

# Universidad de Huelva

Departamento de Biología Ambiental y Salud Pública



## **Evaluación de las condiciones de cultivo durante la cría de acedía (*Dicologlossa cuneata*) y estudio integrado de su fisiología y comportamiento en cautividad**

**Memoria para optar al grado de doctora  
presentada por:**

**Elena de la Roca Marchena**

Fecha de lectura: 20 de diciembre de 2017

Bajo la dirección de los doctores:

Marcelino Herrera Domínguez

Antonio Canalejo Raya

**Huelva, 2017**



**Universidad de Huelva**



**Universidad  
de Huelva**

**TESIS DOCTORAL**

**EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO  
DURANTE LA CRÍA DE LA ACEDÍA (*Dicologlossa cuneata*) Y  
ESTUDIO INTEGRADO DE SU FISIOLOGÍA Y  
COMPORTAMIENTO EN CAUTIVIDAD**

**ELENA DE LA ROCA MARCHENA**

**Huelva, 2017**





Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera  
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL

Departamento de Ciencias Integradas  
Universidad de Huelva

Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera  
Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural  
Junta de Andalucía

# EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DURANTE LA CRÍA DE LA ACEDÍA (*Dicologlossa cuneata*) Y ESTUDIO INTEGRADO DE SU FISIOLOGÍA Y COMPORTAMIENTO EN CAUTIVIDAD

Memoria presentada por **Elena de la Roca Marchena** para optar al  
Grado de Doctor por la Universidad de Huelva

**Programa de Doctorado:**

Ciencia y Tecnología Industrial y Ambiental

**Huelva, 2017**

Directores:

**Dr. D. Marcelino Herrera Rodríguez**

Investigador del Centro IFAPA

“Agua del Pino”. Junta de Andalucía

**Dr. D. Antonio Canalejo Raya**

Profesor Titular de Biología Celular

Universidad de Huelva



Dr. D. **Marcelino Herrera Rodríguez**, Investigador del Centro IFAPA “Agua del Pino” de la Junta de Andalucía y Dr. D. **Antonio Canalejo Raya**, Profesor Titular de Biología Celular de la Universidad de Huelva,

**CERTIFICAN:**

Que la presente memoria que lleva por título *“Evaluación de las condiciones de cultivo durante la cría de la acedía (Dicologlossa cuneata) y estudio integrado de su fisiología y comportamiento en cautividad”* ha sido realizada por la Licenciada en Biología Dña. Elena de la Roca Marchena, para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Huelva, bajo nuestra dirección.

Dicha memoria reúne las condiciones necesarias de rigor científico para ser juzgada por el Tribunal correspondiente en la Universidad de Huelva.

Y para que así conste, se expide en Huelva, 30 de octubre de 2017.

Fdo. Dr. Marcelino Herrera Rodríguez.

Fdo. Dr. D. Antonio Canalejo Raya.



Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por el Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA) “Agua del Pino”, organismo autónomo adscrito a la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía mediante los proyectos:

- Proyecto INIA RTA2007-00026-C02-01 “Optimización del contenido en macronutrientes en piensos para el preengorde de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*)”.
- Proyecto de Cooperación Internacional INTERREG 0251\_ECOAQUA\_5\_E. M “Establecimiento de una red de cooperación transfronteriza para la utilización de sistemas de producción ecológicamente sostenibles en acuicultura: ECOAQUA”.
- Proyecto de Cooperación Internacional INTERREG 0433\_BONAQUA\_5\_E POCTEP 2007–2013 “Cooperación transfronteriza para el desarrollo de buenas prácticas sanitarias en acuicultura marina: BONAQUA”.



## Agradecimientos

*“Todo lo que puedas imaginar es real”* (Pablo Picasso). Muchas han sido las veces que imaginaba que escribía estas palabras de agradecimiento. Y por fin, son reales. Esto significa que el momento final está muy cerca y mi sueño de ser Doctora también será real. He de decir que ha sido un largo camino, pero no por eso arduo, sino todo lo contrario. He disfrutado en cada uno de sus pasos y lo volvería a recorrer mil veces. Y todo ello ha sido sin duda gracias a la ayuda de todas las personas que me han acompañado en este andar. Y ahora, llega el momento de agradecer a cada uno de vosotros vuestro apoyo y aliento.

Mi primer agradecimiento va dirigido a M<sup>a</sup> Luisa Cordero Villafáfila, Directora del Centro IFAPA “Agua del Pino”. Gracias por hacer posible que realizara mi sueño de ser Doctora y permitirme utilizar las instalaciones del Centro y los datos de los trabajos realizados durante mi estancia en él. Mil gracias por tu apoyo y confianza. En segundo lugar están mis mentores, los que me iniciaron en este maravilloso mundo de los peces planos, los Doctores Marcelino Herrera Rodríguez e Ismael Hachero Cruzado. Aprendí muchísimo con vosotros, no sólo de peces sino de compañerismo y respeto. Han sido unos años en mi carrera profesional que no olvidaré jamás. Un placer teneros en mi camino. Mi siguiente agradecimiento lo dirijo a los Directores de esta Tesis, el Dr. Antonio Canalejo Raya, profesor titular de Biología Celular de la Universidad de Huelva y de nuevo el Dr. Marcelino Herrera, investigador del Centro IFAPA “Agua del Pino”. Todos los que habéis realizado una Tesis Doctoral sabéis los momentos de inseguridad que en ella surgen y las miles de dudas que se plantean. Pues he tenido la gran suerte de contar con estas dos grandes personas que han estado en todo momento ayudándome de manera incondicional, respondiendo a cada una de mis preguntas con toda la dedicación del mundo. De ti Antonio, me quedo con tu minucioso trabajo de corrección y tus críticas siempre constructivas desde el profundo tacto y educación que te caracterizan. Hago mía tu frase de *“cada palabra hay que ganársela”*, no sabes las veces que la he empleado (espero que con acierto) y con tu perfeccionismo. Creo que eres un gran profesional y he tenido la suerte de tenerte a mi lado y aprender

muchísimo de ti. Y de Marce, son tantas cosas...Contigo durante estos años en el IFAPA he aprendido prácticamente todo lo que sé sobre peces. Siempre he dicho que eres una persona que hace la vida más fácil a los demás, con un corazón enorme y una bondad increíble. Siempre tienes un momento de tu tiempo para ayudar y enseñar. Los que te conocen saben muy bien de lo que hablo. Me ha encantado realizar mi Tesis contigo. En cada uno de sus ensayos, análisis, interpretaciones de resultados... estás tú detrás. En definitiva, no pude elegir mejor a mis Directores. Gracias infinitas a los dos.

