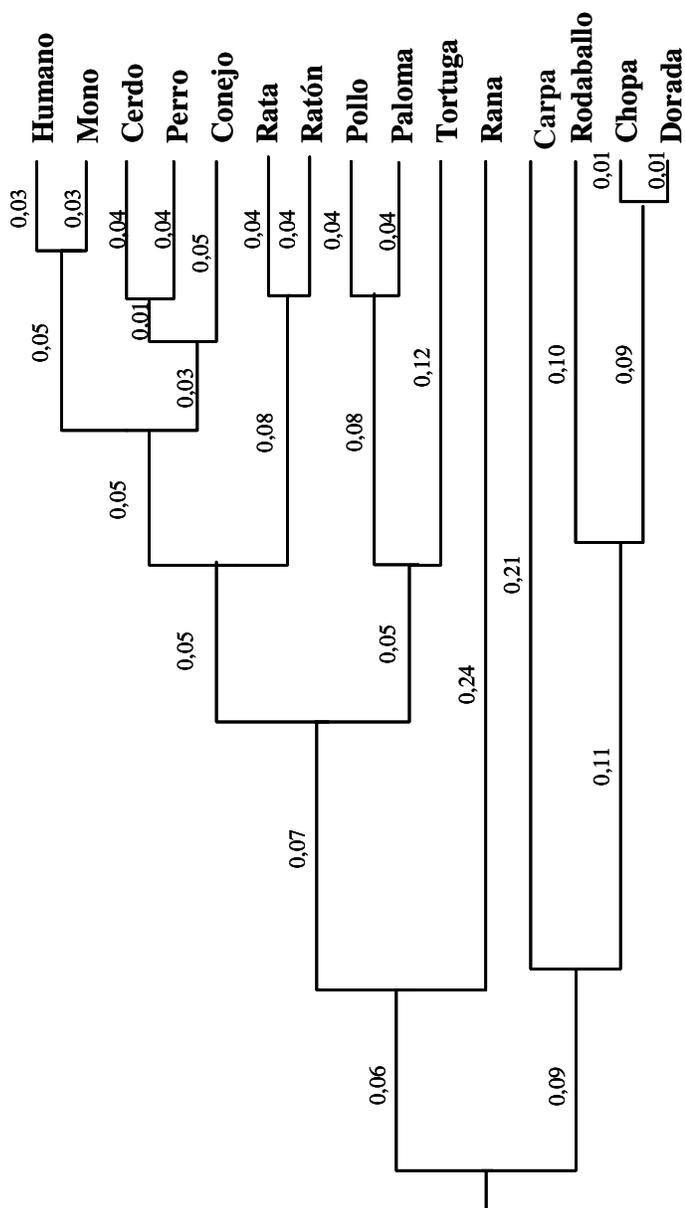


Figura 6.5. Análisis filogenético (UPGMA) de las secuencias aminoacídicas de RGHS mediante el programa Mega2 versión 2.1 (Kumar y cols., 2001).

El análisis de las secuencias de los RGHs en dos espáridos- dorada y chopá- mostró una identidad del 96,6% a nivel aminoacídico y del 96,8% a nivel nucleotídico. En la chopá, también se ha puesto de relieve la existencia de una forma larga con una inserción de aproximadamente 100 pb en la región citoplasmática (Tse y cols., 2003). En dorada, rodaballo y lubina, dicha forma no se consiguió detectar mediante RT-PCR de ARN total hepático (Fig. 6.6), basado en el uso de cebadores degenerados (GHR2 y GHR3). No obstante, cuando se partió de ADN genómico se encontró una banda de unos 100 pb más larga de lo esperado, fruto de una inserción de ADN en la misma posición que en la chopá.

Al igual que con el 3'RACE, el análisis por Northern blot de los RGHs de dorada con sondas extracelulares y citoplasmáticas mostró una única banda de aproximadamente 4-5 Kb (Fig. 6.7). Este tamaño es similar al transcrito mayoritario de vertebrados superiores (Edens y Talamantes, 1998) y carpa dorada (Lee y cols., 2001). En principio, no se puede excluir la existencia de mensajeros alternativos con mutaciones puntuales que podrían alterar la pauta de lectura, dando lugar a un codón de parada prematuro. De hecho, en vertebrados superiores, se ha descrito una variante de RGH que resulta de una delección de 26 pb después de los tres primeros aminoácidos de la región intracelular (Dastot y col., 1996). Sin embargo, el *screening* de esta región por RT-PCR sólo mostró una banda del tamaño esperado en hígado, músculo, y tejido adiposo. Geles de poliacrilamida de alta resolución (12%) confirmaron la ausencia de bandas adicionales (Fig.6.8).

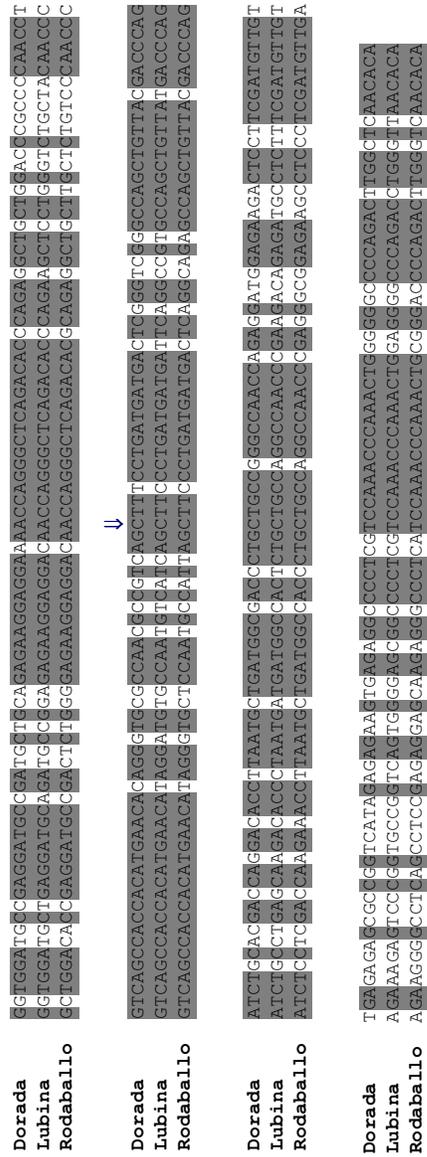


Figura 6.6. Alineamiento nucleotídico de los productos de PCR amplificados con cebadores degenerados (RGH2, RGH3) a partir de ARN total hepático de dorada, lubina y rodaballo. Los nucleótidos idénticos están señalados en gris. La flecha indica el punto de unión entre el exón y el intrón exclusivo de peces (AG/CT).

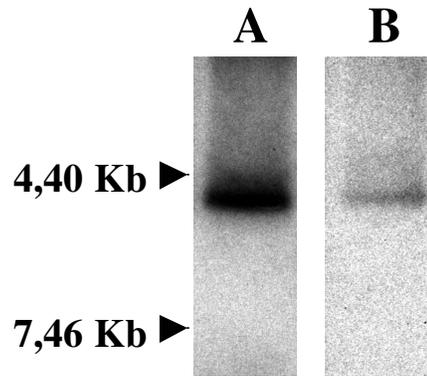


Figura 6.7. Northern blot de ARNm con una sonda extracelular (A) e intracelular (B). La banda detectada es de aproximadamente 4,5 Kb.

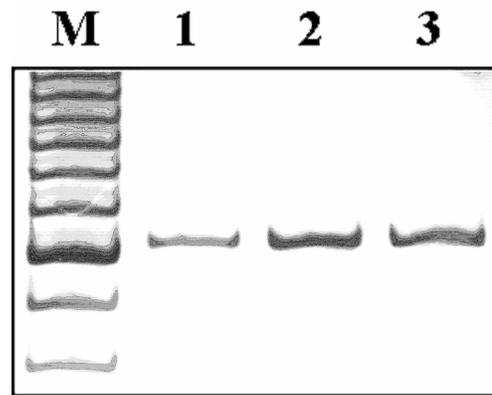


Figura 6.8. Gel de poliacrilamida al 12% de ARN total amplificado con cebadores que codifican para la región comprendida entre el dominio transmembrana y los Dominios 1 y 2 citoplasmáticos (sentido, 5'- GAC TCCGTGTTCATTCAAGTGACTG; antisentido, 5'- TCCTCCTTCTCTGCAGCATCG). M, marcador de pesos moleculares en escala de 50 pb; 1, tejido adiposo; 2, hígado; 3, músculo. La banda más intensa es de 350 pb.

Recientemente, el mapeo parcial del ADN genómico que codifica para los RGHs de dorada y rodaballo, ha puesto de relieve la misma organización exón-intrón en Pleuronectiformes (rodaballo; GenBank: AY345330) y Perciformes (dorada; GenBank: AY345329) (Pérez-Sánchez y cols., 2004). Para ello se utilizaron cebadores específicos (Tabla 6.3), lo que permitió detectar seis exones homólogos a los exones 4-9 de los RGHs de vertebrados superiores (ver Fig. 6.10). Asimismo, se ha comprobado que la secuencia divergente y el 3'-UTR del RGH truncado de rodaballo son codificados por el extremo 5' del intrón 9/10. De igual forma, se ha comprobado que el intrón 10/10A de la chopra está también presente en dorada y rodaballo. En dorada, este intrón exclusivo de peces tiene el mismo tamaño que el de la chopra (93 pb), pero con un bajo grado de identidad aminoacídica (60%). En rodaballo este intrón es más largo (113 pb) y contiene varios codones de parada.

Todas las uniones intrón-exón poseen los GT-AT característicos y los nucleótidos circundantes están altamente relacionados con las secuencias consenso encontradas cerca de las uniones. Estos intrones son más cortos que los de vertebrados superiores y la mayor parte de la secuencia transcrita del RGH se extiende a lo largo de 6 Kb; con los exones 4-7 codificantes para la región extracelular, el exón 8 codificante para la región transmembrana y los exones 9, 10 y 10A codificantes para la región intracelular y 3'-UTR (ver Fig. 6.9).

El *screening* en las bases de datos de los genomas del pez cebra y *Fugu* (<http://www.ensembl.org>) para el análisis de las secuencias ensambladas de ADN de los RGHs mostró una estricta conservación de los exones 4-9 (Fig. 6.10). Sin embargo, el exón exclusivo de peces (10/10A) no está presente en pez cebra. El significado evolutivo de este intrón 10/10A no está claro, aunque parece probable que se haya originado a partir de distintas inserciones de ADN después de la divergencia entre los linajes de peces y mamíferos hace unos 450 millones de años. En cualquier caso, es de suponer que estudios en peces primitivos aportarán nueva información sobre la estructura y evolución de los RGHs de peces y de la relación existente entre las isoformas emergentes de RGHs. Éstas representan un nivel adicional de

regulación en los tejidos diana, aunque se sospecha la existencia de un alto grado de variabilidad entre especies muy próximas.

Tabla 6.3. Secuencia de los cebadores utilizados en la caracterización de la estructura genómica del RGH en dorada y rodaballo. Las PCRs consistieron en 35 ciclos de 1 min. a 94°C, 2 min. a 55-57,5°C y 3 min. a 72°C.

Cebadores	Posición ADNc
Dorada	
5'- CGCATTTCACGGAGTGCATATCG (sentido)	53-75
5'- CTACGGTGAAACAGTAGTCCTCGTCCAG (antisentido)	304-331
5'- CCAACAGTGAATGGAAAGAGTGTCGG (sentido)	176-201
5'- GGCTCCCAGTTGACCATGACATCATAAC (antisentido)	404-431
5'- CCCTCTGGGCTCAGTTATGATGTCATGG (sentido)	391-418
5'- TCTCAGTCACTTGAATGAACACGGAGTC (antisentido)	634-661
5'- GCCGCACACCCAGCAGACAATCTAC (sentido)	531-555
5'- GCTGAGAGATGCCAATGAGCAAGATGAG (antisentido)	730-757
5'- TTTGGGCATCCTCATACTCATCTTGCTC (sentido)	714-741
5'- AGGAACCGGCGGCAACAGAATC (antisentido)	774-795
5'- ATTCTGTTGCCGCCGGTTCCTG (sentido)	775-796
5'- GTTGGCGCACCTGTGTTTCATG (antisentido)	1041-1062
5'- AGACGAGCCATGGGTGGAGTTCATCGA (sentido)	918-944
5'- CGTTGCTGACCTGGGCATAGAAGTC (antisentido)	1282-1306
5'- CCTAAAGTGGCAGTGCATTTTCATGGTG (antisentido)	1823-1850
Rodaballo	
5'- GCCTCATTTCACTGAGTGCATCTCAAG (sentido)	57-83
5'- GAAGAAGCACTCCCGTTTGAATG (antisentido)	217-240
5'- AGAGAGTGTCCACAGTACATCCATTCGAAC (sentido)	196-225
5'- GGGCTCCCAGTTGACCATGACATC (antisentido)	412-435
5'- CAGTGTCTCTAAACTGGACCCTCCTGAAC (sentido)	359-387
5'- CACGTGAATGAAGATGGAAGTCTGAAC (antisentido)	630-657
5'- CCCAGAGTCAGCAGACAATCTTCGG (sentido)	536-560
5'- CATGATGAGTATGAGGATGCCACAATC (antisentido)	714-741
5'- TTCCCTCTCGCGTTGTCTTG (sentido)	685-706
5'- CAGGAAGTGGTGGCAGCAGAATCATC (antisentido)	774-779
5'- GATTCTGCTGCCACCAGTTCCTGC (sentido)	777-800
5'- ACCCTATGTTTCATGTGGTGGCTGACG (antisentido)	1032-1057
5'- AGACGAGCCATGGGTGGAGTTCATCGA (sentido)	921-947
5'- CATTGCTGACCTGCGCATAGAAGTC (antisentido)	1285-1309
5'- CACCCATAGGTCCATTGGCATTGTC (antisentido)	1834-1858

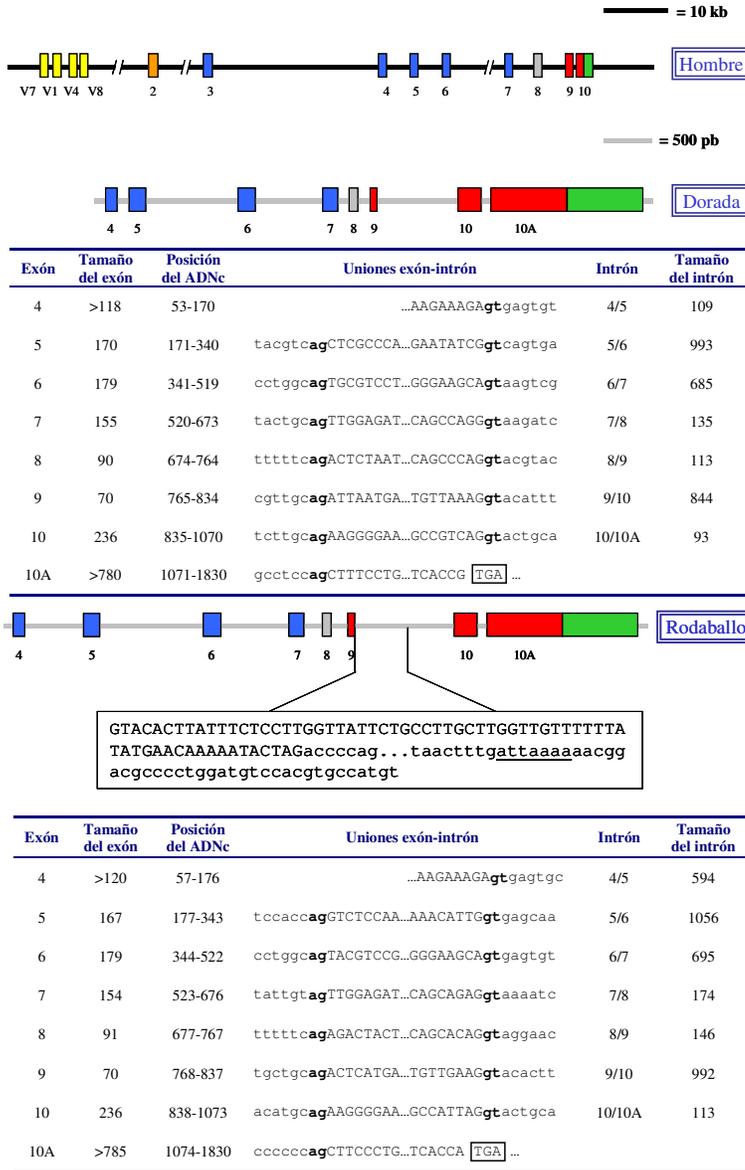


Figura 6.9. Representación esquemática de la organización intrón-exón de los RGHs de humanos (GenBank: AH002706), dorada (GenBank: AY345330) y rodaballo (GenBank: AY345329). El exón 2 (naranja) codifica el péptido señal; los exones 3-7 (azul) codifican los dominios extracelulares; el exón 8 (gris) codifica el dominio transmembrana; los exones 9, 10 y 10A codifican el dominio intracelular (rojo) y 3'UTR (verde). Las uniones exón-intrón de los RGHs de dorada y rodaballo están indicadas en las tablas. La secuencia divergente correspondiente al intrón 9/10, que origina la forma truncada del RGH en rodaballo, se encuentra ampliada en el recuadro (modificado de Pérez- Sánchez y cols., 2004).

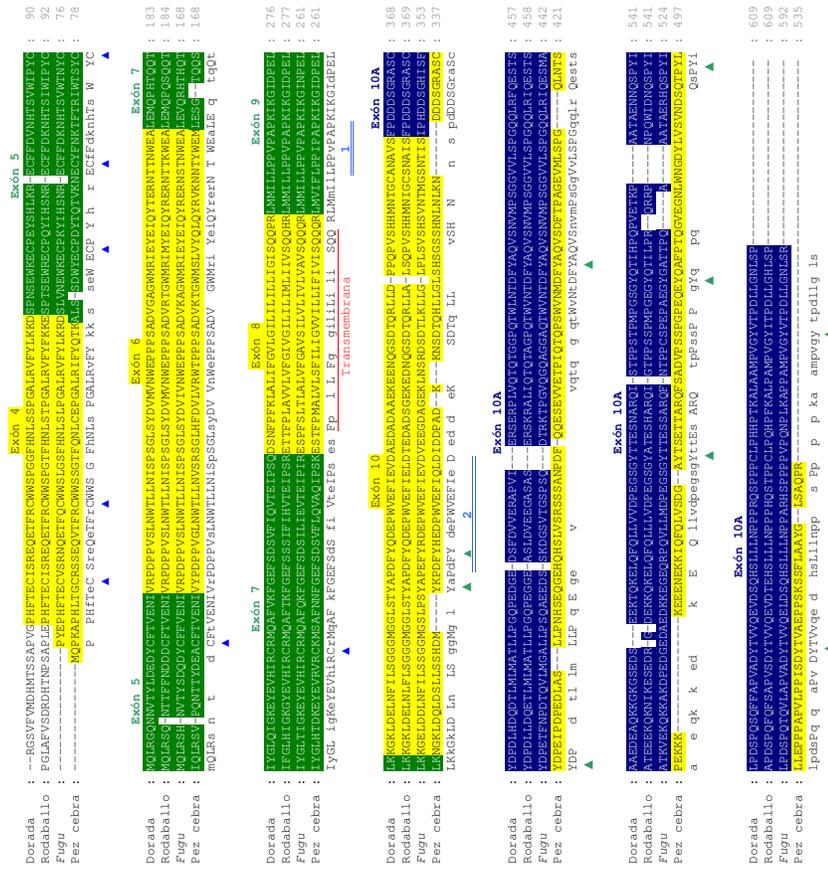


Figura 6.10. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los RGHs de dorada, rodaballo, Fugu y pez cebra. El cambio de color indica cambio de exón. Las secuencias de Fugu y pez cebra son el resultado de las secuencias ensambladas (<http://www.ensembl.org>). El inicio del exón 4 de dorada y rodaballo no se ha determinado con precisión (posición ADNc: <53-57). Los exones 10 y 10A corresponden a un único exón en el pez cebra (exón 10). La secuencia consenso está indicada en la parte inferior. ▲, cisteínas extracelulares; ▲, tirosinas citoplasmáticas; —, región transmembrana; =, Dominios 1 y 2 citoplasmáticos (modificado de Pérez-Sánchez y cols., 2004).

6.3.2. *Cross-linking*: glicosilación

Los análisis de *cross-linking* también abogaron por la existencia de un único mensajero para los RGHs de dorada. De hecho, en condiciones no reductoras, se detectaron dos bandas que desaparecían por completo en presencia de un exceso de GH recombinante de dorada no marcada (Fig. 6.10). Las bandas detectadas mostraron un peso molecular aproximado de 61 y 77 kDa, una vez eliminado el peso molecular de la GH recombinante. Dichas bandas corresponderían al RGH de dorada con distinto grado de glicosilación. Según esto, la banda de menor peso molecular correspondería al tamaño esperado para la forma no glicosilada del receptor (67,8 kDa), mientras que la banda de mayor peso e intensidad se correspondería con la forma glicosilada. También se han obtenido mediante *ligand blotting* fragmentos de distinto tamaño y, probablemente, con distinto grado de glicosilación en cultivos de hepatocitos de carpa dorada tratados con yodoacetamida (Zhang y Marchant, 1999).