En cuanto al resto de compañeros del IFAPA, todos y cada uno tienen un hueco en mis agradecimientos. No querría dejar de agradecer su colaboración a Bea, Juanma, Jorge y Eloy. Por ser “mis ojos” en los ensayos y preocuparos tanto de los peces. Por vuestra grandísima ayuda en los muestreos, extracciones, mediciones, etc. Por vuestra implicación en el montaje de las pruebas, en este aspecto especialmente a Eloy. Sin vosotros todo habría sido mucho más duro. También agradecer a Toñi su ayuda en el laboratorio para la realización de los análisis. En cuanto a la parte afectiva agradecer a “mis niñas”, Clara, Enma e Inés sus miles de consejos en todos los ámbitos y todos esos momentos juntas, dentro y fuera del Centro. Por estar siempre ahí, Gracias. A Jose Ramón López, por apoyarme tanto y confiar en mí siempre y darme esa fuerza para perseguir lo que quiero. ¡Si supieras lo que me has ayudado...! A todos los que habéis estado de alguna forma a mi lado, Oscar, Javier, Macu, Alicia, Montse, David, Antonio, Paz, Concha, Tato, compañeros de Administración, del resto de laboratorios, de mantenimiento, a las “viejas glorias”, especialmente a Jose Ferrer y a Sandra, a todos, gracias por estar en esta etapa de mi vida tan bonita y porque de alguna manera, de vuestras charlas, de vuestro apoyo, de vuestro tiempo he cogido fuerzas y ganas para seguir.

A mis amigas también desearía dejarles su sitio en estos agradecimientos. Son amigas casi hermanas, que están conmigo desde pequeña y que han sido tantas veces mi consuelo, mi vía de escape en los momentos duros, con las que comparto mis alegrías y mis tristezas. ¡Sois muy grandes! Mi tesoro. Os quiero.

Y por último queda lo más importante en mi vida, mi familia. A mis padres les debo todo lo que soy. Siempre han estado a mi lado, apoyándome en todo, creyendo en mí y haciendo que tuviera confianza en mí misma. Estoy muy orgullosa de ellos y de cómo me han educado. Gracias por todos los esfuerzos que habéis hecho. Mis hermanos han sido el segundo pilar. Son los mejores hermanos que se puede tener. Mariano, Rocío y María. Mis compañeros en la vida desde que nací, con los que he vivido todos y cada uno de los momentos más importantes. Mis padres y ellos han sido un apoyo incondicional. Os quiero muchísimo y os necesito. Y mi marido Rafa y mis tres tesoros Rafa, Jaime y Rocío. Ellos son mi fuerza, el motivo fundamental de mi felicidad y los que me dan aliento para afrontarlo todo. Ellos son los que han sufrido más este capítulo de mi vida, porque he tenido que perderme muchos ratitos con ellos que he dedicado a mi Tesis, pero estoy segura de que sabrán entenderlo y de que sabrán valorar mi esfuerzo. Gracias por vuestro amor. Y en especial a ti, Rafa, por comprender todo lo que esto suponía para mí y respetarlo sin dudar ni un segundo.

A todos deciros que esta Tesis me hace muy feliz. Os la dedico a cada uno de vosotros. Mil gracias de nuevo,

Elena.



*A mi marido Rafa y a mis hijos Rafa, Jaime y Rocío, os quiero.*



## CONTENIDO

|                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN .....                                                                                                                      | 5  |
| ABSTRACT.....                                                                                                                      | 7  |
| I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....                                                                                                       | 11 |
| 1. NECESIDADES DE DIVERSIFICACIÓN DE LA PISCICULTURA MARINA .....                                                                  | 11 |
| 2. BIOLOGÍA DE LA ESPECIE E INTERÉS EN SU ESTUDIO .....                                                                            | 13 |
| 3. EL BIENESTAR ANIMAL.....                                                                                                        | 15 |
| 4. EL ESTRÉS .....                                                                                                                 | 18 |
| 5. LOS RITMOS BIOLÓGICOS, LA ALIMENTACIÓN Y SU INTERÉS EN LA<br>RESPUESTA AL ESTRÉS .....                                          | 25 |
| 6. EL CONCEPTO DE <i>COPING STYLE</i> .....                                                                                        | 28 |
| II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....                                                                                                | 35 |
| III. CAPÍTULOS EXPERIMENTALES .....                                                                                                | 39 |
| CAPÍTULO 1. RESPUESTAS FISIOLÓGICAS AL ESTRÉS EN EL DESARROLLO LARVARIO DE<br>LA ACEDÍA <i>Dicologlossa cuneata</i> (MOREAU) ..... | 41 |
| RESUMEN .....                                                                                                                      | 43 |
| 1.1 INTRODUCCIÓN .....                                                                                                             | 44 |
| 1.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....                                                                                                       | 45 |
| 1.2.1. Cría larvaria.....                                                                                                          | 45 |
| 1.2.2. Muestreos.....                                                                                                              | 47 |
| 1.2.3. Análisis de metabolitos y cortisol .....                                                                                    | 48 |

|                                                                                                                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.2.4. Análisis estadístico.....                                                                                                                                 | 49        |
| 1.3. RESULTADOS.....                                                                                                                                             | 49        |
| 1.4. DISCUSIÓN .....                                                                                                                                             | 52        |
| 1.5. REFERENCIAS .....                                                                                                                                           | 55        |
| <b>CAPÍTULO 2. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS METABÓLICAS RELACIONADAS CON EL ESTRÉS A ALTAS DENSIDADES DE CULTIVO EN LA ACEDÍA (<i>Dicologlossa cuneata</i>) .....</b> | <b>63</b> |
| RESUMEN.....                                                                                                                                                     | 65        |
| 2.1. INTRODUCCIÓN .....                                                                                                                                          | 66        |
| 2.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....                                                                                                                                     | 68        |
| 2.2.1. Condiciones experimentales .....                                                                                                                          | 68        |
| 2.2.2. Metodología de muestreo.....                                                                                                                              | 68        |
| 2.2.3. Análisis plasmático .....                                                                                                                                 | 70        |
| 2.2.4. Evaluación de la actividad enzimática.....                                                                                                                | 71        |
| 2.2.5. Análisis estadístico.....                                                                                                                                 | 72        |
| 2.3. RESULTADOS.....                                                                                                                                             | 73        |
| 2.4. DISCUSIÓN .....                                                                                                                                             | 77        |
| 2.5. REFERENCIAS .....                                                                                                                                           | 81        |
| <b>CAPÍTULO 3. RITMOS DE ACTIVIDAD DIARIA Y RESPUESTA AL ESTRÉS EN LA ACEDÍA (<i>Dicologlossa cuneata</i> MOREAU, 1881).....</b>                                 | <b>89</b> |
| RESUMEN.....                                                                                                                                                     | 91        |
| 3.1. INTRODUCCIÓN .....                                                                                                                                          | 92        |
| 3.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....                                                                                                                                     | 94        |
| 3.2.1. Condiciones experimentales .....                                                                                                                          | 94        |
| 3.2.2. Diseño experimental.....                                                                                                                                  | 94        |
| 3.2.3. Muestreo .....                                                                                                                                            | 96        |

|        |                                                                                        |     |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2.4. | Análisis plasmático .....                                                              | 97  |
| 3.2.5. | Análisis estadístico.....                                                              | 98  |
| 3.3.   | RESULTADOS.....                                                                        | 98  |
| 3.3.1. | Ritmos diarios de alimentación .....                                                   | 98  |
| 3.3.2. | Ritmos diarios de actividad locomotora.....                                            | 100 |
| 3.3.3. | Parámetros biológicos y de alimentación bajo diferentes estrategias alimentarias ..... | 100 |
| 3.3.4. | Cortisol plasmático y metabolitos .....                                                | 102 |
| 3.4.   | DISCUSIÓN .....                                                                        | 104 |
| 3.5.   | REFERENCIAS .....                                                                      | 109 |

#### CAPÍTULO 4. IDENTIFICACIÓN DE *COPING STYLES* Y SU ASOCIACIÓN CON ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO EN ACEDÍAS (*Dicologlossa cuneata*).

..... 113

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| RESUMEN.....                                                    | 115 |
| 4.1. INTRODUCCIÓN .....                                         | 116 |
| 4.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....                                    | 118 |
| 4.2.1. Identificación de <i>coping styles</i> .....             | 118 |
| 4.2.2. Test de adaptación a un nuevo ambiente.....              | 119 |
| 4.2.3. Test del “objeto novedoso” .....                         | 120 |
| 4.2.4. Test de agresividad .....                                | 121 |
| 4.2.5. Test de exposición al aire .....                         | 121 |
| 4.2.6. Análisis de Cortisol.....                                | 122 |
| 4.2.7. Evaluación de las actividades enzimáticas hepáticas..... | 122 |
| 4.2.8. Análisis de datos .....                                  | 123 |
| 4.3. RESULTADOS.....                                            | 124 |
| 4.3.1. Existencia de <i>coping styles</i> .....                 | 124 |

|                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.3.2. Diferencias en el metabolismo energético de los <i>coping styles</i> | 127 |
| 4.4. DISCUSIÓN                                                              | 129 |
| 4.5. REFERENCIAS                                                            | 133 |
| IV. DISCUSIÓN GENERAL                                                       | 143 |
| V. CONCLUSIONES                                                             | 153 |
| VI. BIBLIOGRAFÍA                                                            | 157 |
| VII. ANEXOS                                                                 | 175 |
| ABREVIATURAS                                                                | 175 |
| PALABRAS CLAVE                                                              | 179 |
| ÍNDICE DE FIGURAS                                                           | 181 |
| ÍNDICE DE GRÁFICAS                                                          | 183 |
| ÍNDICE DE TABLAS                                                            | 187 |
| ASPECTOS ÉTICOS                                                             | 189 |
| PRODUCCIÓN CIENTÍFICA                                                       | 191 |
| Publicaciones                                                               | 191 |
| Comunicaciones a Congresos                                                  | 191 |
| Asistencias a Jornadas y Reuniones Científicas                              | 193 |

## RESUMEN

En los últimos años la acuicultura está adquiriendo cada vez más importancia debido a que las poblaciones naturales de especies comerciales se están viendo muy afectadas a causa de la actividad pesquera incontrolada, de la contaminación marina y de otros factores que podrían llevar a la desaparición de determinadas especies. Sin embargo, en España existen solo siete especies que se cultivan íntegramente a escala comercial: lubina, dorada, rodaballo, atún rojo (sólo para “engrase”), corvina, lenguado y anguila. Esto hace que exista una necesidad de diversificar especies cultivadas en el ámbito de la acuicultura marina española, y la acedía (*Dicologlossa cuneata*), por poseer un alto valor comercial y muy buena tasa de crecimiento y fecundidad, se presenta como una firme candidata para la diversificación. Pero para ello es necesario llevar a cabo un intenso proceso de investigación que posibilite el desarrollo zootécnico efectivo de la especie. En este contexto, el Objetivo General de la presente Tesis Doctoral es estudiar y desarrollar nuevos conocimientos acerca de la metodología de cultivo de la acedía, basándose principalmente en las respuestas fisiológicas y de comportamiento al estrés y su relación con las condiciones de cultivo. Así, los diferentes estudios que la conforman pretenden por un lado, evaluar las condiciones de cultivo durante la cría de la acedía profundizando en el conocimiento de dos parámetros tan importantes como la densidad y la alimentación y su fisiología del estrés, y por otro, llevar a cabo un estudio integrado de su fisiología y comportamiento en cautividad, por su importancia para la optimización del cultivo.

Para ello, en primer lugar se estudiaron los efectos de distintas densidades en diferentes fases del cultivo concluyéndose que los altos valores de cortisol detectados desde la fase larvaria de la acedía parecen estar relacionados con las propias condiciones de cautividad y que la alta densidad de cultivo puede ser un agente estresante a partir de los 45 días desde la eclosión (DDE). Además, para este parámetro el cortisol fue un buen indicador de estrés en estudios a corto plazo, no siendo así cuando se trató de un estrés crónico. Para estudios de este tipo se consideraron buenos indicadores de estrés a las enzimas musculares hexokinasa (HK) y

glutamato deshidrogenasa (DH). Los metabolitos plasmáticos no se estimaron buenos marcadores en ninguno de los casos.

En cuanto a los ritmos diarios de la especie (alimentario y locomotor), se caracterizaron por una actividad nocturna. A pesar de ello, y a diferencia de lo observado en otros peces planos, *D. cuneata* presentó cierta actividad natatoria durante el día, pareciendo ser un comportamiento propio de la especie y no derivado de las condiciones de cautividad. Con respecto a la estrategia alimentaria, aunque la acedía fue capaz de activar y usar comederos de autodemanda, este tipo de alimentación no pareció ser lo suficientemente adecuada en términos de crecimiento y bienestar. Fue la alimentación programada nocturna la que se consideró como la más adecuada para la especie, asociándose con los mayores niveles de eficiencia de crecimiento y los niveles más bajos de estrés.

Por último, en base a las respuestas integradas (fisiología y comportamiento) se identificaron diferentes *coping styles* con respuestas comportamentales y fisiológicas específicas: el grupo CS1, definido como peces reactivos, que tardan más tiempo en recuperar el apetito en un nuevo ambiente, con un carácter luchador frente a un estresor (exposición al aire) y altos niveles de cortisol plasmático tras el estresor, y el CS2, compuesto por individuos proactivos, que recuperan más rápido la ingesta de alimento, luchan menos en la red y presentan niveles de cortisol plasmático inferiores tras la exposición al agente estresante. Además, se detectaron diferencias en los niveles de algunas actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo energético como la glucógeno fosforilasa (GPasa), que actúa en la glucógenolisis.

En conclusión, los estudios que se han llevado a cabo a lo largo de esta Tesis doctoral han proporcionado una información muy valiosa para mejorar la metodología de cultivo de la acedía y el bienestar animal, lo que repercutirá de manera positiva en la productividad acuícola y en el mantenimiento de especies amenazadas por la sobreexplotación pesquera.