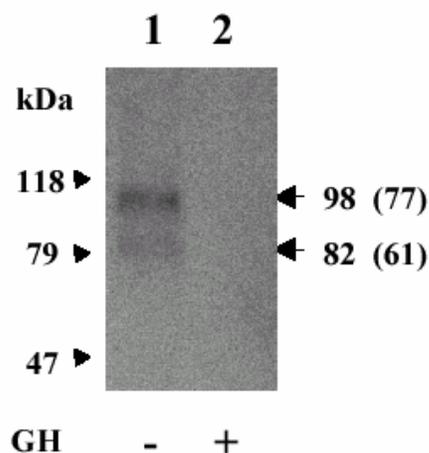


Figura 6.10. Análisis de *cross-linking* con ^{125}I -dGH en preparaciones de membrana hepáticas de dorada sin (1) y con (2) exceso de GH recombinante de dorada no marcada. El peso molecular estimado del RGH está indicado entre paréntesis.

6.3.3. Expresión tisular y regulación estacional

En este capítulo también se abordó, aunque de forma incipiente, el estudio de la regulación transcripcional de los RGHs de dorada (forma larga anclada a membrana).

Con este objetivo, se desarrolló una PCR- en tiempo real- como método reproducible capaz de cuantificar los ARN mensajeros del RGH e IGF-I en diferentes tejidos (hígado, músculo blanco, tejido adiposo). En estos ensayos, la pendiente de las diluciones seriadas de los estándares de plásmidos recombinantes (3,25-3,34) no difirió de forma significativa del valor teórico (3,37) (Fig. 6.11). Las rectas obtenidas con diluciones seriadas de muestras de RT fueron paralelas a dichos estándares. También se encontró un claro paralelismo cuando las cantidades de ARN transcrito variaron entre 0,5 y 1,5 μg , por lo que de forma rutinaria se utilizó 1 μg de ARN total como muestra de partida. En estas condiciones experimentales, el coeficiente de variación intra-ensayo de las muestras ($n = 4$) osciló entre el 6% y el 15%.

De los resultados obtenidos se deduce que la cantidad de transcritos hepáticos de RGH es entre 1,5-2 veces mayor que en el músculo blanco y el tejido adiposo visceral (Fig. 6.12A). Esta relación tisular está en consonancia con los estudios previos realizados en mamíferos (Hermansson y cols., 1997; Ballesteros y cols., 2000). También se encontraron resultados similares en la chopa mediante análisis de PCR-semicuantitativo (Tse y cols., 2003). No obstante, estudios previos en trucha (Pérez-Sánchez y cols., 1991; Yao y cols., 1991) y dorada (Pérez-Sánchez y cols., 1994a), mediante ensayos de radiorreceptores homólogos, han mostrado que la cantidad de RGHs hepáticos (proteína) es al menos 10 veces mayor que en el sistema nervioso central y tejidos periféricos.

Por el contrario, la abundancia de transcritos de IGF-I fue claramente mayor en el hígado que en el músculo blanco y tejido adiposo (Fig. 6.12B). Ello está en consonancia con estudios previos realizados en salmónidos (Duan y Duguay, 1994) y dorada (Duguay y cols., 1996), donde la administración de GH

exógena no aumenta la expresión génica de IGF-I en el músculo esquelético.

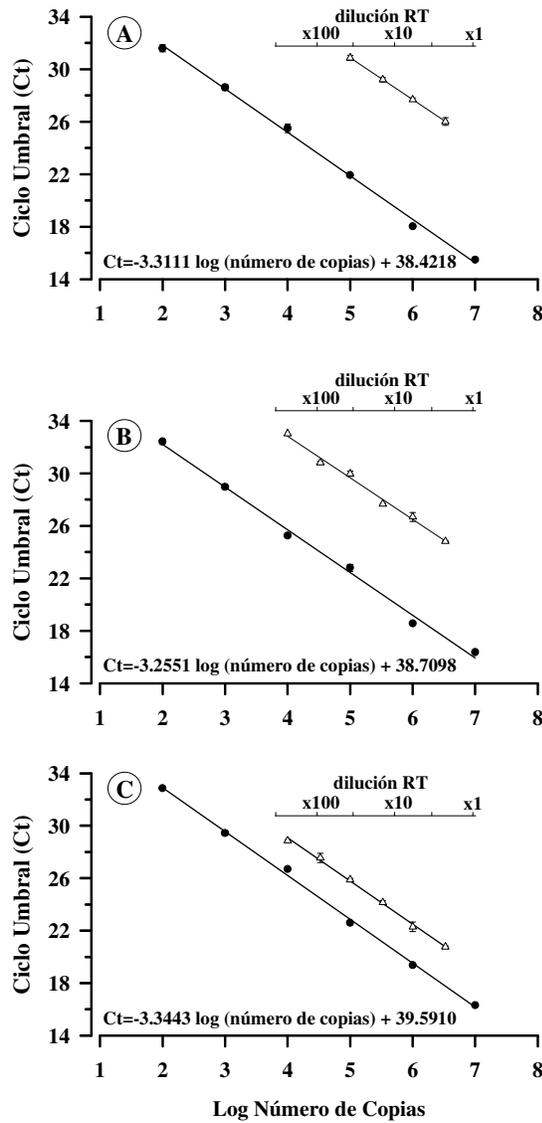


Figura 6.11. ●, Curvas estándar de plásmidos recombinantes de RGH (A), IGF-I (B) y β -actina (C). Δ , Diluciones seriadas de muestras de RT amplificadas con cebadores específicos).

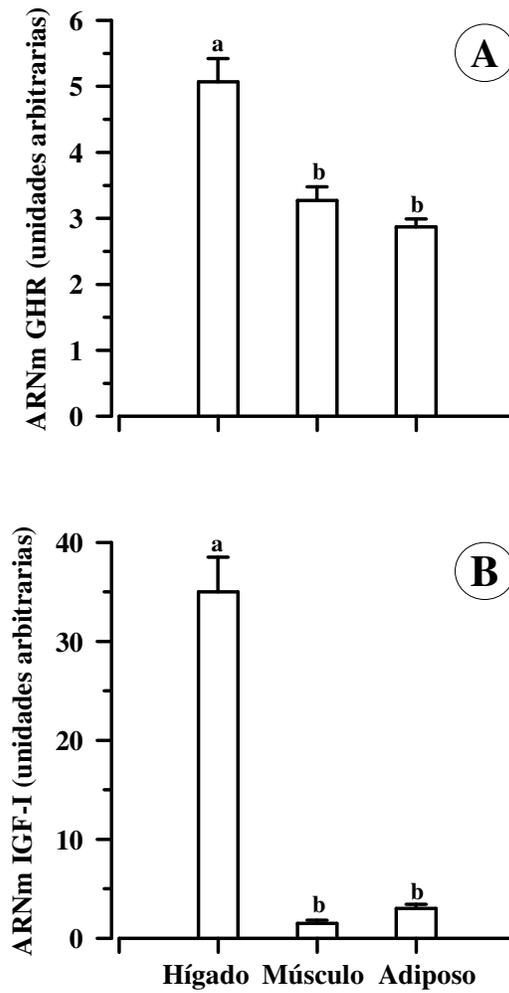


Figura 6.12. Medidas de los transcritos de RGH (A) e IGF-I (B) en hígado, músculo y tejidos adiposo. Los valores representan la media \pm error estándar de cinco cuantificaciones por separado. Las medias con superíndices distintos muestran diferencias significativas ($P < 0,05$) (ANOVA de una vía, Student-Newman-Keuls)

Es de reseñar que en las experiencias en curso se comprobó que los aumentos de los niveles circulantes de GH e IGF-I al inicio del verano (Fig. 6.13C y 6.13D) coincidieron con el incremento a nivel hepático de la transcripción de la IGF-I y de los RGHs (Fig. 6.13A y 6.13B). Ello está de acuerdo con la aceleración del crecimiento obtenida durante la fase estival (ver Capítulos 3 y 4). En cualquier caso, los estudios encaminados a establecer las bases de la regulación hepática y extra-hepática de los RGHs están todavía en sus comienzos. Aunque se ha de destacar que los trabajos iniciados en esta tesis doctoral han proporcionado una herramienta de notable utilidad para un adecuado *screening* de fuentes alternativas de proteínas vegetales como sustitutos de la harina de pescado (Gómez-Requeni y cols., 2004). Todo ello confirma el papel clave que desempeñan los RGHs en la regulación nutricional y estacional del crecimiento.

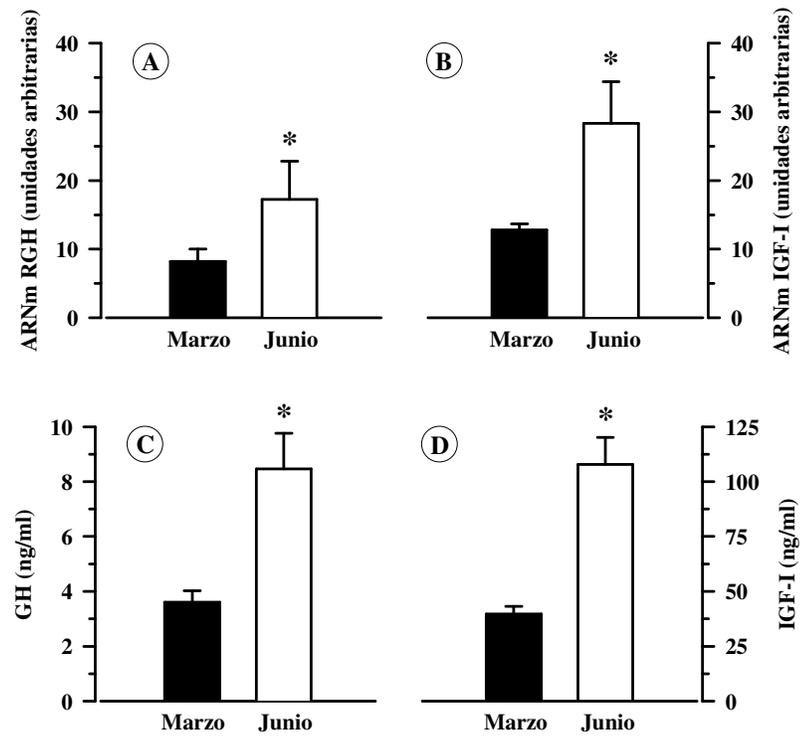
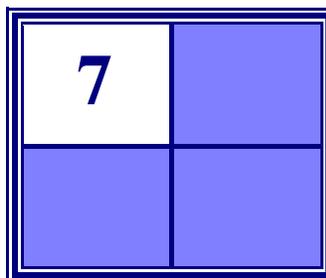
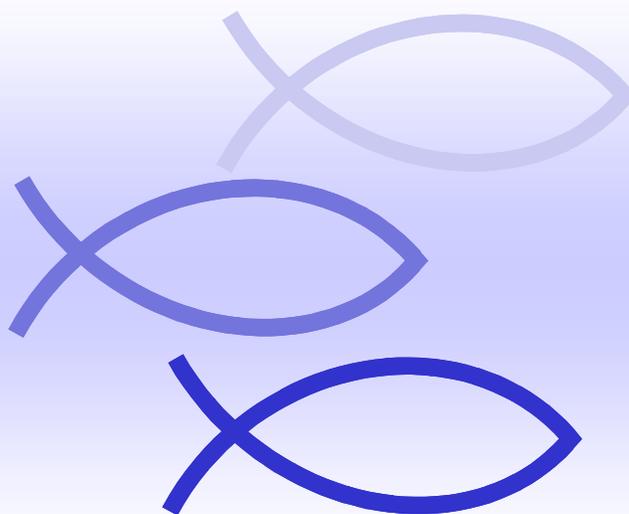


Figura 6.12. Variaciones estacionales de transcritos de RGH (A) e IGF-I (B). Niveles plasmáticos de GH (C) e IGF-I (D) analizados mediante RIAs homólogos. Cada valor es la media \pm error estándar de cinco (PCR- en tiempo real-) o diez animales (RIAs). *, diferencias significativas ($P < 0,05$, t-Student).



Conclusiones

Productos-Resultados transferibles



Conclusiones

PRIMERA: La somatolactina y la actividad del sistema somatotrópico muestran un carácter marcadamente estacional.

SEGUNDA: Los niveles más altos de GH circulante se dan al inicio de la estación cálida.

TERCERA: Con independencia del periodo de engorde, existe una clara correlación positiva entre GH circulante y nivel de ingesta (demanda energética).

CUARTA: Los niveles circulantes de IGF-I están correlacionados positivamente con el incremento estival de las tasas de crecimiento.

QUINTA: El fuerte incremento de los niveles circulantes de SL se da una vez completado el relleno estival de las reservas energéticas.

SEXTA: Existe un tamaño crítico por debajo del cual está enmascarado el incremento otoñal de los niveles circulantes de SL.

SÉPTIMA: Las alteraciones de los ritmos circanales de GH y SL son fiel reflejo del estado nutricional de los animales en cultivo.

OCTAVA: La restricción moderada de la ingesta aumenta la amplitud del ciclo estival de GH circulante.

NOVENA: La restricción moderada de la ingesta retrasa el pico otoñal de SL circulante.

DÉCIMA: La restricción moderada de alimento mejora las tasas de conversión, aunque su incidencia sobre el nivel de adiposidad depende de la fase de inicio del ciclo de engorde.

UNDÉCIMA: Los regímenes de alimentación restringida mejoran: a) el estado de inmunocompetencia, b) disminuyen la incidencia de esteatosis hepática, c) preservan la integridad gastro-intestinal, y d) disminuyen la incidencia de episodios de morbilidad y/o mortalidad por goteo.

DUODÉCIMA: Los RGHs de dorada conservan todos los motivos estructurales propios de los RGHs de vertebrados superiores.

DÉCIMOTERCERA: El incremento estival de las tasas de crecimiento va acompañado de la activación de la transcripción hepática de IGF-I y de los RGHs.

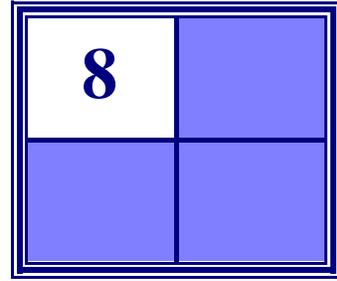
DECIMOCUARTA: En dorada no existen o están poco representados los mensajeros que codifican para isoformas de RGHs ancladas a membrana.

DECIMOQUINTA: Los análisis de *cross-linking* están de acuerdo en la existencia de una única proteína de RGHs con diferentes grados de glicosilación.

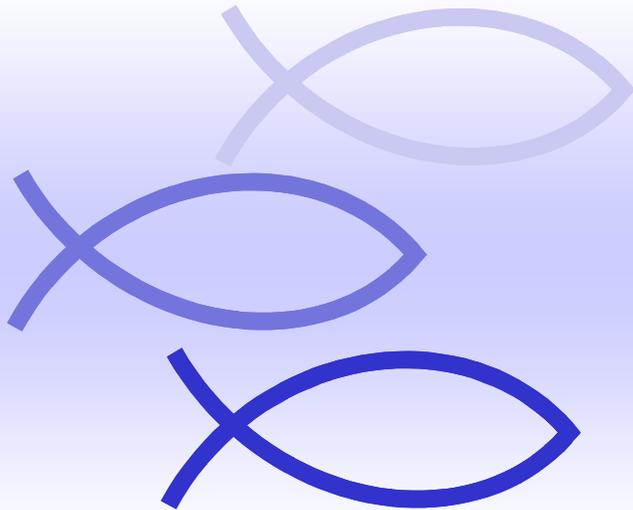
DECIMOSEXTA: La estructura exón-intrón de los RGHs está altamente conservada a lo largo de la evolución de los vertebrados, aunque existe un intrón (10/10A) exclusivo de peces.

Productos-Resultados Transferibles

- 1)** Nuevo conocimiento sobre el estado de inmunocompetencia y regulación del crecimiento, de la ingesta y del nivel de adiposidad de doradas en cultivo.
- 2)** Modelo de regulación estacional de la SL y del sistema somatotrópico en peces.
- 3)** Criterios hormonales para determinar el estado nutricional de doradas en cultivo a lo largo de un ciclo completo de engorde.
- 4)** Pautas de alimentación en dorada en función del periodo de inicio del engorde.
- 5)** Caracterización de genes ligados a caracteres de interés: secuencias y organización exón-intrón de los RGHs de dorada y rodaballo.
- 6)** Mecanismos de generación de isoformas de RGHs en peces.
- 7)** Datos de actividad transcripcional de IGFs y RGHs en peces.



Bibliografía



-A-

- Agellon, L.B., Davies, S.L., Chen, T.T., y Powers, D.A. (1988). Structure of a fish (rainbow trout) growth hormone gene and its evolutionary implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 5136-5140.
- Ahima, R.S., Saper, C.B., Flier, J.S., y Elmquist, J.K. (2000). Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol.* **21**, 263-307.
- Ahima, R.S., y Flier, J.S. (2000) Leptin. *Annu. Rev. Physiol.* **62**, 413-437.
- Ainsworth, A.J., Mao, C.P., y Boyle, C.R. (1994). Immune response enhancement in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, using beta-glucan from *Schizophyllum commune*. En: Modulators of fish immune responses. Eds.: Stolen, J.S., y Fletcher, T.C.
- Alami-Durante, H., Fauconneau, B., Rouel, M., Escaffre, A.M., y Bergot, P. (1997). Growth and multiplication of white skeletal muscle fibres in carp larvae in relation to somatic growth rate. *J. Fish Biol.* **50**, 1285-1302.
- Alexander, B., e Ingram, G.A. (1992). Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Ann. Rev. Fish Dis.* **2**, 249-279.
- Ali, S., Pellegrini, I., y Kelly, P.A. (1991). A prolactin-dependent immune cell line (Nb2) expresses a mutant form of prolactin receptor. *J. Biol. Chem.* **266**, 20110-20117.
- Álvarez-Pellitero, P., y Sitjà-Bobadilla, A. (2002). *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *Int. J. Parasitol.* **32**, 1007-1009.
- Amit, T., Bergman, T., Dastot, F., Youdim, M.B., Amselem, S., y Hochberg, Z. (1997). A membrane-fixed, truncated isoform of the human growth hormone receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 3813-3817.
- Andersen, F., Lygren, B., Maage, A., y Waagbø, R. (1998). Interaction between two dietary levels of iron and two forms of ascorbic acid and the effect on growth, antioxidant status and some non-specific immune parameters in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Aquaculture* **161**, 437-451.
- Ando, S., Mori, Y., Nakamura, K., y Sugawara, A. (1993). Characteristics of lipid accumulation types in five species of fish. *Nippon Suisan Gakkaishi* **59**, 1559-1564.
- Arenas, M.I., Fraile, B., De Miguel, M., y Paniagua, R. (1995). Intermediate filaments in the testis of the teleost mosquito fish *Gambusia affinis holbrooki*: a light and electron microscope immunocytochemical study and Western blotting analysis. *Histochem. J.* **27**, 329-337.
- Argetsinger, L.S., y Carter-Su, C. (1996). Mechanism of signalling by growth hormone receptor. *Physiol. Rev.* **76**, 1089-1107.
- Arias, C.R., Macián, M.C., Aznar, R., Garay, E., y Pujalte, M.J. (1999). Low incidence of *Vibrio vulnificus* among *Vibrio* isolates from seawater and shellfish of the western Mediterranean coast. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 125-134.

- Asa, S.L., Penz, G., Kovacs, K., y Ezrin, C. (1982). Prolactin cells in the human pituitary. A quantitative immunocytochemical analysis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **106**, 360-363.
- Ashwell, C.M., Czerwinski, S.M., Brocht, D.M., y McMurtry, J.P. (1999). Hormonal regulation of leptin expression in broiler chickens. *Am. J. Physiol.* **276**, R226-R232.
- Astola A., Pendón, C., Ortíz, M., Valdivia, M.M. (1996). Cloning and expression of somatolactin, a pituitary hormone related to growth hormone and prolactin from gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **104**, 330-336.
- Astola, A., Ortíz, M., Calduch-Giner, J.A., Pérez-Sánchez, J., y Valdivia, M.M. (2003). Isolation of *Sparus aurata* prolactin gene and activity of the cis-acting regulatory elements. *Gen. Comp. Endocrinol.* **134**, 57-61.
- Astola, A., Calduch-Giner, J.A., Pérez-Sánchez, J., y Valdivia, M.M. (2004). Genomic structure and functional analysis of the promoter region of somatolactin gene of the fish *Sparus aurata*. *Mar. Biotechnol.*, en prensa.
- Auperin, B., Rentier-Delrue, F., Martial, J.A., y Prunet, P. (1994). Evidence that two tilapia (*Oreochromis niloticus*) prolactins have different osmoregulatory functions during adaptation to a hyperosmotic environment. *J. Mol. Endocrinol.* **12**, 13-24.
- Auperin, R., Baroiller, J.F., Rincordel, M.J., Fostier, A., y Prunet, P. (1997). Effects of confinement stress on circulating levels of growth hormone and two prolactins in freshwater-adapted tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **108**, 35-34.
- Aursand, M., Bleivik, B., Rainuzzo, J.R., Jørgensen, L., y Mohr, V. (1994). Lipid distribution and composition of commercially farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Sci. Food Agricult.* **64**, 239-248.
- Ayaso, E., Nolan, C.M, y Byrnes, L. (2002). Zebrafish insulin-like growth factor-I receptor: molecular cloning and developmental expression. *Mol. Cell Endocrinol.* **191**, 137-148.
- Ayson, F.G., Kaneko, T., Hasegawa, S., e Hirano, T. (1994). Differential expression of two prolactin and growth hormone genes during early development of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) in fresh water and seawater: implications for possible involvement in osmoregulation during early life stages. *Gen. Comp. Endocrinol.* **95**, 143-52.

-B-

- Baker, D.M., Larsen, D.A., Swanson, P., y Dickhoff, W.W. (2000). Long-term peripheral treatment of immature coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) with human leptin has no clear physiologic effect. *Gen. Comp. Endocrinol.* **118**, 134-138.
- Balfry, S.K., Shariff, M., e Iwama, G.K. (1997). Strain differences in non-specific immunity of tilapia *Oreochromis niloticus* following challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. *Diseases of Aquatic Organism* **30**, 77-80.

- Balfy, S.K., y Higgs, D.A. (2001). Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistance of finfish. En: Nutrition and fish health. Eds.: Lim, C., y Webster, C.D.
- Ballard, F.J., Johnson, R.J., Owens, P.C., Francis, G.L., Upton, F.M., McMurtry, J.P., y Wallace, J.C. (1990). Chicken insulin-like growth factor-I: amino acid sequence, radioimmunoassay, and plasma levels between strains and during growth. *Gen. Comp. Endocrinol.* **79**, 459-468.
- Ballesteros, M., Leung, K.-C., Ross, R.J.M., Iismaa, T.P., y Ho, K.K.Y. (2000). Distribution and abundance of messenger ribonucleic acid for growth hormone receptor isoforms in human tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 2865-2871.
- Barb, C.R., Yan, X., Azain, M.J., Kraeling, R.R., Rampacek, G.B., y Ramsay, T.G. (1998). Recombinant porcine leptin reduces feed intake and stimulates growth hormone secretion in swine. *Domest. Anim. Endocrinol.* **15**, 77-86.
- Barnard, R., y Waters, M.J. (1997). The GH binding protein: Pregnant with possibilities? *J. Endocrinol.* **153**, 1-14.
- Barta, A., Richards, R.L., Baxter, J.D., y Shine, J. (1981). Primary structure and evolution of rat growth hormone gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 4867-4871.
- Bartness, T., y Goldman, B. (1989). Mammalian pineal melatonin: a clock for all seasons. *Experientia* **45**, 939-945.
- Bartness, T.J., Powers, J.B., Hastings, M.H., Bittman, E.L., y Goldman, B.D. (1993). The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception and photoperiodic control of seasonal responses? *J. Pineal Res.* **15**, 161-190.
- Bartness, T.J., Demas, G.E., y Song, C.K. (2002). Seasonal changes in adiposity: the roles of the photoperiod, melatonin and other hormones, and sympathetic nervous system. *Exp. Biol. Med.* **227**, 363-376.
- Baumann, G., y Shaw, M.A. (1988). Immunochemical similarity of the human plasma growth hormone-binding protein and the rabbit liver growth hormone receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152**, 573-578.
- Bazan, J.F. (1989). A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 788-795.
- Bazan, J.F. (1990). Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 6934-6938.
- Beckman, B.R., y Dickhoff, W.W. (1998). Plasticity of smoltification in spring chinook salmon: relation to growth and insulin-like growth factor-I. *J. Fish Biol.* **53**, 808-826.
- Bell, J.G. (1998). Current aspects of lipid nutrition in fish farming. En: Biology of farmed fish. Eds.: Black, K.D., y Pickering, A.D.
- Ben-Jonathan, N., Mershon, J.L., Allen, D.L., y Steinmetz, R.W. (1996). Extrahypothalamic prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr. Rev.* **17**, 639-669.

- Ber, R., y Daniel, V. (1992). Structure and sequence of the growth hormone-encoding gene from *Tilapia nilotica*. *Gene* **113**, 245-250.
- Ber, R., y Daniel, V. (1993). Sequence analysis suggests a recent duplication of the growth hormone-encoding gene in *Tilapia nilotica*. *Gene* **125**, 143-150.
- Berthold, P. (1975). Migration: control and metabolic physiology. En: Avian Biology. Eds.: Farner, D.S., y King, J.R.
- Berwaer, M., Martial, J.A., y Davis, J.R. (1994). Characterization of an upstream promoter directing extrapituitary expression of the human prolactin gene. *Mol. Endocrinol.* **8**, 635-642.
- Blaise, O., Weil, C., y Le Bail, P.-Y. (1995). Role of IGF-I in the control of GH secretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Growth Regul.* **5**, 142-150.
- Blazer, V.S. (1992). Nutrition and disease resistance in fish. *Ann. Rev. Fish Dis.* **2**, 309-323.
- Blazer, V.S., y Volke, R.E. (1984). Effect of diet on the immune response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* **41**, 1244-1247.
- Blem, C.R. (1990). Avian energy storage. En: Current ornithology. Ed.: Power, D.M.
- Blokus, H. (1986). Aspects related to quality of farmed salmon (*Salmo salar*). En: Seafood quality determination. Eds.: Kramer, D.E., y Liston, J. Symposium International.
- Bly, J.E., Lawson, L.A., Szalai, A.J., y Clem, L.W. (1993). Environmental factors affecting outbreaks of winter saprolegniosis in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Fish Diseases* **16**, 541-549.
- Bly, J.E., y Clem, L.W. (1991). Temperature-mediated processes in teleost immunity: *In vitro* immunosuppression induced by *in vivo* low temperature in channel catfish. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **28**, 365-377.
- Bly, J.E., y Clem, L.W. (1992). Temperature and teleost immune functions. *Fish Shellfish Immunol.* **2**, 159-171.
- Boeuf, G., y Le Bail, P.-Y. (1999). Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture* **177**, 129-152.
- Boivin, T.G., y Power, G. (1990). Winter condition and proximate composition of anadromous Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) in eastern Ungava Bay, Quebec. *Can. J. Zool.* **68**, 2284-2289.
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., y Kelly, P.A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr. Rev.* **19**, 225-268.
- Bolton, J.P., Collie, N.L., Kawauchi, H., e Hirano, T. (1987). Osmoregulatory actions of growth hormone in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Endocrinology* **112**, 63-68.
- Bonnet, S., Fauconneau, B., David, K., Faure, A., y Laroche, M. (1996). Effect of fasting and stress on post mortem changes in brown trout reared in sea water. Refrigeration Science and Technology. Refrigeration and Aquaculture.

- Bornemann, A., y Schmalbruch, H. (1992). Desmin and vimentin in regenerating muscles. *Muscle Nerve* **15**, 14-20.
- Borski, R.J., Hansen, M.U., Nishioka, R.S., y Grau, E.G. (1992). Differential processing of the two prolactins of the tilapia, (*Oreochromis mossambicus*) in relation to environmental salinity. *J. Exp. Zool.* **264**, 46-54.
- Boujard, T., Jourdan, M., Kentouri, M., y Divanack, P. (1996). Diet feeding activity and the effect of time restricted self-feeding on growth and feed conversion in European sea bass. *Aquaculture* **139**, 117-127.
- Boutin, J.M., Jolicoeur, C., Okamura, H., Gagnon, J., Edery, M., Shiota, M., Banville, D., Dusanter-Fourt, I., Djiane, J., y Kelley, P.A. (1988). Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone /prolactin receptor gene family. *Cell* **53**, 69-77.
- Boutin, J.M., Edery, M., Shiota, M., Jolicoeur, C., Lessueur, L., Ali, S., Gould, D., Djiane, J., y Kelley, P.A. (1989). Identification of a cDNA encoding a long form of PRL receptor in human hepatoma and breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* **3**, 1455-1461.
- Bovo, G., Borghesan, F., Comuzzi, M., Ceschias, G., y Giorgetti, G. (1995). "Winter disease" in orata di allevamento: osservazioni preliminary. *Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica* **17**, 2-11.
- Braekken, O.R. (1959) A comparative study of vitamins in the trunk muscle of fishes. *Rep. Technol. Res. Norw. Fins. Ind.* **3**, 1-51.
- Breier, B.H. (1999). Regulation of protein and energy metabolism by the somatotropic axis. *Domest. Anim. Endocrinol.* **17**, 209-218.
- Brett, J.R. (1979). Environmental factors and growth. En: Fish physiology. Eds.: Hoar, W.S., Randall, D.J., y Brett J.R.
- Bromage, N., Porter, M., y Randall, C. (2001a). The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. En: Reproductive biotechnology in finfish aquaculture. Eds.: Lee, C.-S., y Donaldson, E.M.
- Bromage, N., Porter, M., y Randall, C. (2001b). The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* **197**, 63-98.
- Brooks, S., y Johnston, I.A. (1993). Influence of development and rearing temperature on the distribution, ultrastructure and myosin sub-unit composition of myotomal muscle-fibre types in the plaice *Pleuronectes platessa*. *Mar. Biol.* **117**, 501-513.
- Burrells, C., Williams, P.D., Southgate, P.J., y Crampton, V.O. (1999). Immunological, physiological and pathological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary concentrations of soybean proteins. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **72**, 277-288.
- Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **25**, 169-193.
- Butler, P.J., Woakes, A.J., y Bishop, C.M. (1998). The behaviour and physiology of Svalbard barnacle geese, *Branta leucopsis*, during their autumn migration. *J. Avian Biol.* **29**, 536-545.

-C-

- Cabanac, M., y Richard, D. (1996). The nature of the ponderostat: Hervey's hypothesis reviewed. *Appetite* **26**, 45-54.
- Calder, P.C. (1998). Dietary fatty acids and lymphocyte functions. *Proc. Nutr. Soc.* **57**, 487-502.
- Calduch-Giner, J.A., Sitjá-Bobadilla, A., Álvarez-Pellitero, P., y Pérez-Sánchez, J. (1995). Evidence for a direct action of GH on haemopoietic cells of a marine fish, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Endocrinol.* **146**, 459-467.
- Calduch-Giner, J.A., Sitjá-Bobadilla, A., Álvarez-Pellitero, P., y Pérez-Sánchez, J. (1997). Growth hormone as an *in vitro* phagocyte-activating factor in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) *Cell Tissue Res.* **287**, 535-540.
- Calduch-Giner, J.A., Pendón, C., Valdivia, M.M., y Pérez-Sánchez, J. (1998). Recombinant somatolactin as a stable and bioactive protein in a cell culture bioassay: development and validation of a sensitive and reproducible radioimmunoassay. *J. Endocrinol.* **156**, 441-447.
- Calduch-Giner, J.A., y Pérez-Sánchez, J. (1999). Expression of growth hormone gene in the head kidney of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Exp. Zool.* **283**, 326-330.
- Calduch-Giner, J.A., Duval, H., Chesnel, F., Boeuf, G., Pérez-Sánchez, J., y Boujard, D. (2001). Fish growth hormone receptor: molecular characterisation of two membrane-anchored forms. *Endocrinology* **142**, 3269-3273.
- Calduch-Giner, J.A., Mingarro, M.M., Vega-Rubín de Celis, S., Boujard, D., Pérez-Sánchez, J. (2003). Molecular cloning and characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone (GHR). Assessment of alternative splicing. *Comp. Biochem. Physiol. B* **136**, 1-13.
- Cambre, M.L., Verdonck, W., Ollevier, F., Vandesaende, F., Batten, T.F., y Kuhn E.R. (1986). Immunocytochemical identification and localization of the different cell types in the pituitary of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **61**, 368-375.
- Campfield, L.A., Smith, F.J., Guisez, Y., Devos, R., y Burn, P. (1995). Recombinant mouse *Ob* protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* **269**, 546-545.
- Cao, Q.P., Duguay, S.J., Plisetskaya, E., Steiner, D.F., y Chan, S.J. (1989). Nucleotide sequence and growth hormone-regulated expression of salmon insulin-like growth factor I mRNA. *Mol. Endocrinol.* **3**, 2005-2010.
- Casanueva-Freijo, F., Gualillo, O., y Diéguez-González, C. (2000). Leptina: una nueva hormona implicada en la homeostasis energética y la regulación del peso corporal. En: *Obesidad: la epidemia del siglo XXI*. Eds.: Moreno-Esteban, B., Moreno-Megías, S., y Álvarez Hernández, J.
- Castro, R., Couso, N., Obach, A. y Lamas, J. (1999). Effect of different β -glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead

- sea bream (*Sparus aurata*) phagocytes. *Fish Shellfish Immunol.* **9**, 529-541.
- Cavari, B., Noso, T., y Kawauchi, H. (1995). Somatolactin, a novel pituitary protein: isolation and characterization from *Sparus aurata*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **4**, 117-22.
- Chan, S.J., Cao, Q.P., y Steiner, D.F. (1990). Evolution of the insulin superfamily: cloning of a hybrid insulin/insulin-like growth factor cDNA from amphioxus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 9319-9323.
- Chatakondi, N.G., y Yant, R.D. (2001). Application of compensatory growth to enhance production in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J. World Aquaculture Society* **32**, 278-285.
- Cheek, D.B., y Hill, D.E. (1970). Muscle and liver cell growth: role of hormones and nutritional factors. *Fed. Proc.* **29**, 1503-1509.
- Chen, H.T., Chiou, C.S., y Chang, W.C. (1991). Cloning and characterization of the carp prolactin gene. *Biochem. Biophys Acta* **1088**, 315-318.
- Chen, T.T., Marsh, A., Shambloott, M., Chan, K.-M., Tang, Y.-L., Cheng, C.M., y Yang, B.-Y. (1994a). Structure and evolution of fish growth hormone and insulin-like growth factor genes. En: *Fish physiology*. Eds.: Sherwood, N.M., y Hew, C.L.
- Chen, T.T., Shambloott, M., Lin, C.M., Tang, Y.-L., Chan, K.-M., Cheng, C.M., Yang, B.-Y., y Marsh A. (1994b). Structure and evolution of fish growth and insulin-like growth factor genes. *Perspectives in Comparative Endocrinology* 352-364.
- Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L.A., Woolf, E.A., Weng, X., Ellis, S.J., Lakey, N.D., Culpepper, J., Moore, K.J., Breitbart, R.E., Duyk, G.M., Tepper, R.I., y Morgenstern, J.P. (1996). Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in *db/db* mice. *Cell* **84**, 491-495.
- Chen, J.Y., Tsai, H.L., Chang, C.Y., Wang, J.I., Shen, S.C., y Wu, J.L. (1998). Isolation and characterization of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) insulin-like growth factors gene and proximal promoter region. *DNA Cell Biol.* **17**, 359-376.
- Chen, M.H., Lin, G., Gong, H., Weng, C., Chang, C., y Wu, J. (2001). The characterization of pre-pro-insulin-like growth factor-1 Ea-2 expression and insulin-like growth factor-1 genes (devoid 81 bp) in the zebrafish (*Danio rerio*). *Gene* **268**, 67-75.
- Cheng, R.S., Chang, K.M., y Wu, J.L. (2002). Different temporal expressions of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) insulin-like growth factor-I and IGF binding protein-3 after growth hormone induction. *Mar. Biotechnol.* **4**, 218-225.
- Chicurel, M. (2000). Whatever happened to leptin? *Nature* **404**, 538-540.
- Chiou, C.S., Chen, H.T., y Chang, W.C. (1990). The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from the common carp (*Cyprinus carpio*). *Biochem. Biophys. Acta* **1087**, 91-94.
- Cho, C.Y. (1992). Feeding systems for rainbow trout and other salmonids with reference to current estimates of energy and protein requirements. *Aquaculture* **100**, 107-123.

- Chomczynski, P., y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Christiansen, R., Glette, J., Lie, O., Torrissen, O.J., y Waagbø, R. (1995). Antioxidant status and immunity in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed semi-purified diets with and without astaxanthin supplementation. *J. Fish Dis.* **18**, 317-328.
- Church, G.M., y Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 1991-1995.
- Clapp, C., y Weiner, R.I. (1992). A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology* **130**, 1380-1386.
- Clapp, C., Martial, J.A., Guzman, R.C., Rentier-Delrue, F., y Weiner, R.I. (1993). The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* **133**, 1292-1299.
- Clapp, C., Torner, L., Gutiérrez-Ospina, G., Alcántara, E., López-Gómez, F.J., Pagano, M., Kelly, P.A., Mejía, S., Morales, M.A., y Martínez de la Escalera, G. (1994). Prolactin gene is expressed in the hypothalamo-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14 kDa fragment with 16K prolactin-like activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 10384-1088.
- Clement, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gourmelin, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J.M., Basdevant, A., Bougneres, P., Lebouc, Y., Froguel, P., y Guy-Grand, B. (1998). A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* **392**, 398-401.
- Clevenger, C.V., y Kline, J.B. (2001). Prolactin receptor signal transduction. *Lupus* **10**, 706-718.
- Collet, C., Candy, J., Richardson, N., y Sara, V. (1997). Organization, sequence, and expression of the gene encoding IGFII from barramundi (Teleostei; *Lates calcarifer*). *Biochem. Genet.* **35**, 211-224.
- Collie, N.L., Bolton, J.P., Kawauchi, H., e Hirano T. (1989). Acute osmoregulatory actions of growth hormone promote seawater adaptation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Fish Physiol. Biochem.* **7**, 315-322.
- Comisión de las Comunidades Europeas (2002). Estrategia para el desarrollo sostenible de la acuicultura europea. Comunicación de la Comisión al Consejo y al Departamento Europeo. COM (2002) **511**.
- Company, R., Calduch-Giner, J.A., Kaushik, S.J., y Pérez-Sánchez, J. (1999a). Growth performance and adiposity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): Risks and benefits of high energy diets. *Aquaculture* **171**, 279-292.
- Company, R., Calduch-Giner, J.A., Pérez-Sánchez, J., y Kaushik, S.J. (1999b). Protein sparing effect of dietary lipids in common dentex (*Dentex dentex*): a comparative study with sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquat. Living Resour.* **12**, 23-30.

- Company, R., Caldach-Giner, J.A., Mingarro, M., y Pérez-Sánchez, J. (2000). cDNA cloning and sequence of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) somatolactin. *Comp. Biochem. Physiol. B* **127**, 183-192.
- Company, R., Astola, A., Pendón, C., Valdivia, M.M., y Pérez-Sánchez, J. (2001). Somatotropic regulation of fish growth and adiposity: growth hormone (GH) and somatolactin (SL) relationship. *Comp. Biochem. Physiol. C* **130**, 435-445.
- Considine, R.V., Sihna, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nice, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L., y Caro, J.F. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentration in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* **334**, 292-295.
- Contessi, B., Voltpatti, D., Gusmani, L., Bovo, G., Maltese, C., Mutinelli, F., Borghesan, F., Gennari, L., Sarli, G., y Galeotti, M. (2000). "Winter disease" in farmed gilthead sea bream (*S. aurata*): immunological aspects. *Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica* **12**, 2-16.
- Cooke, N.E., Ray, J., Watson, M.A., Estes, P.A., Kuo, B.A., y Liebhaer, S.A. (1988). Human growth hormone gene and the highly homologous growth hormone variant gene display different splicing patterns. *J. Clin. Invest.* **82**, 270-275.
- Coop, R.L., y Holmes, P.H. (1996). Nutrition and parasite interaction. *Int. J. Parasitol.* **26**, 951-962.
- Coop, R.L., y Kyriazakis, I. (1999). Nutrition-parasite interaction. *Vet. Parasitol.* **84**, 187-204.
- Cosman, D., Lyman, S.D., Idzerda, R.L., Beckmann, M.P., Park, L.S., Goodwin, R.G., y March, C.J. (1990). A new cytokine receptor superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 265-270.
- Cosman, D. (1993). The hematopoietin receptor superfamily. *Cytokine* **5**, 95-106.
- Costa, M.L., de Oliveira, M.M., Alberti Jr, O., Moura Neto, V., y Chagas, C. (1986). Characterization of desmin in the electric organ of *Electrophorus electricus* L. *C. R. Acad. Sci. III* **303**, 547-60.
- Cowey, C.B., y Sargent, J.R. (1979). Nutrition. En: Bioenergetics and growth. Fish physiology. Eds.: Hoar, W.S., Randall, D.J., y Brett, J.R.
- Cowey, C.B. (1994). Aminoacids requirements of fish: a critical appraisal of present values. *Aquaculture* **124**, 1-11.
- Crespo, S., Marín de Mateo, M., Santamaría, C.A., Sala, R., Grau, A., y Pastor, E. (2001). Histopathological observations during larval rearing of common dentex, *Dentex dentex* L. (Sparidae). *Aquaculture* **192**, 121-132.
- Cruz e Silva, M.P., Freitas, M.S., y Orge, M.L. (1997). Co-infection by monogenetic Trematodes of the genus Microcotyle, Beneden y Hese 1863, *Lamellodiscus ignoratus* Palombi, 1943, the protozoan *Trichodina* sp. Ehrenber, 1838 and the presence of Epitheliocystis, *Vibrio algynoliticus* and *V. vulnificus* in cultured sea bream (*Sparus aurata* L.) in Portugal. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **17**, 40-42.
- Cusin, I., Rohner-Jeanrenaud, F., Stricker-Krongrad, A., y Jeanrenaud, B. (1996). The weight-reducing effect of an intracerebroventricular bolus

injection of leptin in genetically obese *fafa* rats. Reduced sensitivity compared with lean animals. *Diabetes* **45**, 1446-1450.