## ABSTRACT

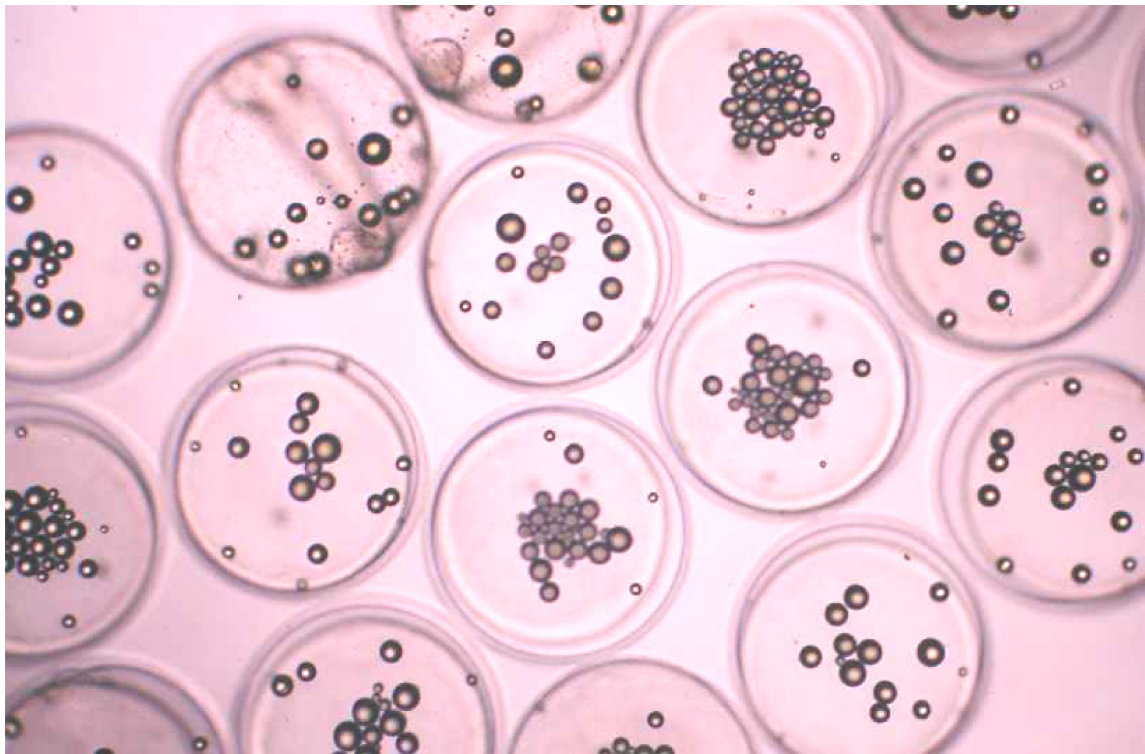
In recent years, aquaculture is gaining an increasing importance because natural populations of commercial species are being strongly threatened by uncontrolled fishing activity, marine pollution and other factors that could lead certain species to disappear. However, in Spain only seven species are grown on a commercial scale: sea bass, sea bream, turbot, red tuna, meagre, Senegalese sole and eel. Thus, it is necessary to diversify the species to be cultivated by the Spanish marine aquaculture, and the wedge sole (*Dicologlossa cuneata*) appears as a convenient candidate due to its high commercial value and its high growth rate and fertility. But for this, it is necessary to carry out a comprehensive research process to reach the effective zootechnical development of the species. In this context, the general aim of this PhD Thesis is to study and develop new knowledge on the culture of the wedge sole, based mainly on the physiological and behavioral responses to stress as related to the culture conditions. Thus, it is composed by different studies that on the one hand, try to evaluate the culture conditions during the breeding of the wedge sole, going deeply into the knowledge of two important parameters, the density and the feeding and its stress physiology and on the other hand, cover an integrated study of its physiology and behavior in captivity, because of its importance for culture optimization.

Firstly, the effects of different densities were studied in diverse phases of the culture, concluding that the high cortisol values detected from the larval phase of *D. cuneata* seem to be related to the captivity conditions and that the high density of culture can be a stressor from 45 days after hatching (DAH). In addition, for this parameter cortisol was a good indicator of stress in short-term studies, but not for chronic stress situations. For this type of studies, muscle enzymes hexokinase (HK) and glutamate dehydrogenase (DH) were considered as good stress indicators. Plasma metabolites were not considered good markers in any of the cases.

According to the daily rhythms of the species (food and locomotor), they were characterized by nocturnal activity. In spite of this and unlike to that observed in other flatfishes, *D. cuneata* showed some swimming activity during the day, seeming to be a behavior of the species and not derived from the captivity conditions. With regard to the feeding strategy, although the wedge sole was able to activate and use self-feeders, this type of strategy did not prove to be proper enough in terms of growth and welfare. By contrast, a nocturnal feeding schedule was associated with the higher levels of growth efficiency and the lower levels of stress; hence, it appears as the most appropriate feeding strategy for the wedge sole.

Finally, based on the integrated responses (physiology and behavior), different coping styles with specific behavioral and physiological responses were identified: the CS1 group, defined as reactive fish, which take longer to recover the appetite in a new environment, with a fighting character against a stressor (exposure to air) and high levels of plasma cortisol after the stressor; and the CS2 group, defined as proactive fish, which recover faster the food intake, fight less in the net and have lower levels of plasma cortisol after exposure to the stressor. Furthermore, differences were detected between them in the levels of some enzymatic activities related to energy metabolism such as the glycogen phosphorylase (GPase), which acts on glycogenolysis.

In conclusion, the studies that have been carried out throughout this PhD thesis have provided valuable information to improve the methodology of the wedge sole culture and animal welfare, which will have a positive impact on the aquaculture productivity and in the maintenance of species threatened by overfishing.



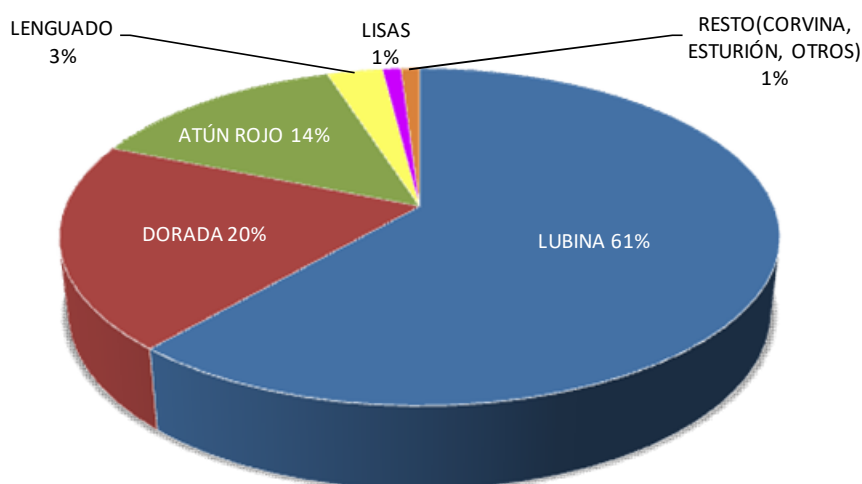
## I. INTRODUCCIÓN GENERAL



## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1. NECESIDADES DE DIVERSIFICACIÓN DE LA PISCICULTURA MARINA

En España se cultivan actualmente siete especies de peces marinos con una producción significativa, superior a las 200 Tm: lubina, dorada, rodaballo, atún rojo (sólo para “engrase”), corvina, lenguado y anguila. En el caso concreto de Andalucía, las especies que superan las 200 Tm se reducen a lubina, dorada, atún rojo y lenguado, ya que el cultivo de rodaballo se lleva a cabo en Galicia y Cantabria, la producción principal de corvina se desarrolla en la Comunidad Valenciana (en Andalucía es tan solo de 23 Tm), y el cultivo de anguila se produce al 100% en la Comunidad Valenciana (MAPAMA, 2015) (Gráfica 1).