-D-

- Dastot, F., Sobrier, M.-L., Duquesnoy, P., Duriez, B., Goosens, M., y Amselem, S. (1996). Alternatively spliced forms in the cytoplasmic domain of the human growth hormone (GH) receptor regulate its ability to generate a soluble GH-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 10723-10728.
- Daughaday, W.H., y Rotwein, P. (1989). Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr. Rev.* **10**, 68-91.
- Dawkins, M.J.R., y Hall, D. (1965). The production of heat by fat. *Sci. Am.* **213**, 62-67.
- De Pedro, N., Alonso-Gómez, A.L., Gancedo, B., Delgado, M.J., y Alonso-Bedate, M. (1993). Role of corticotropin-releasing factor (CRF) as a food intake regulator in goldfish. *Physiol. Behav.* **53**, 517-520.
- De Pedro, N., Alonso-Gómez, A.L., Gancedo, B., Valenciano, A.I., Delgado, M.J., y Alonso-Bedate, M. (1997). Effect of alpha-helical-CRF [9-41] on feeding in goldfish: involvement of cortisol and catecholemines. *Behav. Neurosci.* **111**, 398-403.
- Denbow, D.M., Meade, S., Robertson, A., McMurtry, J.P., Richards, M., y Ashwell, C. (2000). Leptin-induced decrease in food intake in chickens. *Physiol. Behav.* **69**, 359-362.
- Deplano, M., Connes, R., Díaz, J.P., y Paris, J. (1989). Intestinal steatosis in the farm-reared sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Dis. Aquat. Org.* **6**, 21-130.
- Devlin, R.H., Yesaki, T.Y., Biagi, C.A., Donaldson, E.M., Swanson, P., y Chan, W. (1994). Extraordinary salmon growth. *Nature* **371**, 209-210.
- Devlin, R.H., Swanson, P., Clarke, W.C., Plisetskaya, E., Dickhoff, W.W., Moriyama, S., Yesaki, T.Y., y Hew, C.-L. (2000). Seawater adaptability and hormone levels in growth-enhanced transgenic coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture* **191**, 367-385.
- Devlin, R.H., Biagi, C.A., Yesaki, T.Y., Smailus, D.E., y Byatt, J.C. (2001). Growth of domesticated transgenic fish. *Nature* **409**, 781-782.
- Dias, J., Álvarez, M.J., Diez, A., Arzel, J., Corraze, G., Bautista, J.M., y Kaushik, S.J. (1998). Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein/energy in juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* **161**, 169-186.
- Díaz, J.P., Guyot, E., Vigier, S., y Connes, R. (1997). First events in lipid absorption during post-embryonic development of anterior intestine in gilthead sea bream. *J. Fish Biol.* **51**, 180-192.
- Doneen, B.A., Bewley, T.A., y Li, C.H. (1979). Studies on prolactin. Selective reduction of the disulfide bonds of the ovine hormone. *Biochemistry* **18**, 4851-4860.
- Doyon, C., Drouin, G., Trudeau, V.L., y Moon, T.W. (2001). Molecular evolution of leptin. *Gen. Comp. Endocrinol.* **124**, 188-198.

- Dridi, S., Raver, N., Gussakovsky, E.E., Derouet, M., Picard, M., Gertler, A., y Taouis, M. (2000). Biological activities of recombinant chicken leptin C4S analog compared with unmodified leptins. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **279**, E116-E123.
- Du, S.J., Gong, Z.Y., Fletcher, G.L., Shears, M.A., King, M.J., Idler, D.R., y Hew, C.L. (1992). Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct. *Biotechnology* **10**, 176-181.
- Du, S.J., Devlin, R.H., y Hew, C.L. (1993). Genomic structure of growth hormone genes in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): presence of two functional genes, GH-I and GH-II, and a male-specific pseudogene, GH-psi. *DNA Cell Biol.* **12**, 739-751.
- Duan, C., y Duguay, S.J. (1994). Tissue-specific expression of insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acids in salmonids: developmental, hormonal, and nutritional regulation. *Perspectives in Comparative Endocrinology* 365-372.
- Duan, C. (1997). The insulin growth factor system and its biological actions in fish. *Am. Zool.* **37**, 491-503.
- Duan, C. (1998). Nutritional and developmental regulation of insulin-like growth factors in fish. *J. Nutr.* **128**, 306S-314S.
- Duan, C., Ding, J., Li, Q., Tsai, W., y Pozios, K. (1999). Insulin-like growth factor binding protein 2 is a growth inhibitory protein conserved in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 15274-15279.
- Duguay, S.J., Swanson, P., y Dickhoff, W.W. (1994). Differential expression and hormonal regulation of alternatively spliced IGF-I mRNA transcripts in salmon. *J. Mol. Endocrinol.* **12**, 25-37.
- Duguay, S.J., Chan, S.J., Mommsen, T.P., y Steiner, D.F. (1995). Divergence of insulin-like growth factors I and II in the elasmobranch, *Squalus acanthias*. *FEBS Lett.* **371**, 69-72.
- Duguay, S.J., Lai-Zhang, J., Steiner, D.F., Funkenstein, B., y Chan, S.J. (1996). Developmental and tissue-regulated expression of IGF-I and IGF-II mRNAs in *Sparus aurata*. *J. Mol. Endocrinol.* **16**, 123-132.
- Duncan, P.L., y Klesius, P.H. (1996). Dietary immunostimulants enhance nonspecific immune response in channel catfish but not resistance to *Edwardsiella ictaluri*. *J. Aquatic Animal Health* **8**, 241-248.
- Dunham, R.A., Eash, J., Askins, J., y Townes, T.M. (1987). Transfer of the metallothionein-human growth hormone fusion gene into channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.* **116**, 87-91.
- Dunn, I.C., Girishvarma, G., Talbot, R.T., Waddington, D., Boswell, T., y Sharp, P.J. (2002). Evidence for low homology between chicken and mammalian leptin genes. En: Avian endocrinology. Ed: Dawson, A.
- Dutil, J.-D. (1984). Energetic costs associated with the production of gonads in the anadromous Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) of the Nauyuk Lake basin, Canada. En: Biology of the Arctic charr. Eds.: Johnson, L., y Burns, B.L.
- Dutil, J.-D. (1986). Energetic constraints and spawning interval in the anadromous Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Copeia* 945-955.

-E-

- Echevarría, G., Martínez-Bebia, M., y Zamora, S. (1997). Evolution of biometric indices and plasma metabolites during prolonged starvation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Comp. Biochem. Physiol. A* **118**, 111-123.
- Edens, A., Southard, J.N., y Talamantes, F. (1994). Mouse growth hormone-binding protein and growth hormone receptor transcripts are produced from a single gene by alternative splicing. *Endocrinology* **135**, 2802-2805.
- Edens, A., y Talamantes, F. (1998). Alternative processing of growth hormone receptor transcripts. *Endocr. Rev.* **19**, 559-582.
- Ederly, M., Jolicoeur, C., Levi-Meyrueis, C., Dusanter-Fourt, I., Pétridou, B., Boutin, J.M., Lesueur, L., Kelley, P.A., y Djiane J. (1989). Identification and sequence analysis of a second form of prolactin receptor by molecular cloning of complementary DNA from rabbit mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 2112-2116.
- Edwards, C.K. 3rd, Arkins, S., Yunger, L.M., Blum, A., Dantzer, R., y Kelley, K.W. (1992). The macrophage-activating properties of growth hormone. *Cell Mol. Neurobiol.* **12**, 499-510.
- Edwards, Y.J., Elgar, G., Clark, M.S., y Bishop, M.J. (1998). The identification and characterization of microsatellites in the compact genome of the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*: perspectives in functional and comparative genomic analyses. *J. Mol. Biol.* **278**, 843-854.
- Einen, O., y Skrede, G. (1998). Quality characteristics in raw and smoked fillets of Atlantic salmon (*Salmo salar*), fed high-energy diets. *Aquacult. Nutr.* **4**, 99-108.
- Einen, O., Waagen, B., Thomassen, M.S. (1998). Starvation prior to slaughter in Atlantic salmon (*Salmo salar*): I. Effects on weight loss, body shape, slaughter and fillet-yield, proximate and fatty acid composition. *Aquaculture* **166**, 85-104.
- Ekström, P., y Meissl, H. (1997). The pineal organ of teleost fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* **7**, 199-284.
- Elies, G., Groigno, L., Wolff, J., Boeuf, G., y Boujard, D. (1996). Characterization of the insulin-like growth factor type 1 receptor messenger in two teleost species. *Mol. Cell Endocrinol.* **124**, 131-140.
- Elies, G., Duval, H., Bonnec, G., Wolff, J., Boeuf, G., y Boujard D. (1999). Insulin and insulin-like growth factor-1 receptors in an evolved fish, the turbot: cDNA cloning and mRNA expression. *Mol Cell Endocrinol.* **158**, 173-185.
- Ellis, A.E. (1990). Lysozyme assays. En: Techniques in fish immunology. Eds.: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., y Roberson, B.S.
- Ellsaesser, C.F., Bly, J.E., y Clem, L.W. (1988). Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the thymus in channel catfish. *Dev. Comparative Immunol.* **12**, 787-799.

- El-Mowafi, A.F.A., Waagbø, R., y Maage, A. (1997). Effect of low dietary magnesium on immune response and osmoregulation of Atlantic salmon. *J. Aquat. Anim. Health* **9**, 8-17.
- Emmart, E.W., y Mossakowski, M.J. (1967). The localization of prolactin in cultured cells of the rostral *pars distalis* of the pituitary of *Fundulus teroclitus* (Linnaeus). *Gen. Comp. Endocrinol.* **9**, 391-400.
- Erickson, K.L., y Hubbard, N.E. (1993). Dietary fat and immunology. En: Human nutrition. A comprehensive treatise. Vol. 8: Nutrition and Immunology. Ed: Klurfeld, D.M.

-F-

- Falcón, J., Thibault, C., Bégay, V., Zachmann, A., y Collin, J.P. (1992). Regulation of the rhythmic melatonin secretion by fish pineal photoreceptor cells. En: Rhythms in fishes. Ed: Ali, M.A.
- FAO (2000). El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA).
- FAO (2002). El estado mundial de la pesca y la acuicultura (SOFIA).
- Farbridge, K.J., y Leatherland, J.F. (1992). Temporal changes in plasma thyroid hormone, growth and free fatty acid concentration, and 5'-monodeiodinase activity, lipid and protein content during chronic fasting and refeeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* **10**, 245-257.
- Fauconneau, B., y Paboeuf, G. (2001). Muscle satellite cells in fish. En: Muscle development and growth. Ed: Johnston, I.A.
- Fernández, A.B.; Ruíz, I., y de Blas, I. (2002). El sistema inmune de los teleósteos (II): Respuesta inmune inespecífica. *AquaTIC* **17**.
- Fernández, C. (1999). Estado actual y perspectivas futuras del mercado de la dorada y lubina, España y Portugal. *Documentos Trouw España* **2**, 10.
- Figlewicz, D.P., Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Chavez, M., Baskin, D.G., Woods, S.C., y Porte, D.Jr. (1996). Endocrine regulation of food intake and body weight. *J. Lab. Clin. Med.* **127**, 328-332.
- Fine, M., Amuly, R., Sandowski, Y., Marchant, T.A., Chan, S.J., Gertler, A., y Funkenstein, B. (1997). Recombinant gilthead sea bream (*Sparus aurata*) insulin-like growth factor-I: subcloning, expression in *Escherichia coli*, purification and characterization. *J. Endocrinol.* **153**, 139-150.
- Folch, J., Lees, M., y Sloanstanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
- Fonds, M., Cronie, R., Vethaak, A.D., y Van der Puyl, P. (1992). Metabolism, food consumption and growth of plaice (*Pleuronectens platessa*) and flounder (*Platichthys flesus*) in relation to size and temperature. *Neth. J. Sea Res.* **34**, 111-118.
- Fox, H.E., White, S.A., Kao, M.H.F., y Fernald, R.D. (1997). Stress and dominance in a social fish. *J. Neurosci.* **17**, 6463-6469.
- Foyt, H.L., y Roberts Jr, C.T. (1991). The IGF-I gene: structure expression and gene products. En: Insulin-like growth factors: molecular and cellular aspects. Ed: Le Roith, D.

- Freeman, M.E., Kanyicska, B., Lerant, A., y Nagy, G. (2000). Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiol. Rev.* **80**, 1523-1631.
- Friedman, J.M. (1998). Leptin, leptin receptors and the control of body Weight. *Nutr. Rev.* **56**, S38-S46.
- Friedman-Einat, M., Boswell, T., Horev, G., Girishvarma, G., Dunn, I.C., Talbot, R.T., Sharp, P.J. (1999). The chicken leptin gene: has it been cloned? *Gen. Comp. Endocrinol.* **115**, 354-363.
- Frohman, L.A., y Jansson, J.O. (1986). Growth hormone-releasing hormone. *Endocr. Rev.* **3**, 223-253.
- Fruhbeck, G., Gómez-Ambrosi, J., Murunzábal, F.J., y Burrell, M.A. (2001). The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signalling in energy metabolism regulation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **280**, 827-847.
- Fuh, G., Mulkerrin, M.G., McFarland, N., Brochier, M., Bourell, J.H., Light, D.R., y Wells, J.A. (1990). The human growth hormone receptor. Secretion from *Escherichia coli* and disulfide bonding pattern of the extracellular binding domains. *J. Biol. Chem.* **265**, 3111-3115.
- Funkenstein, B., Tsai, W., Maures, T., y Duan, C. (2002). Ontogeny, tissue distribution, and hormonal regulation of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) in a marine fish, *Sparus aurata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **128**, 112-122.

-G-

- Gadomski, D.M., y Caddell, S.M. (1991). Effects of temperature on early-life-history stages of California halibut *Paralichthys californicus*. *Fish. Bull.* **89**, 567-576.
- Gallardo, M.A., Sala-Rabanal, M., Ibarz, A., Padrós, F., Blasco, J., Fernández-Borrás, J., y Sánchez J. (2003). Functional alterations associated with “winter syndrome” in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **223**, 15-27.
- Galleotti, M., Beraldo, P., Contessi, B., Manetti, M.F., y Votpatti, D. (1998). “Winter disease” in farmed gilthead sea bream: immunological aspects. *Biol. Mar. Mediterr.* **5**, 1600-1608.
- Galloway, T.F., Kjörsvik, E., y Kryvi, H. (1998). Effect of temperature on viability and axial muscle development in embryos and yolk sac larvae of the Northeast arctic cod (*Gadus morhua*). *Mar. Biol.* **132**, 559-567.
- Galloway, T.F., Kjörsvik, E. y Kryvi, H. (1999). Muscle growth and development in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua* L.) related to different somatic growth rates. *J. Exp. Biol.* **202**, 2111-2120.
- Gaylord, T.G., y Gatlin, D.M. (2001). Dietary protein and energy modifications to maximize compensatory growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* **194**, 337-348.
- Giustina, A., y Wehrenberg, W.B. (1992). The role of glucocorticoids in the regulation of growth hormone secretion: mechanism and clinical significance. *Trends in Endocrinology Metabolism* **3**, 306-311.
- Gjedrem, T. (1997). Flesh quality improvement in fish through breeding. *Aquacult. Int.* **5**, 197-206.

- Godowski, P.J., Leung, D.W., Meacham, L.R., Galgani, J.P., Hellmiss, R., Keret, R., Rotwein, P.S., Parks, J.S., Laron, Z., y Wood, W.I. (1989). Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron-type dwarfism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 8083-8087.
- Goffin, V., y Kelly, P.A. (1996). Prolactin and growth hormone receptors. *Clin. Endocrinol.* **45**, 247-255.
- Goffin, V., Sliverick, K.T., Kelly, P.A., y Martial, J.A. (1996). Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogens, and related proteins in mammals. *Endocr. Rev.* **4**, 385-410.
- Goffin, V., Binart, N., Touraine, P., y Kelly, P.A. (2002). Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 47-67.
- Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Kirchner, S., Calduch-Giner, J.A., Médale, F., Corraze, G., Panserat, S., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S.J., y Pérez-Sánchez, J. (2003). Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotropic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **220**, 749-767.
- Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Calduch-Giner, J.A., Médale, F., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S., y Pérez-Sánchez, J. (2004). Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, en prensa.
- González Serrano, J.L., Delgado, J.N., Torrent, F.B., Ortega, R.L., Mediavilla, M.G., Ortíz, A.L., Ramirez, A.D., Molina, A.G., y Claver, I.F. (1999). Conclusiones del borrador del libro blanco de la Acuicultura en España. *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación* **1**, 1-96.
- González-Hita, M., Bastidas-Ramírez, B.E., Ruíz-Madrigal, B., Godínez, S., y Panduro, A. (2002). Funciones endocrinas de la célula adiposa. *Revista de Endocrinología y Nutrición* **10**, 140-146.
- Gorshkov, S., Gordin, H., Goshkova, G., y Knibb, W. (1997). Reproductive constrains for family selection of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* **49**, 124-134.
- Gossett, L.A., Kelvin, D.J., Sternberg, E.A., y Olson, E.N. (1989). A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol. Cell Biol.* **9**, 5022-5033.
- Gottschlich, M.M., Mayes, T., Khoury, J.C., y Warden, G.D. (1993). Significance of nutritional, immunologic, hormonal, and clinical outcome parameters in burns. *J. Am. Diet. Assoc.* **93**, 1261-1268.
- Greene, M.W., y Chen, T.T. (1999). Characterization of teleost insulin receptor family members. II. Developmental expression of insulin-like growth factor type I receptor messenger RNAs in rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* **115**, 270-281.
- Greenlee, A.R., Dodson, M.W., Yablonka-Reuveni, Z., Wersten, C.A., y Cloud, J.G. (1995). *In vitro* differentiation of myoblasts from skeletal muscle of rainbow trout. *J. Fish Biol.* **46**, 731-747.

- Gregory, T.R., y Wood, C.M. (1999). The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming performance of juvenile rainbow trout. *Physiol. Biol. Zool.* **72**, 286-295.
- Guo, X.F., Nakaya, M., y Watabe, S. (1994). Myosin subfragment-1 isoforms having different heavy chain structures from fast skeletal muscle of thermally acclimated carp. *J. Biochem.* **116**, 728-735.
- Gutiérrez, J., Parrizas, M., Carneiro, N., Maestro, M., y Planas, J. (1993). Insulin and IGF-I receptors and tyrosine kinase activity in carp ovaries: changes with reproductive stage. *Fish Physiol. Biochem.* **11**, 247-254.
- Gutiérrez, J., Parrizas, M., Maestro, M.A., Navarro, I., y Plisetskaya, E.M. (1995). Insulin and IGF-I binding and tyrosine kinase activity in fish heart. *J. Endocrinol.* **146**, 35-44.

-H-

- Hall, T.R., Harvey, S., y Scanes, C.G. (1986). Control of growth hormone secretion in the vertebrates: a comparative survey. *Comp. Biochem. Physiol. A* **84**, 231-253.
- Hanel, R., Karjalainen, J., y Wieser, W. (1996). Growth of swimming muscle and its metabolic cost in larvae of whitefish at different temperatures. *J. Fish Biol.* **48**, 937-951.
- Hardie, L.J., Fletcher, T.C., y Secombes, C.J. (1990). The effect of vitamin E on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* **87**, 1-13.
- Harding, P.A., Wang, X.Z., Kelder, B., Souza, S., Okada, S., y Kopchick, J.J. (1994). *In vitro* mutagenesis of growth hormone receptor Asn-linked glycosylation sites. *Mol. Cell. Endocrinol.* **106**, 171-180.
- Harel, M., Tandler, A., Kissil, G.W., y Applebaum, S.W. (1994). The kinetics of nutrient incorporation into body tissues of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) females and the subsequent effects on egg composition and egg quality. *Br. J. Nutr.* **72**, 45-58.
- Harris, J., y Bird, D.J. (2000). Modulation of the fish immune system by hormones. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **77**, 163-176.
- Harris, R.B. (2000). Leptin--much more than a satiety signal. *Annu. Rev. Nutr.* **20**, 45-75.
- Harrison, W.M., Barnard, R., Ho, K.Y., Rajkovic, I., y Waters, M.J. (1995). Control of growth hormone (GH) binding protein release from human hepatoma cells expressing full-length GH receptor. *Endocrinology* **136**, 651-659.
- Harvey, S., y Daughaday, W.H. (1995). Growth hormone release: profiles. En: Growth hormone. Eds.: Harvey, S., Scanes, C.G., y Daughaday, W.H.
- Hashimoto, H., Mikawa, S., Takayama, E., Yokoyama, Y., Toyohara, H., y Sakaguchi, M. (1997). Molecular cloning and growth hormone-regulated gene expression of carp insulin-like growth factor-I. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **41**, 877-886.

- Havel, P.J. (2000). Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance. *Proc. Nutr. Soc.* **59**, 359-371.
- Hayward, R.S., Noltie, D.B., y Wang, N. (1997). Use of compensatory growth to double hybrid sunfish growth rates. *Trans. Am. Fish Soc.* **126**, 316-322.
- Helliwell, T.R. (1988). Lectin binding and desmin staining during bupivacaine-induced necrosis and regeneration in rat skeletal muscle. *J. Pathol.* **155**, 317-326.
- Herman, A., Bignon, C., Daniel, N., Grosclaude, J., Gertler, A., y Djiane, J. (2000). Functional heterodimerization of prolactin and growth hormone receptors by ovine placental lactogen. *J. Biol. Chem.* **275**, 6295-6301.
- Hermansson, M., Wickelgren, R.B., Hammarqvist, F., Bjarnason, R., Wennström, I., Wernerman, J., Carlsson, B., y Carlsson, L.M.S. (1997). Measurement of human growth hormone receptor messenger ribonucleic acid by a quantitative polymerase chain reaction-based assay: Demonstration of reduced expression after elective surgery. *J. Clin. Endoc. Metab.* **82**, 421-428.
- Herrero-Turrión, M.J., Rodríguez, R.E., Velasco, A., Aijon, J., y Lara, J.M. (2003). Differential expression and cellular localization of somatolactin-1 and -2 during early development in the gilthead sea bream. *Gen. Comp. Endocrinol.* **132**, 77-87.
- Herrington, J., y Carter-Su, C. (2001). Signalling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends in Endocrinol. Metab.* **12**, 252-257.
- Hervey, G.R. (1969). Regulation of energy balance. *Nature* **223**, 629-631.
- Higashimoto, Y., Nakao, N., Ohkubo, T., Tanaka, M., y Nakashima, K. (2001). Structure and tissue distribution of prolactin receptor mRNA in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): conserved and preferential expression in osmoregulatory organs. *Gen. Comp. Endocrinol.* **123**, 170-179.
- Hirayama, Y., y Watabe, S. (1997). Structural differences in the crossbridge head of temperature-associated myosin subfragment-1 isoforms from carp fast skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* **246**, 380-387.
- Hirt, H., Kimelman, J., Birnbaum, M.J., Chen, E.Y., Seeburg, P.H., Eberhardt, N.L., y Barta, A. (1987). The human growth hormone gene locus: structure, evolution, and allelic variations. *DNA*. **6**, 59-70.
- Ho, W.K., Wong, M.W., y Chan, A.P. (1991). Cloning and sequencing of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) growth hormone gene. *Biochem. Biophys. Acta* **1090**, 245-248.
- Hong, Y., y Scharl, M. (1993). Sequence of the growth hormone (GH) gene from the silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and evolution of GH genes in vertebrates. *Biochem. Biophys. Acta* **1174**, 285-288.
- Houdebine, L.M., y Chorrout, D. (1991). Transgenesis in fish. *Experientia* **47**, 891-897.
- Houseknecht, K.L., y Portocarrero, C.P. (1998). Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. *Domest. Anim. Endocrinol.* **15**, 457-475.

- Hu, Z., y Dufau, M.L. (1991). Multiple and differential regulation of ovarian prolactin receptor messenger RNAs and their expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 219-225.
- Hu, Z., Zhuang, L., y Dufau, M.L. (1996). Multiple and tissue-specific promoter control of gonadal and non-gonadal prolactin receptor gene expression. *J. Biol. Chem.* **271**, 10242-10246.
- Hu, Z., Zhuang, L., Guan, X., Meng, J., y Dufau, M.L. (1997). Steroidogenic factor-1 is an essential transcriptional activator for gonad-specific expression of promoter I of the rat prolactin receptor gene. *J. Biol. Chem.* **272**, 14263-14271.
- Hu, Z., Zhuang, L., Meng, J., y Dufau, M.L. (1998). Transcriptional regulation of the generic promoter III of the rat prolactin receptor gene by C/EBPbeta and Sp1. *J. Biol. Chem.* **273**, 26225-26235.
- Hu, Z., Zhuang, L., Meng, J., Leondires, M., y Dufau, M.L. (1999). The human prolactin receptor gene structure and alternative promoter utilization: the generic promoter hPIII and a novel human promoter hP(N). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 1153-1156.
- Hu, Z., Zhuang, L., Meng, J., Tsai-Morris, C.H., y Dufau, M.L. (2002). Complex 5' genomic structure of the human prolactin receptor: multiple alternative exons 1 and promoter utilization. *Endocrinology* **143**, 2139-2142.
- Huss, H.H. (1998). Pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. FAO. Documento Técnico de Pesca **348**.
- Hwa, V., Oh, Y., y Rosenfeld, R.G. (1999). The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr. Rev.* **20**, 761-787.

-I-

- Ihle, J.N. (1995). Cytokine receptor signalling. *Nature* **377**, 591-594.
- Imai, J., Hirayama, Y., Kikuchi, K., Kakinuma, M., y Watabe, S. (1997). cDNA cloning of myosin heavy chain isoforms from carp fast skeletal muscle and their gene expression associated with temperature acclimatation. *J. Exp. Biol.* **200**, 27-34.
- Imsland, A.K., y Jonassen, T.M. (2001). Regulation of growth in turbot (*Scophthalmus maximus*) Rafinesque and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.): aspects of environmental x genotype interactions. *Rev. Fish Biol. Fish.* **11**, 71-90.
- Ishikawa, Y. (1990). Development of muscle nerve in the teleost fish, medaka. *Neurosci. Res.* **13S**, 152-156.

-J-

- Jobling, M., Knudsen, R., Pedersen, P.S., y Dos Santos, J. (1991). Effects of dietary composition and energy content on the nutritional energetics of cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture* **92**, 243-257.
- Jobling, M. (1994). Fish Bioenergetics.
- Jobling, M., Meloy, O.H., Dos Santos, J., y Christiansen, B. (1994). The compensatory growth response of the Atlantic cod: effects of nutritional history. *Aquacult. Int.* **2**, 75-90.

- Jobling, M., y Koskela, J. (1996). Interindividual variations in feeding and growth in rainbow trout during restricted feeding and in a subsequent period of compensatory growth. *J. Fish Biol.* **49**, 658-667.
- Jobling, M. (1997). Temperature and growth: modulation of growth rate via temperature change. En: Global warming: implications for freshwater and marine fish. Eds.: Wood, C.M., y McDonald, D.G.
- Jobling, M., Johansen, S.J.S., Foshaug, H., Burkow, I.C., y Jørgensen, E.H. (1998) Lipid dynamic in anadromous Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.): seasonal variations in lipid storage depots and lipid class composition. *Fish Physiol. Biochem.* **18**, 225-240.
- Jobling, M., Koskela, J., y Winberg, S. (1999). Feeding and growth of whitefish fed restricted and abundant rations: influences on growth heterogeneity and brain serotonergic activity. *J. Fish Biol.* **54**, 437-449.
- Johansen, B., Johnsen, O.C., y Valla, S. (1989). The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Gene* **77**, 317-324.
- Johnson, R.M., Johnson, T.M., y Londraville, R.L. (2000). Evidence for leptin expression in fishes. *J. Exp. Zool.* **286**, 718-724.
- Johnston, I.A., Van Leeuwen, J.L., Davies, M.L.F., y Beddow, T. (1995). How fish power predation fast-starts. *J. Exp. Biol.* **198**, 1851-1861.
- Johnston, I.A. (1999). Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. *Aquaculture* **177**, 99-115.
- Jones, G.D.P., y Farrell, D.J. (1992a). Early life food restriction of broiler chickens. I. Methods of application, amino acid supplementation and the age at which restrictions should commence. *British Poultry Science* **33**, 579-587.
- Jones, G.D.P., y Farrell, D.J. (1992b). Early life food restriction of broiler chickens. II. Effects of food restrictions on the development of fat tissue. *British Poultry Science* **33**, 589-601.
- Jones, J.I., y Clemmons, D.R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* **16**, 3-34.
- Jørgensen, E.H., Johansen, S.J., y Jobling M. (1997) Seasonal patterns of growth, lipid deposition and lipid depletion in anadromous Arctic charr. *J. Fish Biol.* **51**, 312-326.

-K-

- Kaczmarek, R.S., y Mufti, G.J. (1991). The cytokine receptor superfamily. *Blood Rev.* **5**, 193-203.
- Kajimoto, Y., y Rotwein, P. (1990). Evolution of insulin-like growth factor I (IGF-I): structure and expression of an IGF-I precursor from *Xenopus laevis*. *Mol. Endocrinol.* **4**, 217-226.
- Kakizawa, S., Kaneko, T., Hasegawa, S., e Hirano, T. (1993). Activation of somatolactin cells in the pituitary of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by low environmental calcium. *Gen. Comp. Endocrinol.* **91**, 298-306.
- Kakizawa, S., Kaneko, T., Hasegawa, S., e Hirano, T. (1995a). Effects of feeding, fasting, background adaptation, acute stress, and exhaustive

- exercise on the plasma somatolactin concentrations in rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* **98**, 137-146.
- Kakizawa, S., Kaneko, T., Ogasawara, T., e Hirano, T. (1995b). Changes in plasma somatolactin levels during spawning migration of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Fish Physiol. Biochem.* **14**, 93-101.
- Kakizawa, S., Kaneko, T., e Hirano, T. (1996). Elevation of plasma somatolactin concentrations during acidosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* **199**, 1043-1051.
- Kaushik, S.J., y Cowey, C.B. (1991). Dietary factors affecting nitrogen excretion by fish. En: Nutritional strategies and aquaculture waste. Eds.: Cowey C.B., y Cho, C.Y.
- Kaushik, S.J. (1995). Protein and amino acid nutrition of fish in comparison to terrestrial vertebrates. En: Protein metabolism and nutrition. Eds.: Numes, A.F., Portugal, A.V., Costa, J.P., y Ribeiro, J.R.
- Kaushik, S.J. (1998). Nutritional bioenergetics and estimation of waste production in non-salmonids. *Aquat. Living Resour.* **11**, 211-217.
- Kawauchi, H., y Yasuda, A. (1988). The molecular evolution of prolactin and related hormones. En: Prolactin family and its receptors: molecular biology to clinical problems. Ed: Hoshino, K.
- Kawauchi, H., y Yasuda, A. (1989). Evolutionary aspects of growth hormone from nonmammalian species. En: Advances in growth hormones and growth factor research. Eds.: Muller y cols.
- Kawauchi, H., Suzuki, K., Yamazaki, T., Moriyama, S., Nozaki, M., Yamaguchi, K., Takahashi, A., Youson, J., y Sower, S.A. (2002). Identification of growth hormone in the sea lamprey, an extant representative of a group of the most ancient vertebrates. *Endocrinology* **143**, 4916-4921.
- Kay, R.N.B. (1985). Seasonal variation of appetite in ruminants. En: Recent advances in animal nutrition. Ed: Haresign, W.
- Kelley, K.M., Siharath, K., y Bern, H.A. (1992). Identification of insulin-like growth factor-binding proteins in the circulation of four teleosts fish species. *J. Exp. Zool.* **263**, 220-224.
- Kelley, K.M., Desai, P., Roth, J.T., Haigwood, J.T., Arope, S.A., Flores, R.M., Schmidt, K.E., Pérez, M., Nicholson, G.S., y Song, W.W. (2000). Evolution of endocrine growth regulation: the insulin like growth factors IGFs, their regulatory binding proteins IGFbps, and IGF receptors in fishes and other ectothermic vertebrates. En: Recent advances in marine biotechnology, Aquaculture, Part B Fishes, 4. Eds.: Fingerman, M., y Nagabhushanam, R.
- Kelley, K.M., Haigwood, J.T., Pérez, M., y Galima, M.M. (2001). Serum insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) as markers for anabolic/catabolic condition in fishes. *Comp. Biochem. Physiol. B* **129**, 229-236.
- Kelley, K.M., Schmidt, K.E., Berg, L., Sak, K., Galima, M.M., Gillespie, C., Balogh, L., Hawayek, A., Reyes, J.A., y Jamison, M. (2002). Comparative endocrinology of the insulin-like growth factor-binding protein. *Endocrinol.* **175**, 3-18.

- Kelley, P.A., Djiane, J., Postel-Vinay, M.C., y Edery, M. (1991). The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr. Rev.* **12**, 235-251.
- Kelly, P.A., Ali, S., Rosakis-Adcock, M., Goujon, L., Nagano, M., Pellegrini, I., Gould, D., Djiane, J., Edery, M., Finidori, J., y Postel-Vinay, M.C. (1993). The growth hormone/prolactin receptor family. *Recent Prog. Horm. Res.* **48**, 123-164.
- Kennedy, G.C. (1953). The role of depot fat in hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc. Royal Soc. B* **140**, 578-592.
- Kermouni, A., Mahmoud, S.S., Wang, S., Moloney, M., y Habibi, H.R. (1998). Cloning of a full-length insulin-like growth factor-I complementary DNA in the goldfish liver and ovary and development of a quantitative PCR method for its measurement. *Gen. Comp. Endocrinol.* **111**, 51-60.
- Kim, D.S. (1997). Expression of IGF-Ib cDNA clone isolated from *Paralichthys olivaceus* in mammalian CHO cell line using green fluorescence protein (GFP) tagging: secretory production of big IGF-Ib-GFP fusion proteins from stable transfected CHO cell culture. (sin publicar). N° Acceso GenBank CAA09267 y CAA09268.
- Kim, M.K., y Lovell, R.T. (1995). Effect of restricted feeding regimes on compensatory weight gain and body tissue changes in channel catfish *Ictalurus punctatus* in ponds. *Aquaculture* **135**, 285-293.
- King, J.R., y Farner, D.S. (1965). Studies of fat deposition in migratory birds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **131**, 422-440.
- Klasing, K.C. (1998). Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. *Poult. Sci.* **77**, 1119-1125.
- Klesius, P.H. (1990). Effect of size and temperature on the quality of immunoglobulin in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **24**, 187-195.
- Klesius, P.H., y Shoemaker, C.A. (1997). Heterologous isolates challenge of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, immune to *Edwardsiella ictaluri*. *Aquaculture* **57**, 147-155.
- Knibb, W., Gorshokova, G., y Gorshkov, S. (1997). Selection for growth in the gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* **49**, 57-66.
- Kobiyama, A., Nihei, Y., Hirayama, Y., Kikuchi, K., Suetake, H., Johnston, I., y Watabe, S. (1998). Molecular cloning and developmental expression patterns of the MyoD and MEF2 families of muscle transcription factors in the carp. *J. Exp. Biol.* **201**, 2801-2813.
- Kopchick, J.J., y Andry, J.M. (2000). Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Mol. Genet. Metab.* **71**, 293-314.
- Koumans, J.T.M., Akster, H.A., Dulos, G.J., y Osse, J.W.M. (1990). Myosatellite cells of *Cyprinus carpio* (Teleostei) *in vitro*: isolation, recognition, and differentiation. *Cell Tissue Res.* **261**, 173-181.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., y Nei, M. (2001). MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software.

-L-

- Lall, S.P. (1988). Disease through nutrition. Proceedings of Aquaculture International Congress and Exposition.
- Lamas, O., Marti, A., y Martínez, J.A. (2002). Obesity and immunocompetence. *Eur. J. Clin. Nutr.* **56**, S42-S45.
- Lambert, Y., y Denis-Dutil, J. (1997). Can simple condition indices be used to monitor and quantify seasonal changes in the energy reserves of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **54**, 104-112.
- Landolt, M.L. (1989). The relationship between diet and the immune response of fish. *Aquaculture* **79**, 193-205.
- Law, M.S., Cheng, K.W., Fung, T.K., Chan, Y.H., Yu, K.L., y Chan, K.M. (1996). Isolation and characterization of two distinct growth hormone cDNAs from the goldfish, *Carassius auratus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **330**, 19-23.
- Le Bail, P.-Y., Pérez-Sánchez, J., Yao, K., y Maisee, G. (1993). Effect of GH treatment on salmonid growth: Study of the variability of response. En: Aquaculture: Fundamental and Applied Research. Eds.: Lahlou, B., y Vitiello, P.
- Le Roith, D., Bondy, C., Yakar, S., Liu, J.L., y Butler, A. (2001a). The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr. Rev.* **22**, 53-74.
- Le Roith, D., Scavo, L., y Butler, A. (2001b). What is the role of circulating IGF-I? *Trends Endocrinol. Metab.* **12**, 48-52.
- Le Rouzic, P., Sandra, O., Grosclède, J., Rentier-Delrue, F., Jolois, O., Pakdel, F., Sandowski, Y., Cohen, Y., Gertler, A., y Prunet, P. (2001). Evidence of rainbow trout prolactin interaction with its receptor through unstable homodimerisation. *Mol. Cell. Endocrinol.* **172**, 105-113.
- Lee, L.T.O., Nong, G., Chan, Y.H., Tse, D.L.Y., y Cheng, C.H.K. (2001). Molecular cloning of a teleost growth hormone receptor and its functional interaction with human growth hormone. *Gene* **270**, 121-129.
- Leibush, B.N., Lappova, Y.L., Bondareva, V.M., Chistyacova, O.V., Gutiérrez, J., y Plisetskaya, E.M. (1996). Insulin-family peptide-receptor interaction at the early stage of vertebrate evolution. *Comp. Biochem. Physiol. B* **121**, 57-63.
- Lesueur, L., Edery, M., Ali, S., Paly, J., Kelly, P.A., y Djiane, J. (1991). Comparison of long and short forms of the prolactin receptor on prolactin-induced milk protein gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 824-828.
- Leung, D.W., Spencer, S.A., Chachianes, G., Hammonds, R.G., Collins, C., Henzel, W.J., Barnard, R., Waters, M.J., y Wood, W.I. (1987). Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning, and expression. *Nature* **330**, 537-543.
- Levin, B.E., y Routh, V.H. (1996). Role of the brain in energy balance and obesity. *Am. J. Physiol.* **271**, R491-R500.
- Lewin, B. (1994). Genes V.

- Lewis, U.J. (1992). Growth Hormone - What is it and what does it do? *Trends Endocrinol. Metab.* **3**, 117-121.
- Lewis, U.J., Bonewald, L.F., y Lewis, L.J. (1980). The 20,000 dalton variant of human growth hormone: location of the amino acids deletions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **92**, 511-516.
- Lewis, V.J., Singh, R.N.P., Tutwiller, G.P., Sigel, M.B., Vanderlaan, E.F., y Vanderlaan, W. (1980). Human growth hormone: a complex of proteins. *Rec. Prog. Horm. Res.* **36**, 477-509.
- Liang, Y.H., Cheng, C.H., y Chan, K.M. (1996). Insulin-like growth factor IEa2 is the predominantly expressed form of IGF in common carp (*Cyprinus carpio*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **5**, 145-152.
- Lie, Ø., y Huse, I. (1992). The effect of starvation on the composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fisk. Dir. Skr., Ser. Ernoering* **5**, 11-16.
- Lin, X., Volkoff, H., Narnaware, Y., Bernier, N.J., Peyon, P., y Peter, E. (2000). Brain regulation of feeding behaviour and food intake in fish. *Comp. Biochem. Physiol. A* **126**, 415-434.
- Lindberg, O. (1970). Brown adipose tissue.
- Lobie, P.E., Allevato, G., Nielsen, J.H., Norstedt, G., y Billestrup, N. (1995). Requirement of tyrosine residues 333 and 338 of the growth hormone (GH) receptor for selected GH-stimulated function. *J. Biol. Chem.* **270**, 21745-21750.
- Loffing-Cueni, D., Schmid, A.C., y Reinecke, M. (1999). Molecular cloning and tissue expression of the insulin-like growth factor II prohormone in the bony fish *Cottus scorpius*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **113**, 32-37.
- Loh, S.H., Chan, W.T., Gong, Z., Lim, T.M., y Chua, K.L. (2000). Characterization of a zebrafish (*Danio rerio*) desmin cDNA: an early molecular marker of myogenesis. *Differentiation* **65**, 247-254.
- Lohmus, M., Sundstrom, L.F., El Halawani, M., y Silverin, B. (2003). Leptin depresses food intake in great tits (*Parus major*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **131**, 57-61.
- Londrville, R.L., y Duvall, C.S. (2002). Murine leptin injections increase intracellular fatty acid-binding protein in green sunfish (*Lepomis cyanellus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **129**, 56-62.
- Louveau, I., y Bonneau, M. (2001). Biology and actions of somatotropin in the pig. En: Biotechnology and animal husbandry. Eds.: Renaville, R., y Burny, A.
- Love, R.M. (1980). The chemical biology of fishes. Vol.2 .
- Love, R.T. (1989). Nutrition and feeding in fish. Van Nostrand Reinhold.
- Lu, M., Swanson, P., y Renfro, J.L. (1995). Effect of somatolactin and related hormones on phosphate transport by flounder renal tubule primary cultures. *Am. J. Physiol.* **268**, R577-R582.
- Luheshi, G.N., Gardner, J.D., Rushforth, D.A., Loudon, A.S., y Rothwell, N.J. (1999). Leptin actions on food intake and body temperature are mediated by IL-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 7047-7052.
- Lyndon, A.R., y Toovey, J.P.G. (2000). Does the Aquasart™ feeding system reduce sea louse (*Lepeophtheirus salmonis* Krøyer) infestation on farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in winter? *Aquacult. Res.* **31**, 843-847.