**Gráfica 1.** Distribución por especies de la producción de piscicultura marina andaluza. Fuente: MAPAMA 2015.

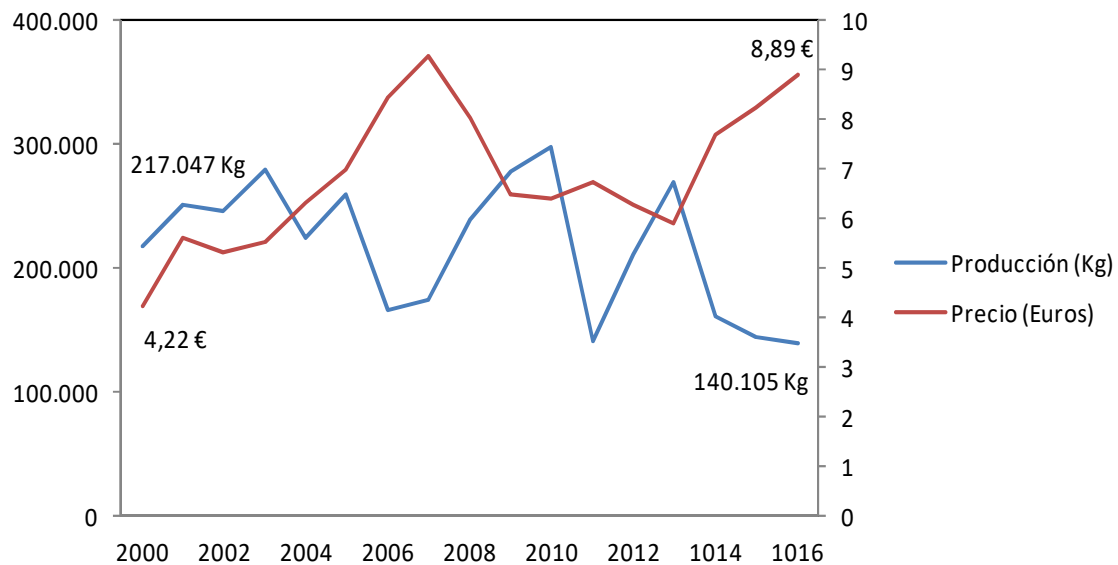
En el Plan Estratégico Plurianual de la Acuicultura Española 2014-2020 (documento que España presenta como país miembro de la Unión Europea de cara al 2020), dentro del Análisis DAFO de la Acuicultura Española, se señala como primera de las debilidades la escasa diversificación de los productos. Esto pone de manifiesto la gran necesidad de diversificación de especies acuícolas en el marco de la acuicultura española y particularmente en la piscicultura andaluza donde el número de especies

cultivadas con producción significativa se reduce con respecto al nacional. Por otro lado, en este mismo documento se describen como una de las fortalezas y como una de las oportunidades la existencia de un elevado potencial tecnológico para la diversificación de especies y productos. Por lo tanto, aunque en este documento se refleja como una de las directrices estratégicas la necesidad de diversificar el número de especies acuícolas, también se detecta el interés que presenta la acuicultura española por que ésta se lleve a cabo.

Esta diversificación en términos de especies supone una ventaja selectiva, pero es al mismo tiempo un arma de doble filo, ya que en una situación como la actual con importantes recortes en I+D+i podría producirse una diversificación en exceso y el esfuerzo investigador no sería suficiente para generar nuevos conocimientos para ser transferidos al sector productivo. Por ello, en la Estrategia Andaluza para el desarrollo de la acuicultura marina se manifiesta que hay que ejercer criterios más restrictivos a la hora de establecer nuevas especies como candidatas para la investigación sobre su cultivo. Estas especies candidatas deben de cumplir una serie de requisitos específicos. Estos son una buena adaptabilidad a la cautividad, un crecimiento rápido en cultivo intensivo, conocer los requisitos biológicos y zootécnicos para desarrollar su cultivo y presentar un alto precio en el mercado y una importante demanda comercial.

La acedía (*Dicologlossa cuneata* Moreau, 1881) es una especie sobre la que se viene investigando desde hace más de una década (Herrera *et al.*, 2008). En el año 2002 se desarrolló por primera vez su cultivo a escala experimental en el Centro IFAPA “Agua del Pino” (Cartaya, Huelva) y desde entonces se han desarrollado y publicado varios trabajos pioneros sobre su biología y cultivo. Se trata de una especie autóctona que se ha adaptado con facilidad al cultivo en condiciones experimentales, que posee un alto valor comercial (8.89 €/kg en primera venta. Año 2016. Fuente: Junta de Andalucía) (Figura 1) y con muy buenas tasas de crecimiento (Herrera *et al.*, 2005; 2006; 2008). Además, es considerada como una de las especies objetivo de las pesquerías demersales del Golfo de Cádiz y la presión pesquera a la que se ve sometida se ha incrementado en los últimos años, lo que ha originado un descenso en las capturas (Sobrino *et al.*, 1994; Vila y Jiménez, 2002; IDAPES, 2016, Junta de

Andalucía). Todas estas cualidades hacen que el estudio de su cultivo se presente interesante y que esta especie se muestre como una firme candidata para la diversificación.



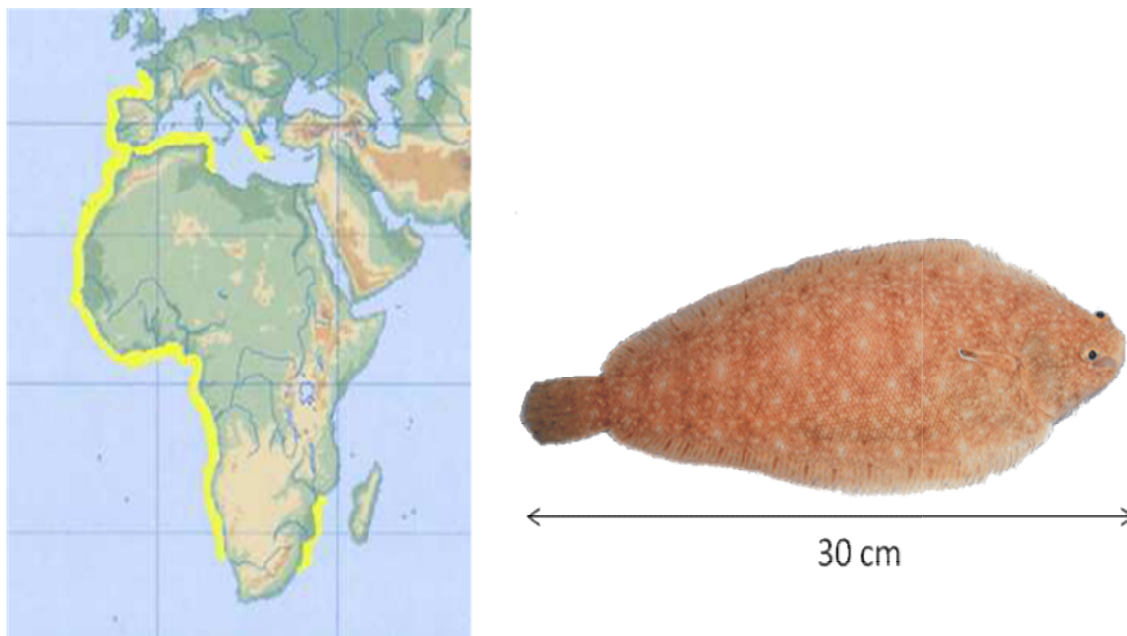
**Figura 1.** Evolución de la producción y del precio de la acedía en Andalucía desde el año 2000 hasta el año 2016. Fuente: IDAPES, 2016, Junta de Andalucía.

Los peces planos han sido tradicionalmente especies de gran interés para las empresas acuícolas de todo el mundo debido a que, en general, son especies de alto valor comercial y con muy buenas tasas de crecimiento. Sin embargo, durante la investigación sobre su cultivo se han encontrado dificultades importantes que afectan a su tecnología de producción (Hachero, 2008). Es por eso que se considera fundamental la investigación relacionada con la optimización de las tecnologías de estos cultivos.

## 2. BIOLOGÍA DE LA ESPECIE E INTERÉS EN SU ESTUDIO

La acedía, *Dicologlossa cuneata* (Moreau, 1881) es un pez plano de la familia de los soleidos que habita fondos arenosos y fangosos a profundidades entre los 10-100 m, pudiendo alcanzar hasta los 400 m en aguas de más de 9°C. Se distribuye desde la Bahía de Vizcaya hasta el Mediterráneo occidental (Bauchot, 1987), en la península

Ibérica. Respecto a África, las mayores poblaciones se localizan en Marruecos, Mauritania, Argelia, Guinea, Angola y África suroriental (Figura 2.A) (Smith, 1961; Sanches, 1966; Durand, 1967; Blache et al., 1970; Collignon, 1971; Marinaro et al., 1979; Heemstra y Gon, 1986; Lloris, 1986; Quéro et al., 1986).



**Figura 2. A.** Distribución de *D. cuneata*. **B.** Ejemplar de la especie.

En España es conocida en todo el litoral andaluz como acedía, aunque en el litoral surmediterráneo también recibe el nombre de lenguaíco. La acedía tiene el cuerpo oval y alargado, con los ojos situados en el lado derecho (el superior próximo al perfil dorsal). La boca se sitúa en posición ínfera y está muy arqueada. La línea lateral presenta la rama supratemporal formando una S por encima de los ojos, transcurriendo posteriormente en línea recta hasta el pedúnculo caudal. La aleta dorsal comienza por delante del borde anterior del ojo superior. La aleta anal comienza a la altura de la aleta pectoral. La aleta caudal se encuentra unida a las aletas dorsal y anal mediante una membrana poco desarrollada. En la cara ocular, la aleta pectoral (con una mancha oscura en el centro) es ligeramente mayor que en la cara ciega. El color de la cara ocular es marrón-grisáceo oscuro y la cara ciega es blanquecina. La talla máxima que alcanza es de 30 cm de longitud (Figura 2.B).

En cautividad, la acedía tiene un comportamiento diferente al de otros peces planos, ya que mientras que la mayoría de ellos tienden a permanecer en el fondo del tanque y sólo nadan activamente para alimentarse, esta especie nada a través de la columna de agua como un pez pelágico (Herrera, 2008). Aún se desconoce el origen de este comportamiento, pudiendo ser intrínseco de la especie o deberse a las condiciones de cautividad. Sin embargo, es probable que pudiera estar relacionado con los altos valores de indicadores de estrés (por ejemplo el cortisol) que la acedía presenta ya que, según está descrito, son los más altos detectados en el orden Pleuronectiformes (Barnett y Pankhurst, 1998; Arjona et al., 2007; Ribas et al., 2007; Costas et al., 2008). Por otra parte, estudios preliminares sobre el cultivo de esta especie indican una alta tasa de mortalidad en cautividad que podría estar de nuevo vinculada a estos valores elevados de indicadores de estrés (Herrera et al., 2008). Por todo ello, se considera de gran importancia investigar sobre la fisiología del estrés de esta especie para así determinar si una variación en las condiciones de cultivo produciría una reducción del estrés y un aumento en la supervivencia.

Hasta el momento se han llevado a cabo algunos estudios sobre cómo afectan diferentes condiciones de cultivo, como la osmolaridad y la densidad de cultivo en juveniles (Herrera et al., 2009a,b), a la fisiología del estrés en esta especie. Pero aún queda un largo camino hasta llegar a que su cultivo sea exitoso. Para ello habrá que seguir profundizando en éstos y otros factores, tal y como persigue esta Tesis, como son la fisiología del estrés relacionada con la alimentación y la densidad de cultivo en diferentes fases y la respuestas al estrés frente a agentes estresantes mediante la integración de la fisiología y del comportamiento.

### **3. EL BIENESTAR ANIMAL**

El bienestar de los animales alcanzó un gran interés a principios del siglo XIX cuando se presentó en el Parlamento británico un proyecto de ley que ofrecía protección de la crueldad a los bovinos, caballos y ovejas, dando posteriormente lugar a la fundación de la primera organización por el bienestar animal. Sin embargo, es en

los últimos 30 años cuando se ha dado un verdadero impulso a esta inquietud. A día de hoy la forma de pensar ha evolucionado y el respeto y cuidado hacia los animales ya ocupa una posición relevante en la escala de valores de la sociedad actual. Los avances tecnológicos y científicos han apoyado esta nueva corriente ya que se ha demostrado que el dolor y el sufrimiento no son exclusivos de los humanos (Branson, 2008).

La definición de bienestar animal es algo ambigua y difícil de valorar y de definir desde el punto de vista científico, ya que es un concepto que depende de multitud de factores de diferente naturaleza y está abierto a muchas interpretaciones. Este concepto incluye tres elementos: el funcionamiento adecuado del organismo (salud física), el estado emocional del animal y el comportamiento propio de la especie (Manteca et al., 2012). Aun así, no todas las conductas reciben la misma importancia a la hora de valorar el bienestar de un animal. En base a estos tres principios existen numerosas definiciones en la bibliografía. Así, por ejemplo, la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE, 2008) considera que un animal se encuentra en un estado satisfactorio de bienestar cuando está sano, confortable y bien alimentado, puede expresar su comportamiento innato, y no sufre dolor, miedo o estrés. Otra definición de bienestar animal es la descrita por Huhges (1976) como el estado de completa salud mental y física, donde el animal está en perfecta armonía con el ambiente que le rodea. El Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), en su manual de Bienestar Animal en el Transporte (Arrebola et al., 2013), se refiere a él como el estado del animal que se encuentra en armonía con el medio, que tiene salud física y mental, y cubiertas sus necesidades específicas. El bienestar es dinámico, cambiante y depende de las condiciones de cada individuo y de la relación del animal con el entorno.

Existen por tanto una gran cantidad de definiciones de este concepto y basándose en todas ellas se podría considerar que un animal en cautividad goza de bienestar si cumple una de estas tres condiciones: 1) el animal puede adaptarse a su medio y tiene buena salud, con todos sus sistemas biológicos funcionando adecuadamente; 2) el animal es capaz de llevar una vida normal, desarrollando los mismos patrones de comportamiento que en la naturaleza y es capaz de detectar sus

necesidades; 3) el animal está libre de experiencias negativas tales como dolor, hambre y miedo y tiene acceso a experiencias positivas, tales como interacciones sociales.