-M-

- Maita, M., Aoki, H., Yamagata, Y., Satoh, S., Okamoto, N., y Watanabe, T. (1998). Plasma biochemistry and disease resistance in yellowtail fed a non-fish meal diet. *Fish Pathol.* **33**, 59-63.
- Manning, M.J. (1994). Fishes. En *Immunology: a comparative approach*. Ed: Turner, R.J.
- Mannor, D.A., Winer, L.M., Shaw, M.A., y Baumann, G. (1991). Plasma growth hormone (GH)-binding proteins: effect on GH binding to receptors and GH action. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **73**, 30-34.
- Manzon, L.A. (2002). The role of prolactin in fish osmoregulation: a review. *Gen. Comp. Endocrinol.* **125**, 291-310.
- Marais, P.G., Van der Merwe, H.J., y Dutoit, J.E.J. (1991). The effect of compensatory growth on food intake, growth rate, body composition and efficiency of feed utilisation in Dorper sheep. *South African J. Animal Sci.* **21**, 80-88.
- Marsh, R.L. (1984). Adaptations of the grey catbird to long distance migration: flight muscle hypertrophy associated with elevated body mass. *Physiol. Zool.* **57**, 105-117.
- Martínez, R., Estrada, M.P., Berlanga, J., Guillen, I., Hernández, O., Cabrera, E., Pimentel, R., Morales, R., Herrera, F., Morales, A., Pina J.C., Abada, Z., Sánchez, V., Melamed, P., Leonart, R., y de la Fuente, J. (1996). Growth enhancement in transgenic tilapia by ectopic expression of tilapia growth hormone. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **5**, 62-70.
- Martínez-Barberá, J.P., Pendón, C., Rodríguez, R.B., Pérez-Sánchez, J., y Valdivia, M.M. (1994). Cloning, expression, and characterization of a recombinant gilthead sea bream growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* **96**, 179-188.
- Martínez-Barberá, J.P., Pendón, C., Martí-Palanca, H., Calduch-Giner, J.A., Rodríguez, R.B., Valdivia, M.M., y Pérez-Sánchez, J. (1995). The use of the recombinant gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone for radioiodation and standard preparation in radioimmunoassay. *Comp. Biochem. Physiol. A* **110**, 335-340.
- Martini, J.F., Pezet, A., Guezennec, C.Y., Edery, M., Postel-Vinay, M.C., y Kelly, P.A. (1997). Monkey growth hormone (GH) receptor gene expression. Evidence for two mechanisms for the generation of the GH binding protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 18951-18958.
- Martí-Palanca, H., Martínez-Barberá, J.P., Pendón, C., Valdivia, M.M., Pérez-Sánchez, J., y Kaushik, S. (1996). Growth hormone as a function of age and dietary protein: energy ratio in a marine teleost, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Growth Regul.* **6**, 253-259.
- Mathisen, O.A., y Berg, M. (1968). Growth rates of the charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Institute of Freshwater Research* **48**, 177-186.
- Matschak, T.W., Stickleland, N.C., Mason, P.S., y Crook, A.R. (1997). Oxygen availability and temperature affect embryonic muscle development in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Differentiation* **61**, 229-235.

- Matschak, T.W., Hopcroft, T., Mason, P.S., Crook, A.R., y Stickland, N.C. (1998). Temperature and oxygen tension influence the development of muscle cellularity in embryonic rainbow trout. *J. Fish Biol.* **53**, 581-590.
- Matson, C.A., Wiater, M.F., y Weigle, D.S. (1996). Leptin and the regulation of body adiposity. *Diabetes Rev.* **4**, 488-508.
- Maures, T.J., y Duan, C. (2002). Structure, developmental expression, and physiological regulation of zebrafish IGF binding protein-1. *Endocrinology* **143**, 2722-2731.
- McCormick, S.D., Moriyama, S., y Björnsson, B.T. (2000). Low temperature limits photoperiod control of smolting in Atlantic salmon through endocrine mechanisms. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **278**, R1352-R1361.
- McRory, J.E., y Sherwood, N.M. (1994). Catfish express two forms of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in the brain. Ubiquitous IGF-I and brain-specific IGF-I. *J. Biol. Chem.* **269**, 18588-18592.
- McRory, J.E., y Sherwood, N.M. (1997). Ancient divergence of insulin and insulin-like growth factor. *DNA Cell Biol.* **16**, 939-949.
- Meissl, H. (1997). Regulation of pineal gland function by light. En: The photic system and the time measurement in vertebrates. Eds.: Falcon, J., y Gaillard, F.
- Melard, C., Baras, E., y Desprez, D. (1998). Compensatory growth of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. 4º Simposium internacional sobre la acuicultura de tilapia **1**, 178-185.
- Menon, R.K., Stephan, D.A., Singh, M., Morris Jr, S.M., y Zou, L. (1995). Cloning of the promoter-regulatory region of the murine growth hormone receptor gene. Identification of a developmentally regulated enhancer element. *J. Biol. Chem.* **270**, 8851-8859.
- Mercer, J.G., Moar, K.M., Ross, A.W., y Morgan, P.J. (2000). Regulation of leptin receptor, POMC and AGRP gene expression by photoperiod and food deprivation in the hypothalamic arcuate nucleus of the male Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Appetite* **34**, 109-111.
- Mercer, J.G., y Speakman, J.R. (2001). Hypothalamic neuropeptide mechanisms for regulating energy balance: from rodent models to human obesity. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **25**, 101-116.
- Metcalfe, N.B., y Thorpe, J.E. (1992). Anorexia and defended energy levels in over-wintering juvenile salmon. *J. Animal Ecol.* **61**, 175-181.
- Miglavs, I., y Jobling, M. (1989) Effects of feeding regime on food consumption, growth rates and tissue nucleic acids in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, with particular reference to compensatory growth. *J. Fish Biol.* **34**, 947-957.
- Miller, W.L., y Eberhardt, N.L. (1983). Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocr. Rev.* **4**, 97-130.
- Millikin, M.R. (1982). Qualitative and quantitative nutrient requirements of fishes: a review. *Fish. Bull.* **80**, 655-686.
- Mingarro, M.M., Vega-Rubín de Celis, S., Astola, A., Pendón, C., Martínez-Valdivia, M., y Pérez-Sánchez, J. (2002). Endocrine mediators of seasonal growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): the growth

- hormona an somatolactin paradigm. *Gen. Comp. Endocrinol.* **128**, 102-111.
- Mitra, I. (1980). A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary. Part 1. Biosynthesis, characterization and regulatory control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**, 1750-1759.
- Mobin, S.M.A., Kanai, K., y Yoshikoshi, K. (2001). Effects on feeding levels on the pathological alterations in the digestive system and mortality of larvae and juveniles of *Pagrus major*. *J. Aqua. Anim. Health* **13**, 202-213.
- Moldrup, A., Ormandy, C., Nagano, M., Murthy, K., Banville, D., Tronche, F., y Kelly, P.A. (1996). Differential promoter usage in prolactin receptor gene expression: hepatocyte nuclear factor 4 binds to and activates the promoter preferentially active in the liver. *Mol. Endocrinol.* **10**, 661-671.
- Molina-Borja, M., Falcón, J., Urquiola, E., y Ravault, J.P. (1996). Production of melatonin by the gilthead sea bream pineal: an *in vivo* and *in vitro* study. *Fish Physiol. Biochem.* **15**, 413-419.
- Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A., Cheetham, C.H., Earley, A.R., Barnett, A.H., Prins, J.B., y O'Rahilly, S. (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* **387**, 903-908.
- Montero, D., Tort, L., Izquierdo, M.S., Robaina, L., y Vergara, J.M. (1998). Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead sea bream caused by alpha-tocopherol and n-3 HUFA dietary deficiencies. *Fish Physiol. Biochem.* **18**, 399-407.
- Montero, D., Izquierdo, M.S., Tort, L., Robaina, L., y Vergara, J.M. (1999a). High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead sea bream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiol. Biochem.* **20**, 53-60.
- Montero, D., Marrero, M., Izquierdo, M.S., Vergara, J.M., y Tort, L. (1999b). Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture* **171**, 269-278.
- Montero, D., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J.M., e Izquierdo, M.S. (2001). Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish Shellfish Immunol.* **11**, 473-490.
- Mommsen, T., y Moon, T. (2001). Hormonal regulation of muscle growth. En: Muscle development and growth. Ed.: Johnston, I.A.
- Moreno, M.J., y Martínez, J.A. (2002). El tejido adiposo: órgano de almacenamiento y órgano secretor. *ANALES Sis. San. Navarra* **25**, S29-S39.
- Mori, T. y Devlin, R.H. (1999). Transgene and host growth hormone gene expression in pituitary and nonpituitary tissues of normal and growth hormone transgenic salmon. *Mol. Cell Endocrinol.* **149**, 129-139.
- Moriyama, S., Dickhoff, W.W., y Plisetskaya, E.M. (1995). Isolation and characterization of insulin-like growth factor-I from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **99**, 221-229.

- Moutoussamy, S., Kelly, P.A., y Finidori, J. (1998). Growth-hormone-receptor and cytokine-receptor-family signalling. *Eur. J. Biochem.* **255**, 1-11.
- Mrosovsky, N., y Faust, I.M. (1985). Cycles of body fat in hibernators. *Int. J. Obes.* **9**, S93-S98.
- Mulero, V., y Meseguer, J. (1998). *In vitro* levamisole fails to increase sea bream (*Sparus aurata* L.) phagocyte functions. *Fish Shellfish Immunol.* **8**, 315-318.
- Muñoz, P., Caldach-Giner, J.A., Sitjà-Bobadilla, A., Álvarez-Pellitero, P., y Pérez-Sánchez, J. (1998). Modulation of the respiratory burst activity of Mediterranean sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) phagocytes by growth hormone and parasitic status. *Fish Shellfish Immunol.* **8**, 25-36.
- Muñoz, P., Sitjà-Bobadilla, A., y Álvarez-Pellitero, P. (2000). Cellular and humoral immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) (Teleostei: Serranidae) immunised with *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporae: Bivalvulida). *Parasitology* **120**, 465-477.
- Murphy, L.J. (1998). Insulin-like growth factor-binding proteins: functional diversity or redundancy? *J. Mol. Endocrinol.* **21**, 97-107.
- Muruzabal, F.J., Fruhbeck, G., Gómez-Ambrosi, J., Archanco, M., y Burrell, M.A. (2002). Immunocytochemical detection of leptin in non-mammalian vertebrate stomach. *Gen. Comp. Endocrinol.* **128**, 149-152.

-N-

- Nagamatsu, S., Chan, S.J., Falkmer, S., y Steiner, D.F. (1991). Evolution of the insulin gene superfamily. Sequence of a preproinsulin-like growth factor cDNA from the Atlantic hagfish. *J. Biol. Chem.* **266**, 2397-2402.
- Nakamura, M., y Sugamura, K. (1992). Structural similarity and signal transduction of cytokine receptors *Nippon Rinsho* **50**, 1756-1762.
- Nakao, N., Tanaka, M., Higashimoto, Y., y Nakashima, K. (2002). Molecular cloning, identification and characterization of four distinct receptor subtypes for insulin and IGF-I in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J. Endocrinol.* **173**, 365-375.
- Nam, Y.K., Noh, J.K., Cho, Y.S., Cho, H.J., Cho, K.N., Kim, C.G., y Kim, D.S. (2001). Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach *Misgurnus mizolepis*. *Transgenic Res.* **10**, 353-362.
- Narnaware, Y.K., Kelly, S.P. y Woo, N.Y.S. (1997). Effect of injected growth hormone on phagocytosis in silver sea bream (*Sparus sarba*) adapted to hyper- and hypo-osmotic salinities. *Fish and Shellfish Immunol.* **7**, 515-517.
- Narnaware, Y.K., Kelly, S.P. y Woo, N.Y.S. (1998). Stimulation of macrophage phagocytosis and lymphocyte count by exogenous prolactin administration in silver sea bream (*Sparus sarba*) adapted to hyper- and hypo-osmotic salinities. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **61**, 387-391.
- National Research Council (1977). Nutrient requirements of warmwater fishes. *National Academy of Sciences*.

- Niall, H.D., Hogan, M.L., Sauer, R., Rosenblum, I.Y., y Greenwood, F.C. (1971). Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **68**, 866-870.
- Nicieza, A.G., y Metcalfe, N.B. (1997). Growth compensation in juvenile Atlantic salmon: responses to depressed temperature and food availability. *Ecology* **78**, 2385-2400.
- Nicoll, C.S., Mayer, G.L., y Russell, S.M. (1986). Structural features of prolactins and growth hormones that can be related to their biological properties. *Endocr. Rev.* **7**, 169-203.
- Nicoll, C.S., Rodgers, B.D., y Kelley, K.M. (1998). Hormonal regulation of growth and development of nonmammalian vertebrates. En: Handbook of Physiology. Section 7: Endocrinology. Ed: Kostyo, J.L.
- Nielsen, C., Holdensgaard, H., Petersen, H.C., Björnsson, B.T.H., y Madsen, S.S. (2001). Genetic Differences in physiology, growth hormone levels and migratory behaviour of Atlantic salmon smolts. *J. Fish Biol.* **59**, 28-44.
- Nieman, D.C., Henson, D.A., Nehlsen-Cannarella, S.L., Ekkens, M., Utter, A.C., Butterworth, D.E., y Fagoaga, O.R. (1999). Influence of obesity on immune function. *J. Am. Diet. Assoc.* **99**, 294-299.
- Niewiarowski, P.H., Balk, M.L., y Londraville, R.L. (2000). Phenotypic effects of leptin in an ectotherm: a new tool to study the evolution of life histories and endothermy? *Exp. Biol.* **203**, 295-300.
- Nordgarden, U., Hemre, G.-I., y Hansen, T. (2002). Growth and body composition of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr and smolt fed diets varying in protein and lipid contents. *Aquaculture* **207**, 65-78.
- Noso, T., Nicoll, C.S., Polenov, A.L., y Kawauchi, H. (1993a). The primary structure of sturgeon prolactin: phylogenetic implication. *Gen. Comp. Endocrinol.* **91**, 90-95.
- Noso, T., Nicoll, C.S., y Kawauchi, H. (1993b). Lungfish prolactin exhibits close tetrapod relationships. *Biochim. Biophys. Acta* **1164**, 159-165.

-O-

- Ohkubo, T., Araki, M., Tanaka, M., Sudo, S., y Nakashima, K. (1996). Molecular cloning and characterization of the yellowtail GH gene and its promoter: a consensus sequence for teleost and avian Pit-1/GHF-1 binding sites. *J. Mol. Endocrinol.* **16**, 63-72.
- Okwoche, V.O., y Lovell, R.T. (1997). Cool weather feeding influences responses of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *J. Aquatic Animal Health* **9**, 163-171.
- Oldham, E.R., Bingham, B., y Baumbach, W.R. (1993). A functional polyadenylation signal is embedded in the coding region of chicken growth hormone receptor RNA. *Mol. Endocrinol.* **7**, 1379-1390.
- Olivereau, M., y Rand-Weaver, M. (1994). Immunocytochemical study of the somatolactin cells in the pituitary of pacific salmon, *Oncorhynchus nerka*, and *O. keta* at some stages of the reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* **93**, 28-35.

- Olsen, R.E., Myklebust, R., Ringø, E., y Mayhew, T.M. (2000). The influences of dietary liseed oil and saturated fatty acids on caecal enterocytes in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.): a quantitative ultrastructural study. *Fish Physiol. Biochem.* **22**, 207-216.
- Olson, E.N. (1992). Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage. *Dev. Biol.* **154**, 261-272.
- Ortega, E., Forner, M.A., y Barriga, C. (1996). Effect of prolactin on the *in vitro* phagocytic capacity of macrophages. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **19**, 139-146.
- Ortuño, J., Esteban, M.A., y Meseguer, J. (1999). Effect of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune response of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* **9**, 429-443.
- Ortuño, J., Esteban, M.A., y Meseguer, J. (2000). High dietary intake of alpha-tocopherol acetate enhances the non-specific immune response of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* **10**, 293-307.
- Ortuño, J., Cuesta, A., Esteban, M.A., y Meseguer, J. (2001). Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **79**, 167-180.
- Ortuño, J., Cuesta, A., Rodríguez, A., Esteban, M.A., y Meseguer, J. (2002). Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Vet. Immunol. Immunopathol.* **85**, 41-50.

-P-

- Padrós, F., Minkoff, G., Sala, R., y Crespo, S. (1993). Histopathological events throughout the development of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *J. Comp. Pathol.* **109**, 321-334.
- Padrós, F., y Crespo, S. (1995). Proliferative Epitheliocystis associated with monogenean infection in juvenile sea bream *Sparus aurata* in the North East of Spain. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* **15**, 42-44.
- Padrós, F., Crespo, S., Sala, S., Sánchez, J., Blasco, J., Fernández, J., Rotllant, J., y Tort L. (1998). Winter syndrome in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Structural and functional alterations and the influence of stress. Congreso internacional sobre la biología de los peces.
- Page, G.I., Hayworth, K.M., Wade, R.R., Harris, A.M., y Bureau, D.P. (1999). Non-specific immunity parameters and the formation of advanced glycosylation end-products (AGE) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fed high levels of dietary carbohydrates. *Aquacult. Res.* **30**, 287-297.
- Palenzuela, O., Sitjà-Bobadilla, A., y Álvarez-Pellitero, P. (1997). *Ceratomyxa sparusaurati* (Protozoa: Myxosporea) infections in cultured gilthead sea bream *Sparus aurata* (Pisces: Teleostei) from Spain: aspects of the host parasite relationship. *Parasitol. Res.* **83**, 539-548.
- Palou, A., y Pico, C. (1998a). Los genes de la obesidad. *Formación continuada en nutrición y obesidad* **1**, 280-289.

- Palou, A., y Pico, C. (1998b). Obesidad y alimentación: nuevos genes de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos en el SNC. *Nutrición Clínica* **18**, 21-31.
- Pandian, T.J., y Vivekanandan, E. (1985). Energetics of feeding and digestion. En: *Fish energetics: New Perspectives*. Eds.: Tyler, P., y Calow, P.
- Parks, J.S., Herd, J.E., Wurzel, J.M., y Martial, J.A. (1982). Structural analysis of rodent growth hormone genes: application to genetic forms of hypopituitarism. *Endocrinology* **110**, 1672-1675.
- Parrizas, M., Plisetskaya, E.M., Planas, J., y Gutiérrez, J. (1995). Abundant insulin-like growth factor (IGF-I) receptor binding in fish skeletal muscle. *Gen. Comp. Endocrinol.* **98**, 16-25.
- Passer, B.J., Chen, C.H., Miller, N.W., y Cooper, M.D. (1996). Identification of a T lineage antigen in the catfish. *Dev. Comp. Immunol.* **20**, 441-450.
- Pedersen, T., y Jobling, M. (1989). Growth rates of large, sexually mature cod, *Gadus morhua*, in relation to condition and temperature during an annual cycle. *Aquaculture* **81**, 161-168.
- Pendón, C., Martínez-Barberá, J.P., Pérez-Sánchez, J., Rodríguez, R.B., Grenett, H., y Valdivia, M.M. (1994). Cloning of the sole (*Solea senegalensis*) growth hormone-encoding cDNA. *Gene* **145**, 237-240.
- Pendón, C., Martínez-Barberá, J.P., Ortíz, M., y Valdivia, M.M. (1996). Bacterial production and purification of the fish pituitary hormone somatotactin. *Protein Expr. Purif.* **7**, 389-394.
- Pérez-Sánchez, J., Smal, J., y Le Bail, P.-Y. (1991). Location and characterization of growth hormone binding sites in the central nervous system of a teleost fish (*Oncorhynchus mykiss*). *Growth Regulation* **1**, 145-152.
- Pérez-Sánchez, J., Weil, C., y Le Bail, P.-Y. (1992). Effects of a human insulin-like growth factor-I on the release of growth hormone by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pituitary cells. *J. Exp. Zool.* **262**, 287-290.
- Pérez-Sánchez, J., Martí-Palanca, H., y Le Bail, P.-Y. (1994a). Homologous growth hormone (GH) binding in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Effect of fasting and refeeding on hepatic GH-binding and plasma somatomedin-like immunoreactivity. *J. Fish Biol.* **44**, 287-301.
- Pérez-Sánchez, J., Martí-Palanca, H., y Le Bail, P.-Y. (1994b). Seasonal changes in circulating growth hormone (GH), hepatic GH-binding and plasma insulin-like growth factor-I immunoreactivity in a marine fish, gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Fish Physiol. Biochem.* **13**, 199-208.
- Pérez-Sánchez, J., y Le Bail, P.-Y. (1999). Growth hormone axis as marker of nutritional status and growth performance in fish. *Aquaculture* **117**, 117-128.
- Pérez-Sánchez, J. (2000). The involvement of growth hormone in growth regulation, energy homeostasis and immune function in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*): a short review. *Fish Physiol. Biochem.* **22**, 135-144.