De una manera más sintetizada, un método cada vez más aceptado para definir el bienestar animal está basado en las denominadas “cinco libertades”, propuestas por el Consejo para el Bienestar de los Animales de Granja del Reino Unido en 1.992, usando las recomendaciones de una investigación conocida como el Comité Brambell, llevada a cabo en 1.965. Según éstas, para garantizar el bienestar, los animales deben estar libres de: 1) hambre y sed; 2) condiciones ambientales desfavorables; 3) enfermedades y heridas; 4) restricciones en cuanto al comportamiento (incluido escasez de espacio); y 5) sufrimiento psicológico.

La preocupación por el bienestar de los animales aparece en gran parte como consecuencia de que los animales pueden experimentar emociones, entre ellas el sufrimiento (Sneddon et al., 2014). Dicha capacidad requiere un cierto desarrollo del sistema nervioso, por lo que no está necesariamente presente en todos los animales. Aunque a día de hoy aún existe cierta controversia sobre este punto, la mayoría de autores consideran que todos los vertebrados (mamíferos, aves, peces, reptiles y anfibios) tienen un sistema nervioso central lo suficientemente desarrollado como para experimentar dolor y otras formas de sufrimiento. Con respecto a los invertebrados, tan solo se considera al sistema nervioso de los cefalópodos como lo suficientemente desarrollado como para poseer la capacidad de sufrir (Mather, 2011). No obstante, esto no significa que en un futuro próximo se puedan añadir otros grupos de invertebrados a la lista de animales con dicha capacidad.

Otro aspecto muy importante a tener en cuenta es que la legislación existente sobre bienestar de animales en producción y/o experimentación se ha incrementado y es cada vez más exigente, como consecuencia de la creciente sensibilidad hacia evitar el sufrimiento de los animales en las explotaciones ganaderas y avícolas y los centros de investigación. Además, el creciente interés por la piscicultura y la consecuente proliferación de explotaciones han originado que los textos legales sobre la materia de

bienestar en peces comienzan a tener relevancia (Recomendación del Consejo Europeo en 2008 sobre el bienestar de peces cultivados, y los principios rectores para el bienestar en peces adoptados por la OIE en 2008). Desde un punto de vista práctico, las consecuencias de aplicar esta legislación supondrían una mejora de la producción ya que el animal se encontraría en buenas condiciones de cultivo, con un buen estado de salud y mental, se desarrollarían menos patologías y la tasa de crecimiento y reproducción serían mayores. Por ello, a medio-largo plazo aplicar la legislación sobre bienestar animal en el proceso productivo sería del todo beneficioso tanto para el animal como para el productor.

#### **4. EL ESTRÉS**

Estrés y bienestar son términos opuestos, ya que el primero es la manifestación evidente de un pésimo bienestar. El estrés se puede definir como la situación en la cual el equilibrio homeostático de un organismo es modificado como consecuencia de la acción de un estímulo (intrínseco o extrínseco), denominado agente estresante (Tort et al., 1998). El animal responde mediante una serie de reacciones de comportamiento y/o fisiológicas con objeto de compensar y/o adaptarse a la nueva situación (Øverli et al., 2001, 2004a; Barandica, 2010). El equilibrio homeostático u homeostasis se refiere al ajuste continuo mediante mecanismos de autorregulación del organismo (fisiológicos, endocrinos e inmunológicos) que permiten hacer frente a los cambios físicos, químicos y biológicos (Flik et al., 2006).

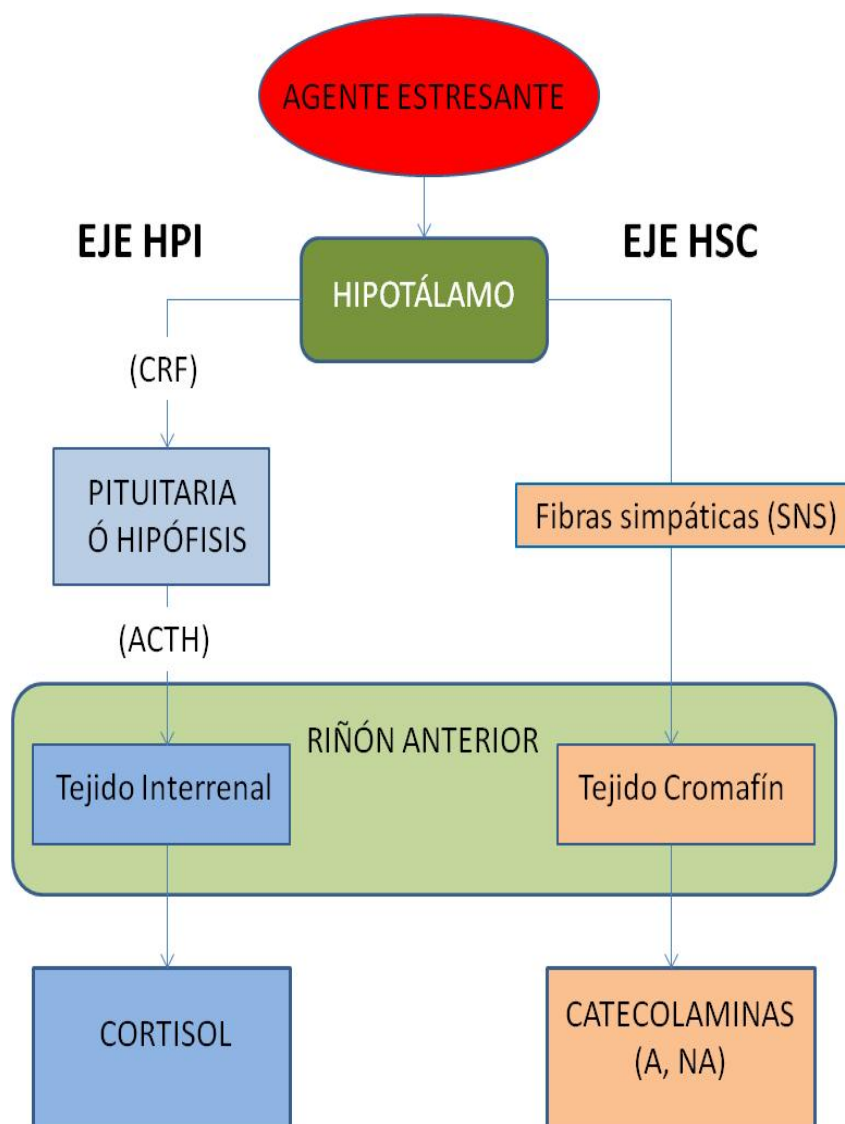
El estudio del estrés en piscicultura posee una gran relevancia ya que proporciona información crucial sobre el bienestar en peces, aspecto cada vez más considerado tanto a nivel legal como ético/social en actividades productivas y de investigación. Esto se debe a la relación que existe entre las situaciones de estrés y el debilitamiento de las defensas por un mal funcionamiento del sistema inmunitario y la inhibición del apetito, suponiendo el estrés por tanto una de las principales causas de mortalidad de los peces de piscifactoría (Tort, 2011; Vargas- Chacoff et al., 2014a,b).

En la práctica acuícola, los procesos de cultivo tienden a minimizar las situaciones de estrés existentes con el objetivo de que el animal se adapte a estas condiciones de cautividad y permitan un correcto crecimiento y reproducción de la especie y un buen funcionamiento del sistema inmune. Los principales agentes estresantes a los que se enfrentan las especies en cultivo son múltiples y de variado origen: calidad del agua de cultivo, densidad, alimentación inadecuada, manejo (muestreo y transporte), fotoperíodo, termoperíodo, etc. En la acuicultura es prioritario conseguir eliminar y/o minimizar cualquier fuente de estrés para el animal cultivado.