- Pérez-Sánchez, J., Costell, E., Mingarro, M., Carbonell, I., Vega-Rubín de Celis, S., Calduch-Giner, J.A., Orlando, M.L., Rielo, J.A., Pujalte, M.J., Garay, E., Sitjá-Bobadilla, A., Álvarez-Pellitero, P., Izquierdo, L., y Durán, L. (2002). Estrategias de alimentación y cultivo de la dorada. Estado patológico y control de la calidad sensorial. Eds.: Pérez-Sánchez, J., y Costell, E.
- Pérez-Sánchez, J., Calduch-Giner, J.A., Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, V., Gómez-Requeni, P., Saera-Vila, A., Astola, A., y Valdivia, M.M. (2004). Overview of fish growth hormone family. New insights in genomic organization and heterogeneity of growth hormone receptors. *Fish Physiol. Biochem.*, en prensa.
- Perrot, V., Moiseeva, E., Gozes, Y., Chan, S.J., y Funkenstein, B. (2000). Insulin-like growth factor receptors and their ligands in gonads of a hermaphroditic species, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*): expression and cellular localization. *Biol Reprod.* **63**, 229-234.
- Petridis, D., y Rogdakis, I. (1996). The development of growth and feeding equations for sea bream, *Sparus aurata* L., culture. *Aquaculture Research* **27**, 413-419.
- Peyon, P., Zanuy, S., y Carrillo, M. (2001). Action of leptin on *in vitro* luteinizing hormone release in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biol Reprod.* **65**, 1573-1578.
- Peyon, P., Vega-Rubín de Celis, S., Gómez-Requeni, P., Zanuy, S., Pérez-Sánchez, J., y Carrillo, M. (2003). *In vitro* effect of leptin on somatolactin release in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): dependence on the reproductive status and interaction with NPY and GnRH. *Gen. Comp. Endocrinol.* **132**, 284-292.
- Pickering, A.D., Pottinger, T.G., Sumpter, J.P., Carragher, J.F., y Le Bail, P.-Y. (1991). Effects of acute and chronic stress on the levels of circulating growth hormone in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **83**, 86-93.
- Pierce, A.L., Beckman, B.R., Shearer, K.D., Larsen, D.A., y Dickhoff, W.W. (2001). Effects of ration on somatotrophic hormones and growth in coho salmon. *Comp. Biochem. Physiol. B* **128**, 255-264.
- Pinillos, M.L., De Pedro, N., Alonso-Gómez, A.L., Alonso-Bedate, M., y Delgado, M.J. (2001). Food intake inhibition by melatonin in goldfish (*Carassius auratus*). *Physiol. Behav.* **72**, 629-634.
- Pirhonen, J., y Forsman, L. (1999). Can smolting and maturation of hatchery-reared brown trout *Salmo trutta* L. be affected by food deprivation during the first and second years of rearing? *Aquac. Res.* **30**, 611-620.
- Pitel, F., Monbrun, C., Gellin, J., y Vignal, A. (2000). The chicken LEP (OB) gene has not been mapped. *Anim. Genet.* **31**, 281.
- Pitkanen, T.I., Krasnov, A., Teerijoki, H., y Molsa, H. (1999). Transfer or growth hormone (GH) transgenes into Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.).I. Growth response to various GH constructs. *Genet. Anal.* **15**, 91-98.
- Planas, J.V., Swanson, P., Rand-Weaver, M., y Dickhoff, W.W.(1992). Somatolactin stimulates *in vitro* gonadal steroidogenesis in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **87**, 1-5.

- Plavnik, I., y Hurwitz, S. (1985). The performance of broiler chicks during and following a severe food restriction at an early age. *Poultry Science* **64**, 348-355.
- Pond, C.M. (1992). An evolutionary, and functional view of mammalian adipose tissue. *Proc. Nutr. Soc.* **51**, 367-377.
- Porter, P.J., Kramer, D.E., y Kennish, J.M. (1992). Lipid composition of sockeye salmon: a comparison of light and dark flesh. *J. Food Sci. Technol.* **27**, 365.
- Pottinger, T.G., y Pickering, A.D. (1992). The influence of social interaction on the acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to chronic stress. *J. Fish Biol.* **41**, 435-447.
- Prunet, P., Sandra, O., Le Rouzic, P., Marchand, O., y Laudet, V. (2000). Molecular characterization of the prolactin receptor in two fish species, tilapia *Oreochromis niloticus* and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: a comparative approach. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **78**, 1086-1096.
- Pujalte, M.J., Sitjá-Bobadilla, A., Álvarez-Pellitero, P., y Garay, E. (2003). Carriage of potentially fish-pathogenic bacteria in *Sparus aurata* cultured in Mediterranean fish farms. *Dis. Aquat. Organ.* **54**, 119-126.

-Q-

- Quinn, L.S., Norwood, T.H., y Nameroff, M. (1988). Myogenic stem cells commitment probability remains constant as a function of organismal and mitogenic age. *J. Cell Physiol.* **134**, 324-336.
- Quinton, J.C., y Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Fish Biol.* **37**, 33-41.

-R-

- Rahman, M.A., Mak, R., Ayad, H., Smith, A., y McLean, N. (1998). Expression of a novel piscine gene results in growth enhancement in transgenic tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Transgen. Res.* **7**, 357-369.
- Ramenofsky, M (1990). Fat storage and fat metabolism in relation to migration. En: Bird migration. Physiology and ecophysiology. Ed: Gwinner, E.
- Rand-Weaver, M., Noso, T., Muramoto, K., y Kawauchi, H. (1991). Isolation and characterization of somatolactin, a new protein related to growth hormone and prolactin from Atlantic cod (*Gadus morhua*) pituitary glands. *Biochemistry* **30**, 1509-1515.
- Rand-Weaver, M., Swanson, P., Kawauchi, H., y Dickhov, W.W. (1992). Somatolactin, a novel pituitary protein: purification and plasma levels during reproductive maturation of coho salmon. *J. Endocrinol.* **133**, 393-403.
- Rand-Weaver, M., y Swanson, P. (1993). Plasma somatolactin levels in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during smoltification and sexual maturation. *Fish Physiol. Biochem.* **11**, 175-182.
- Rand-Weaver, M., Pottinger, T.G., y Sumpter, J.P. (1993). Plasma somatolactin concentrations in salmonid fish are elevated by stress. *J. Endocrinol.* **138**, 509-515.

- Rand-Weaver, M., Kawauchi, H., y Ono, M. (1993). Evolution of the structure of the growth hormone and prolactin family. En: The endocrinology of growth, development, and metabolism in vertebrates. Eds.: Schreibman, M.P., Scanes, C.G., y Pang, P.K.T.
- Rand-Weaver, M., Pottinger, T.G., y Sumpter, J.P (1995). Pronounced seasonal rhythms in plasma somatotactin levels in rainbow trout. *J. Endocrinol.* **146**, 113-119.
- Ravussin, E., Pratley, R.E., Maffei, M., Wang, H., Friedman, J.M., Bennett, P.H., y Bogardus, C. (1997). Relatively low plasma leptin concentrations precede weight gain in Pima Indians. *Nat Med.* **3**, 238-240.
- Raymond, N.C., Dysken, M., Bettin, K., Eckert, E.D., Crow, S.J., Markus, K., y Pomeroy, C. (2000). Cytokine production in patients with anorexia nervosa, bulimia nervosa, and obesity. *Int. J. Eat. Disord.* **28**, 293-302.
- Reidy, S.P., y Weber, J. (2000). Leptin: an essential regulator of lipid metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. A* **125**, 285-298.
- Reinecke, M., Schmid, A., Ermatinger, R., y Löffing-Cueni, D. (1997). Insulin-like growth factor I in the teleost *Oreochromis mossambicus*, the tilapia: gene sequence, tissue expression, and cellular localization. *Endocrinology* **138**, 3613-3619.
- Reinecke, M., y Collet, C. (1998). The phylogeny of the insulin-like growth factors. *Int. Rev. Cytol.* **183**, 1-94.
- Rescan, P.-Y (2001). Regulation of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. B* **130**, 1-12.
- Rinderknecht, E., y Humbel, R.E. (1978). The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J. Biol. Chem.* **253**, 2769-2776.
- Rosochacki, S.J., Bialowas, H., Czlonkowska, M., Guskiewicz, A., Kossakowski, M., Sadowska, J., Siadkowska, E., Zebrowska, T., Szumiec, J., y Zwierzchowski, L. (1993). Introduction of human hormone gene into common carp (*Cyprinus carpio*). *Anim. Sci. Papers Reports* **11**, 47-58.
- Ross, R.J.M., Espósito, N., Shen, X.Y., Von Laue, S., Chew, S.L., Dobson, P.R.M., Postel-Vinay, M.-C., y Finidori, J. (1997). A short isoform of the human growth hormone receptor functions as a dominant negative inhibitor of the full-length receptor and generates large amounts of binding protein. *Mol. Endocrinol.* **11**, 265-273.
- Ross, R.J.M. (1999). Truncated growth hormone receptor isoforms. *Acta Paediatr. Suppl.* **428**, 164-166.
- Rotllant, J., Balm, P.H.M., Ruane, M.N., Pérez-Sánchez, J., Wendelaar-Bonga, S.E., y Tort, L. (2000a). Pituitary proopiomelanocortin-derived peptides and hypothalamus-pituitary-interrenal axis activity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during prolonged crowding stress: differential regulation of adrenocorticotropin hormone and alpha-melanocyte-stimulating hormone release by corticotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* **119**, 152-163.

- Rotllant, J., Balm, P.H.M., Wendelaar-Bonga, S.E., Pérez-Sánchez, J., y Tort, L. (2000b). A drop in ambient temperature results in a transient reduction of interrenal ACTH responsiveness in the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Physiol. Biochem.* **23**, 265-273.
- Rotllant, J., Balm, P.H., Pérez-Sánchez, J., Wendelaar-Bonga, S.E., y Tort, L. (2001). Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. *Gen. Comp. Endocrinol.* **121**, 333-342.
- Rouzic, P.L., Sandra, O., Grosclaude, J., Rentier-Delrue, F., Jolois, O., Tujague, M., Pakdel, F., Sandowski, Y., Cohen, Y., Gertler, A., y Prunet, P. (2001). Evidence of rainbow trout prolactin interaction with its receptor through unstable homodimerisation. *Mol. Cell Endocrinol.* **172**, 105-113.
- Rowlerson, A., Mascarello, F., Radaelli, G., y Veggetti, A. (1995). Differentiation and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* L.: II Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle from hatching to adult. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **16**, 223-236.
- Rowlerson, A., Radaelli, G., Mascarello, F., y Veggetti, A. (1997). Regeneration of skeletal muscle in two teleost fish: *Sparus aurata* and *Brachydanio rerio*. *Cell Tissue Res.* **289**, 311-322.
- Rowlerson, A., y Veggetti, A. (2001). Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. En: Muscle development and growth. Ed: Johnston, I.A.
- Rowley, A.F., Knight, J., Lloyd-Evans, P., Holland, J.W., y Vickers, P.J. (1995). Eicosanoids and their role in immune modulation in fish - a brief overview. *Fish and Shellfish Immunol.* **5**, 549-567.
- Rudnicki, M.A., Braun, T., Hinuma, S., y Jaenisch, R. (1992). Inactivation of *MyoD* in mice leads to upregulation of the myogenic HLH gene *Myf-5* and results in apparently normal muscle development. *Cell* **71**, 383-390.
- Russell, N.R., y Wooten, R.J. (1992). Appetite and growth compensation in the European minnow, *Phoxinus phoxinus* (Cyprinidae), following short periods of food restriction. *Environ. Biol. Fishes* **34**, 277-285.
- Ryer, C.H., y Olla, B.L. (1996). Growth depensation and aggression in laboratory reared coho salmon: the effect of food distribution and ration size. *J. Fish Biol.* **48**, 686-694.

-S-

- Saito, A., Sekine, S., Komatsu, Y., Sato, M., Hirano, T., y Itoh, S. (1988). Molecular cloning of eel growth hormone cDNA and its expression in *Escherichia coli*. *Gene* **73**, 545-551.
- Sakamoto, T., e Hirano, T. (1991). Growth hormone receptors in the liver and osmoregulatory organs of rainbow trout: characterization and dynamics during adaptation to seawater. *J. Endocrinol.* **130**, 425-433.
- Samartin, S., y Chandra, R.K. (2001). Obesity, overnutrition and the immune system. *Nutr. Res.* **21**, 243-262.

- Sandra, O., Sohm, F., de Luze, A., Prunet, P., Edery, M., y Kelly, P.A. (1995). Expression cloning of a cDNA encoding a fish prolactin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 6037-6041.
- Sänger, A.M., y Stoiber, W. (2001) Muscle fiber diversity and plasticity. En: Muscle development and growth. Ed: Johnston, I.A.
- Santinha, P.J.M., Médale, F., Corraze, G. y Gomes, E.F.S. (1999). Effects of the dietary protein/lipid ratio on growth and nutrients utilization in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquacult. Nutr.* **5**, 147-156.
- Santos, C.R.A., Power, D.M., Kille, P., Llewellyn, L., Ramsurn, V., Wigham, T., y Sweeney, G. (1997). Cloning and sequencing of a full length sea bream (*Sparus aurata*) β -actin cDNA. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **117**, 185-189.
- Santos, C.R.A., Ingleton, P.M., Cavaco, J.E.B., Kelly, P.A., Edery, M., y Power, D.M. (2001). Cloning, characterization, and tissue distribution of prolactin receptor in the sea bream (*Sparus aurata*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **121**, 32-47.
- Sartore, S., Gorza, L., y Schiaffino, S. (1982). Fetal myosin heavy chains in regenerating muscle. *Nature* **298**, 294-296.
- Satia, B.P. (1974). Quantitative protein requirements of rainbow trout. *Prg. Fish Cult.* **36**, 80-85.
- Schultz, E. (1996). Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscle. *Dev. Biol.* **175**, 84-94.
- Schwartz, M.W., y Seeley, R.J. (1997). The new biology of body weight regulation. *J. Am. Diet Assoc.* **97**, 54-58.
- Schwarz, F.J., Plank, J., y Kirchgessner M. (1985). Effect of protein or energy restriction with subsequent realimentation on performance parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* **48**, 23-33.
- Seeburg, P.H. (1982). The human growth hormone gene family: nucleotide sequences show recent divergence and predict a new polypeptide hormone. *DNA* **1**, 239-249.
- Shamblott, M.J. y Chen, T.T. (1993). Age-related and tissue-specific levels of five forms of insulin-like growth factor mRNA in a teleost. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **2**, 351-361.
- Shamblott, M.J., Leung, S., Greene, M.W., y Chen, T.T. (1998). Characterization of a teleost insulin-like growth factor II (IGF-II) gene: evidence for promoter CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) sites, and the presence of hepatic C/EBP. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **7**, 181-190.
- Shearer, K.D., Silverstein J.T., y Plisetskaya E.M.. (1997a). Role of adiposity in food intake control of juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comp. Biochem. Physiol. A* **118**, 1209-1215.
- Shearer, K.D., Silverstein, J.T., y Dickhoff, W.W. (1997b). Control of growth and adiposity of juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* **157**, 311-323.
- Shearer, K.D., y Swanson, P. (2000). The effect of whole body lipid on early sexual maturation of 1+ age male chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* **190**, 343-367.

- Sheehan, E.M., O'Connor, T.P., Sheehy, P.J.A., Buckley, D.J., y Fitzgerald, R. (1996). Effect of dietary fat intake on the quality of raw and smoked salmon. *Irish J. Agric. Food Res.* **35**, 37-42.
- Sheridan, M.A. (1988). Lipid dynamics in fish: Aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comp. Biochem. Physiol. B* **90**, 679-690.
- Sheridan, M.A. (1989). Alterations in lipid metabolism accompanying smoltification. *Aquaculture* **82**, 191-203.
- Sheridan, M.M. (1994). Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. B* **107**, 495-508.
- Shimizu, M., Swanson, P., y Dickhoff, W.W. (1999). Free and protein-bound insulin-like growth factor (IGF-I) and IGF-binding proteins in plasma of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **115**, 398-405.
- Shiu, R.P.C., Kelley, P.A., y Friesen, H.G. (1973). Radioreceptor assay for prolactin and other lactogenic hormones. *Science* **180**, 968-971.
- Shoemaker, C.A., Klesius, P.H., y Lim, C. (2001). Immunity and disease resistance in fish. En: Nutrition and fish health. Eds.: Lim, C., y Webster, C.D.
- Shuldiner, A.R., Barbetti, F., Raben, N., Scavo, L., y Serrano, J. (1991). Insulin. En: Insulin-like growth factors: molecular and cellular aspects. Ed: Le Roith, D.
- Siharath, K., Kelley, K.M., y Bern, H.A. (1996). A low-molecular-weight (25-kDa) IGF-binding protein is increased with growth inhibition in the fasting striped bass, *Morone saxatilis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **102**, 307-316.
- Silverstein, J.T., Shimma, H., y Ogata, H. (1997). Early maturity in amago salmon (*Oncorhynchus masuishiikawai*): an association with energy storage. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **54**, 444-451.
- Silverstein, J.T., Shearer, K.D., Dickhoff, W.W., y Plisetskaya, E.M. (1998). The effects of growth and fatness on sexual development of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) parr. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **55**, 2376-2382.
- Silverstein, J.T., Shearer, K.D., Dickhoff, W.W., y Plisetskaya, E.M. (1999). Regulation of nutrient intake and energy balance in salmon. *Aquaculture* **177**, 161-169.
- Silverstein, J.T., y Plisetskaya, E.M. (2000). The effects of NPY and insulin on food intake regulation in fish. *Amer. Zool.* **40**, 296-308.
- Sitjá-Bobadilla, A., y Pérez-Sánchez, J. (1999). Diet related changes in non-specific immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish Shellfish Immunol.* **9**, 637-640.
- Sitjá-Bobadilla, A., y Álvarez-Pellitero, P. (2001). *Leptotheca sparidarum* n. sp. (Myxosporea: Bivalvulida), a parasite from cultured common dentex (*Dentex dentex* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) (Teleostei: Sparidae). *J. Eukaryot. Microbiol.* **48**, 627-639.
- Sitjá-Bobadilla, A., Mingarro, M., Pujalte, M.J., Garay, E., Álvarez-Pellitero, P., y Pérez-Sánchez, J. (2003). Immunological and pathological status

- of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) under different long-term feeding regimes. *Aquaculture* **220**, 707-724.
- Sjogren, K., Liu, J.L., Blad, K., Skrtic, S., Vidal, O., Wallenius, V., LeRoith, D., Tornell, J., Isaksson, O.G., Jansson, J.O., y Ohlsson, C. (1999) Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 7088-7092.
- Smart, G., y Prickett, R. (1997). Farming bass and bream. *EEZ Technology* 169-174.
- Smith, R.E., y Horwitz, B.A. (1969). Brown fat and thermogenesis. *Physiol. Rev.* **49**, 330-425.
- Smith, T.H., Kachinsky, A.M., y Miller, J.B. (1994). Somite subdomains, muscle cell origins, and the four muscle regulatory factor proteins. *J. Cell Biol.* **127**, 95-105.
- Smith, W.C., Kuniyoshi, J., y Talamantes, F. (1989). Mouse serum growth hormone (GH) binding protein has GH receptor extracellular and substituted transmembrane domains. *Mol. Endocrinol.* **3**, 984-990.
- Sobrier, M.L., Duquesnoy, P., Duriez, B., Amselem, S., y Goossens, M. (1993). Expression and binding properties of two isoforms of the human growth hormone receptor. *FEBS Lett.* **319**, 16-20.
- Sokal, R.R., y Rohlf, F.J. (1981). *Biometry*. Ed: Freeman W.H.
- Sotiropoulos, A., Goujon, L., Simonin, G., Kelly, P.A., Postel-Vinay, M.-C., y Finidori, J. (1993). Evidence for generation of the growth hormone-binding protein through proteolysis of the growth hormone membrane receptor. *Endocrinology* **132**, 863-1865.
- Specker, J.L., Ingleton, P.M., y Bern, H.A. (1984). Comparative physiology of the prolactin cell. En: *Prolactin secretion: a multidisciplinary approach*. Eds.: Mena, F., y Valverde, R.C.
- Speilberg, L., Evensen, O., y Nafstad, P. (1994). Liver of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a light, transmission, and scanning electron microscopic study, with special reference to the sinusoid. *Anat. Rec.* **240**, 291-307.
- Spiegelman, B.M., y Flier, J.S. (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* **104**, 531-543.
- Ståhlbom, A.K., Sara V.R., y Hoeben, P. (1999). Insulin-like growth factor mRNA in Barramundi (*Lates calcarifer*): alternative splicing and nonresponsiveness to growth hormone. *Biochem. Genet.* **37**, 69-93.
- Stamataris, C., Kyriazakis, I., y Emmans, G.C. (1991). The performance and the body composition of young pigs following a period of food retardation by food restriction. *Animal Production* **53**, 373-381.
- Stickland, N.C., White, R.N., Mescall, P.E., Crook, A.R., y Thorpe, J.E. (1988). The effect of temperature on myogenesis in embryonic development of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Anat. Embryol.* **178**, 253-257.
- Stockdale, F.E. (1992). Myogenic cell lineages. *Dev. Biol.* **154**, 284-298.
- Storebackken, T., Hung, S.S.O., Calvert, C.C., y Plisetskaya, E.M. (1991). Nutrient partitioning in rainbow trout at different feeding rates. *Aquaculture* **96**, 191-203.

- Summers, J.D., Spratt, D., y Atkinson, J.L. (1990). Restricted feeding and compensatory growth for broilers. *Poultry Science* **69**, 1855-1861.
- Sunyer, J.O., y Tort, L. (1995). Natural haemolytic and bacterial activities of sea bream *Sparus aurata* serum are affected by the alternative complement pathway. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **45**, 333-345.
- Sweeney, G. (2002). Leptin signalling. *Cell. Signal.* **14**, 655-663.
- Swennen, D., Poncelet, A.C., Sekkali, B., Rentier-Delrue, F., Martial, J.A., y Belayew, A. (1992). Structure of the tilapia (*Oreochromis mossambicus*) prolactin I gene. *DNA Cell Biol.* **11**, 673-684.
- Szeczowka, J., Tai, L.R., y Goodman, H.M. (1990). Effects of tunicamycin on growth hormone binding in rat adipocytes. *Endocrinology* **126**, 1834-1841.

-T-

- Takama, K., Suzuki, T., Yoshida, K., Arai, H., y Anma, H. (1994) Lipid content and fatty acid composition of phospholipids in white-flesh fish species. *Fish. Sci.* **60**, 177-184.
- Takayama, Y., Rand-Weaver, M., Kawauchi, H., y Ono, M. (1991). Gene structure of chum salmon somatolactin, a presumed pituitary hormone of the growth hormone/prolactin family. *Mol. Endocrinol.* **5**, 778-786.
- Talamantes, F., y Ogren, L. (1988). The placenta as an endocrine organ: Polypeptides. En: The physiology of reproduction. Eds.: Knobil, E., y Neil, J.D.
- Talamantes, F. (1990). Structure and regulation of secretion of mouse placental lactogens. *Prog. Clin. Res.* **342**, 81-85.
- Tan, X., y Du, S.J. (2002). Differential expression of two MyoD genes in fast and slow muscles of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Dev. Genes Evol.* **212**, 207-217.
- Tanaka, M., Toma, Y., Ohkubo, T., Sudo, S., y Nakashima, K. (1995). Sequence of the flounder (*Paralichthys olivaceus*) growth hormone-encoding gene and its promoter region. *Gene* **165**, 321-322.
- Tanaka, S., Inoue, S., Isoda, F., Waseda, M., Ishihara, M., Yamakawa, T., Sugiyama, A., Takamura, Y., y Okuda, K. (1993). Impaired immunity in obesity: suppressed but reversible lymphocyte responsiveness. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **17**, 631-636.
- Tanaka, S., Isoda, F., Ishihara, Y., Kimura, M., y Yamakawa T. (2001). T lymphopaenia in relation to body mass index and TNF- α in human obesity: adequate weight reduction can be corrective. *Clin. Endocrinol.* **54**, 347-354.
- Tang, Y., Lin, C.M., Chen, T.T., Kawauchi, H., Dunham, R.A., y Powers, D.A. (1993). Structure of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) growth hormone gene and its evolutionary implications. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **2**, 198-206.
- Taniyama, S., Kitahasi, T., Ando, H., Ban, M., Ueda, H., y Urano, A. (1999). Changes in the levels of mRNA for GH/prolactin/somatolactin family and Pit-1/GHF-1 in the pituitaries of pre-spawning chum salmon. *J. Mol. Endocrinol.* **23**, 189-198.

- Taouis, M., Chen, J.W., Daviaud, C., Dupont, J., Derouet, M., y Simon, J. (1998). Cloning the chicken leptin gene. *Gene* **208**, 239-242.
- Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K.J., Smutko, J.S., Mays, G.G., Woolf, E.A., Monroe, C.A., y Tepper, R.I. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* **83**, 1263-1271.
- Teskeredzic, Z., Teskeredzic, E., Tomec, M., Hamanjeck, M., y McLean, E. (1995). The impact of rationing upon growth, feed conversion efficiency and body composition of rainbow trout. *Water Sci. Technol.* **31**, 219-223.
- Thissen, J.P., Ketelslegers, J.M., y Underwood, L.E. (1994). Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr. Rev.* **15**, 80-101.
- Thomas, P.T., y Woo, P.T.K. (1990). Dietary modulation of humoral immune response and anaemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) infected with *Cryptobia salmositica* Katz, 1950. *J. Fish Dis.* **13**, 435-446.
- Thompson, I., Choubert, G., Houlihan, D.F., y Secombes, C.J. (1995). The effect of dietary vitamin A and astaxanthin on the immunocompetence of rainbow trout. *Aquaculture* **133**, 91-102.
- Tian, X.C., Chen, M.J., Pantschenko, A.G., Yang, T.J., y Chen, T.T. (1999). Recombinant E-peptides of pro-IGF-I have mitogenic activity. *Endocrinology* **140**, 3387-3390.
- Ticho, B.S., Stainier, D.Y.R., Fishman, M.C., y Breitbart, R.E. (1996). Three zebrafish MEF2 genes delineate somitic and cardiac muscle development in wild-type and mutant embryos. *Merch. Dev.* **59**, 205-218.
- Toguyeni, A., Baroiller, J.F., Fostier, A., Le Bail, P.-Y., Kuhn, E.R., Mol, K.A., y Fauconneau, B. (1996). Consequences of food restriction on short-term growth variation and on plasma circulating hormones in *Oreochromis niloticus* in relation to sex. *Gen. Comp. Endocrinol.* **103**, 167-175.
- Tort, L., Rotllant, J. y Rovira, L. (1998a). Immunological suppression in gilthead sea bream *Sparus aurata* of the north-west Mediterranean at low temperatures. *Comp. Biochem. Physiol. A* **120**, 175-179.
- Tort, L., Padrós, F., Rotllant, J., y Crespo, S. (1998b). Winter syndrome in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Immunological and histopathological features. *Fish Shellfish Immunol.* **8**, 37-47.
- Tse, D.L., Chow, B.K., Chan, C.B., Lee, L.T., y Cheng, C.H. (2000). Molecular cloning and expression studies of a prolactin receptor in goldfish (*Carassius auratus*). *Life Sci.* **66**, 593-605.
- Tse, D.L.Y., Tse, M.C.L., Chan, C.B., Deng, L., Zhang, W.M., Lin, H.R., y Cheng C.H.K. (2003). Sea bream growth hormone receptor: molecular cloning and functional studies of the full-length cDNA, and tissue expression of two alternatively spliced forms. *Biochimica et Biophysica Acta* **1625**, 64-76.
- Tsushima, T., y Friesen, H.G. (1973). Radioreceptor assay for growth hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **37**, 334-337.

-U-

- Unger, R.H. (2000). Leptin physiology: a second look. *Regul. Pept.* **92**, 87-95.
- Urbanek, M., Russell, J.E., Cooke, N.E., y Liebhaber, S.A. (1993). Functional characterization of the alternatively spliced, placental human growth hormone receptor. *J. Biol. Chem.* **268**, 19025-19032.
- Usher, M.L., Stickland, N.C., y Thorpe, J.E. (1994). Muscle development in Atlantic salmon (*Salmo salar*) embryos and the effect of temperature on muscle cellularity. *J. Fish Biol.* **44**, 953-964.

-V-

- Valderrábano, J., Delfa, R., y Uriarte, J. (2002). Effect of level of feed intake on the development of gastrointestinal parasitism in growing lambs. *Vet. Parasitol.* **104**, 327-338.
- Van der Have, T.M., y de Jong, G. (1996). Adult size in ectotherms: temperature effects on growth and differentiation. *J. Theor. Biol.* **183**, 329-340.
- Van Muiswinkel, W.B., Lamers, C.H., y Roumbout, J.H.W.M. (1991). Structural and functional aspects of the spleen in bony fish. *Res. Immunol.* **142**, 362-366.
- VanderKuur, J.A., Wang, X., Zhang, L., Campbell, G.S., Allevato, G., Billestrup, N., Norstedt, G., Carter-Su, C. (1994). Domains of the growth hormone receptor required for association and activation of JAK2 tyrosine kinase. *Biol. Chem.* **269**, 21709-21717.
- Vega-Rubín de Celis, S., Gómez-Requeni, P., Calduch-Giner, J.A., Médale, F., y Pérez-Sánchez, J. (2003). Expression and characterization of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) somatolactin: assessment of in vivo metabolic effects. *Mar. Biotechnol.* **5**, 92-101.
- Venkatesh, B., y Brenner, S. (1997). Genomic structure of the pufferfish (*Fugu rubripes*) growth hormone-encoding gene: a comparative analysis of teleost growth hormones genes. *Gene* **187**, 211-215.
- Vergara-Martín, J.M. (2000). Consideraciones socio-económicas sobre el momento actual de la acuicultura marina en España. *AquaTIC* **10**, 1-11.
- Vernon, R.G., y Flint D.J. (1984). Adipose tissue: metabolic adaptation during lactation. *Symp. Zool. Soc. Lond.* **51**, 119-145.
- Vernon, R.G. (1986). The growth and metabolism of adipocytes. En: Control and manipulation of animal growth. Eds.: Buttery, P.J., Haynes N.B., y Lindsay, D.B.
- Vernon, R.G., y Pond, C.M. (1997). Adaptations of maternal adipose tissue to lactation. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2**, 231-241.
- Vernon, R.G., y Houseknecht, K.L. (2000). Adipose tissue: beyond an energy reserve. En: Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth, and reproduction. Ed: Cronje, P.B.
- Vernon, R.G., Denis, R.G., Sorensen, A. (2001). Signals of adiposity. *Domest. Anim. Endocrinol.* **21**, 197-214.
- Vieira, V.L.A., y Johnston, I. A. (1992). Influence of temperature on muscle fibre development in larvae of the herring *Clupea harengus*. *Mar. Biol.* **112**, 333-341.

- Villaseñor, A. (2002). El papel de la leptina en el desarrollo de la obesidad. *Rev. Endocrinol. Nutr.* **10**, 135-139.
- Visser, M., Bouter, L.M., McQuillan, G.M., Wener, M.H., y Harris, T.B. (1999): Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* **282**, 2131-2135.
- Volkoff, H., y Peter, R.E. (2001). Characterization of two forms of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide precursors in goldfish: molecular cloning and distribution, modulation of expression by nutritional status, and interactions with leptin. *Endocrinology* **142**, 5076-5088.

-W-

- Waagbø, R. (1994). The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmo salar* L: a review. *Aquacult. Fish. Manage* **25**, 175-97.
- Wagner, J.D., Jayo, M.J., Cefaiu, W.T., Hardy, V.A., Rankin, S.E., y Toombs, C.F. (1996). Recombinant human leptin (rHuLEPTIN) reduces body weight and body fat and improves insulin sensitivity in nonhuman primates. *Obes. Res.* **4**, 27S.
- Wahli, T., Frischknecht, R., Sschmitt, M., y Gabaudan, J. (1995). A comparison of the effect of silicone coated ascorbic acid and ascorbyl phosphate on the course of ichthyophthiriosis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* **18**, 347-355.
- Walker, W.H., Fitzpatrick, S.L., Barrera-Saldana, H.A., Reséndez-Pérez, D., y Saunders, G.F. (1991). The human placental lactogen genes: structure, function, evolution and transcriptional regulation. *Endocr. Rev.* **12**, 316-328.
- Wallis, M. (1988). The molecular basis of growth hormone deficiency. *Mol Aspects Med.* **10**, 429-509.
- Warwick-Davies, J., Lowrie, D.B., y Cole, P.J. (1995). Growth hormone is a human macrophage activating factor. Priming of human monocytes for enhanced release of H₂O₂. *J. Immunol.* **154**, 1909-1918.
- Watabe, S., Imai, J., Nakaya, M., Hirayama, Y., Okamoto, Y., Masaki, H., Uozumi, T., Hirono, I., y Aoki, T. (1995). Temperature acclimation induces light meromyosin isoforms with different primary structures in carp fast skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 118-125.
- Watabe, S. (2001). Myogenic regulatory factors. En: Muscle development and growth. Ed: Johnston, I.A.
- Weatherley, A.H., y Gill, H.S. (1981). Recovery growth following periods of restricted rations and starvation in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* **18**, 195-208.
- Weatherley, A.H., y Gill, H.S. (1987). The biology of fish growth.
- Weigle, D.S. (1994). Appetite and the regulation of body composition. *FASEB Journal* **8**, 302-310.
- Weil, C., Carre, F., Blaise, O., y Le Bail, P.-Y. (1999). Differential effect of insulin-like growth factor-I on *in vitro* gonadotropin (I and II) and

- growth hormone secretions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at different stages of reproductive cycle. *Endocrinology* **140**, 2054-2062.
- Weil, C., Le Bail, P.Y., Sabin, N., y Le Gac, F. (2003). *In vitro* action of leptin on FSH and LH production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at different stages of the sexual cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* **130**, 2-12.
- Weintraub, H., Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M., Benezra, R., Blackwell, T.K., Turner, D., Rupp, R., Hollenberg, S., Zhuang, Y., y Lasser, A. (1991). The MyoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* **251**, 761-766.
- Weintraub, H. (1993). The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks and thresholds. *Cell* **75**, 1241-1244.
- Wendelaar-Bonga, S.E. (1997). The stress response in fish. *Physiol. Rev.* **77**, 591-625.
- Wetterau, L.A., Moore, M.G., Lee, K.W., Shim, M.L., y Cohen, P. (1999). Novel aspects of the insulin-like growth factor binding proteins. *Mol. Genet. Metab.* **68**, 161-181.
- Weyts, F.F.A., Cohen, N., Flik, G., y Verburg-Van Kemenade, B.M.L. (1999). Interactions between the immune system and the hypothalamus-pituitary-interrenal axis in fish. *Fish Shellfish Immunol.* **9**, 1-20.
- Whali, T., Frischknecht, R., Schmitt, M., y Gabaudan, J. (1995). A comparison of the effects of silicone coated ascorbic acid and ascorbyl phosphate on the course of ichthyophthiriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* **18**, 347-355.
- Wilkie, B.N., y Mallard, B.A. (1999). Genetic effects on vaccination. En: Veterinary vaccines and diagnostics. Advances in Veterinary Medicine. Ed: Schultz, R.D.
- Wilson, P.N., y Olson, D.F. (1960). Compensatory growth after undernutrition in mammals and birds. *Biol. Rev.* **35**, 324-363.
- Wilson, R.P., y Halver, J.E. (1986). Protein and aminoacid requirements of fishes. *Annu. Rev. Nutr.* **6**, 225-244.
- Wing, E.J., Stanko, R.T., Winkelstein, A., y Adibi, S.A. (1983). Fasting enhance immune effector mechanisms in obese subjects. *Am. J. Med.* **75**, 91-96.
- Wolters, W.R., Wise, D.J., y Klesius, P.H. (1996). Survival and antibody response of channel catfish, blue catfish and channel catfish female x blue catfish male hybrids after exposure to *Edwardsiella ictaluri*. *J. Aquatic Animal Health* **8**, 249-254.
- Wolters, W.R., y Johnson, M.R. (1994). Enteric septicemia resistance in blue catfish and three channel catfish strains. *J. Aquatic Animal Health* **6**, 329-334.
- Wong, A.O., Cheung, H.Y., Lee, E.K., Chan, K.M., y Cheng, C.H. (2002). Production of recombinant goldfish prolactin and its applications in radioreceptor binding assay and radioimmunoassay. *Gen. Comp. Endocrinol.* **126**, 75-89.

-X-

Xiong, F., Chin, R.A., y Hew, C.L. (1992). A gene encoding chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) prolactin: gene structure and potential cis-acting regulatory elements. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **1**, 155-164.

-Y-

Yada, T., Hirano, T., y Grau, E.G. (1994). Changes in plasma levels of the two prolactins and growth hormone during adaptation to different salinities in the euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **93**, 214-233.

Yaghoubian, S., Filosa, M.F., y Youson, J.H. (2001). Proteins immunoreactive with antibody against a human leptin fragment are found in serum and tissues of the sea lamprey, *Petromyzon marinus* L. *Comp. Biochem. Physiol. B* **129**, 777-785.

Yakar, S., Liu, J.L., Stannard, B., Butler, A., Accili, D., Sauer, B., y Le Roith, D. (1999) Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 7324-7329.

Yamaguchi, K., Specker, J.L., King, D.S., Yokoo, Y., Nishioka, R.S., Hirano, T., y Bern, H.A. (1988). Complete amino acid sequences of a pair of fish (tilapia) prolactins, tPRL177 and tPRL188. *J. Biol. Chem.* **263**, 9113-9121.

Yamazaki, N., Kangawa, S., Kobayashi, S., Kikutani, M., y Sonenberg, M. (1972). Amino acid sequence of a biologically active fragment of bovine growth hormone. *J. Biol. Chem.* **247**, 3874-3880.

Yang, B.Y., Arab, M., y Chen, T.T. (1997). Cloning and characterization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) somatolactin cDNA and its expression in pituitary and nonpituitary tissues. *Gen. Comp. Endocrinol.* **106**, 271-280.

Yao, K., y Le Bail, P.-Y. (1999). Biochemical characterization of growth hormone receptor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after purification. *Fish Physiol. Biochem.* **21**, 111-120.

Yao, K., Niu, P.-D., Le Gac, F., y Le Bail, P.-Y. (1991). Presence of specific growth hormone binding sites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues: characterization of the hepatic receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.* **81**, 72-82.

Yoshikawa-Ebesu, J.S.M., Borski, R.J., y Richman, N.H.III. (1995). Effects of acclimation salinity and *in vitro* medium osmotic pressure on the incorporation of 3H-leucine into the two prolactins of the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *J. Exp. Zool.* **271**, 331-339.

Yowe, D.L., y Epping, R.J. (1995). Cloning of the barramundi growth hormone-encoding gene: a comparative analysis of higher and lower vertebrate GH genes. *Gene* **162**, 255-259.

Yu, M.W., Robinson, F.E., Clandinin, M.T., y Bodnar, L. (1990). Growth and body composition of broiler chickens in response to different regimes of feed restriction. *Poultry Science* **69**, 2074-2081.

-Z-

- Zachmann, A., Falcon, J., Knijff, S.C.M., Bolliet, V., y Ali, M.A. (1992). Effects of photoperiod and temperature on rhythmic melatonin secretion from the pineal organ of the white sucker (*Catostomus commersoni*) *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **86**, 26-33.
- Zapata, A.G., Varas, A., y Torroba, M. (1992). Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. *Immunology Today* **13**, 142-147.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., y Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425-432.
- Zhang, Y., y Marchant, T.A. (1999). Identification of serum GH-binding proteins in the goldfish (*Carassius auratus*) and comparison with mammalian GH-binding proteins. *J. Endocrinol.* **161**, 255-262.
- Zhang, Y., Jiang, J., Kopchick, J.J., y Frank, S.J. (1999). Disulfide linkage of growth hormone (GH) receptors (GHR) reflects GH-induced GHR dimerization. *J. Biol. Chem.* **274**, 33072-33084.
- Zhou, Y., He, L., y Kopchick, J.J. (1994). An exon encoding the mouse growth hormone binding protein (mGHBP) carboxy terminus is located between exon 7 and 8 of the mouse growth hormone receptor gene. *Receptor* **4**, 223-227.
- Zhou, Y., He, L., y Kopchick, J.J. (1996). Structural comparison of a portion of the rat and mouse growth hormone receptor/binding protein genes. *Gene* **177**, 257-259.
- Zhu, Y., y Thomas, P. (1995). Red drum somatolactin: development of a homologous radioimmunoassay and plasma levels after exposure to stressors or various backgrounds. *Gen. Comp. Endocrinol.* **99**, 275-278.
- Zhu, Y., y Thomas, P. (1996). Elevations of somatolactin in plasma and pituitaries and increased alpha-MSH cell activity in red drum exposed to black background and decreased illumination. *Gen. Comp. Endocrinol.* **101**, 21-31.
- Zhu, Y., y Thomas, P. (1997). Effects of somatolactin on melanosome aggregation in the melanophores of red drum (*Sciaenops ocellatus*) scales. *Gen. Comp. Endocrinol.* **105**, 127-133.
- Zhu, Y., y Thomas, P. (1998). Effects of light on plasma somatolactin levels in red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **111**, 76-82.
- Zhu, T., Goh, E.L.K., Graichen, R., Ling, L., y Lobie, P.E. (2001). Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell. Signal.* **13**, 599-616.
- Zohar, Y., Harel, M., Hassin, S., y Tandler, A. (1995). Broodstock management and manipulation of spawning in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. En: Broodstock management and egg and larval quality. Eds.: Bromage, N., y Roberts, R.J.