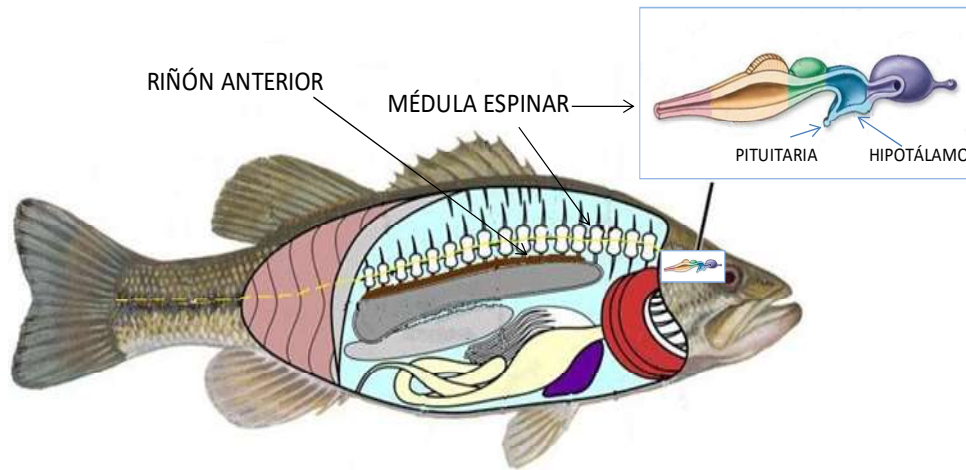
En vertebrados superiores (mamíferos) existen dos ejes o conjunto de sistemas orgánicos interrelacionados, implicados en la respuesta a las situaciones de estrés. El primero de ellos es el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (eje HPA) y el segundo se denomina eje hipotálamo-simpático-cromafín (eje HSC) (Figura 3). En mamíferos, la glándula adrenal está formada por dos tejidos diferentes: la médula, compuesta principalmente por el tejido cromafín, responsable de la síntesis de las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), y la corteza, donde se encuentra el tejido esteroideogénico que sintetiza las hormonas esteroideas (cortisol, corticosterona y aldosterona) (Reid et al., 1998). En teleósteos, a diferencia de los mamíferos, las células cromafines no se localizan de manera compacta en la médula adrenal, sino que se encuentran aisladas o formando pequeñas agrupaciones en el riñón cefálico. Sucede lo mismo con el tejido esteroideogénico, que en este caso tampoco se encuentra como una masa densa, sino en capas, cordones o grupos aislados a lo largo de la vena cardinal y el riñón cefálico, denominándose tejido interrenal (Milano et al., 1997) (Figura 4). Es por ello que en los peces el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) se denomina hipotálamo-pituitaria-interrenal (HPI). La hormona esteroidea más importante que segrega el tejido interrenal es el cortisol.

Los agentes estresantes producen modificaciones en el estado homeostático del animal. Estos cambios son inicialmente percibidos por sensores en el hipotálamo donde se estimulan los dos grandes ejes reguladores: HSC y HPI (Weyts et al., 1999). En el eje HSC, la estimulación del hipotálamo produce una rápida activación del sistema

nervioso simpático, cuyas neuronas inervan el tejido cromafín a través de receptores colinérgicos (Reid et al., 1996). Éstos estimulan a las células cromafines responsables de la síntesis y liberación de catecolaminas (adrenalina, noradrenalina) a la sangre en una situación de estrés. En paralelo, aunque de forma más lenta, se produce la activación del eje HPI. En dicha activación, está implicada la hormona o factor liberador de corticotropina (CRF), que actúa sobre la hipófisis estimulando la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) a la circulación. La ACTH actúa sobre el tejido interrenal, estimulando la liberación de cortisol al torrente sanguíneo.



**Figura 3.** Sistema de Estrés en peces teleósteos. Eje Hipotálamo-Pituitaria-Interrenal (HPI) y Eje Hipotálamo-Simpático-Cromafín (HSC). CRF: factor liberador de corticotropina; ACTH: hormona adrenocorticotropa; A: adrenalina; NA: noradrenalina.



**Figura 4.** Esquema de anatomía interna de pez teleosteo con los principales órganos de los ejes de estrés (HPI y HSC). Adaptación de Barandica (2010).

Cuando el organismo se enfrenta a una situación de estrés, éste produce diferentes respuestas destinadas a mantener la homeostasis. En este proceso en el que intervienen los dos ejes de estrés, que fue definido por Hans Selye (1950) como el Síndrome de adaptación general (GAS), tienen lugar tres fases diferentes (Tabla 1) que según la duración del agente estresante se denominan: reacción de alarma inicial, fase de resistencia y fase de agotamiento (Cannon, 1929; Roberts, 1981; Maule et al., 1989).

En la acuicultura, se distinguen principalmente dos tipos de estrés: el estrés agudo, causado principalmente por agentes estresantes de corta duración en el tiempo como el manejo de los peces, las biometrías y el transporte, y por otro lado el estrés crónico, causado por agentes persistentes y de larga duración, como pueden ser las altas densidades de cultivo, la variación en la calidad del agua, una dieta inadecuada, la exposición a nuevos ambientes, la dominancia social de los peces o la exposición a ciertas enfermedades.

Desde un punto de vista fisiológico, una activación puntual del sistema de estrés es beneficiosa para el animal ya que le permite recuperar la homeostasis de su medio interno alterada por un agente estresante. Sin embargo, si la situación de estrés

se convierte en crónica, la respuesta al estrés puede perder su valor adaptativo y originar problemas al animal en procesos tales como los de crecimiento, reproductivos, osmorreguladores e inmunitarios que se reflejarían a nivel de organismo, población y comunidad (Mancera y Martín, 2002).

|                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>1. Reacción de Alarma Inicial</b></p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Primera reacción del animal, en la que intenta huir o enfrentarse al peligro.</li> <li>- Se activa el eje HSC, liberándose adrenalina y noradrenalina. Estas sustancias activan un amplio rango de funciones metabólicas: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Activación motora, ritmo cardíaco, flujo sanguíneo hacia los órganos más activos (corazón, cerebro, músculo esquelético).</li> <li>- Flujo sanguíneo hacia las branquias y estímulo de la capacitación/transporte de oxígeno.</li> <li>- Aumento de la tasa metabólica basal e intermedia. Aumenta la glucosa plasmática por glucógenolisis, lipólisis y glucogénesis.</li> </ul> </li> </ul> |
| <p><b>2. Fase de Resistencia</b></p>        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Continúa la situación de estrés y el animal intenta establecer el equilibrio. Los niveles de catecolaminas vuelven a los valores normales. Se activa el eje HPI, por lo que se libera cortisol.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <p><b>3. Fase de Agotamiento</b></p>        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- La situación de estrés se mantiene en el organismo. Se activa el metabolismo para enfrentar esta situación. Este hecho, junto con los altos niveles de cortisol en sangre mantenidos durante un largo período interfieren con otros procesos fisiológicos del animal (crecimiento, reproducción, sistema inmune,...) pudiendo llegar a ser una situación letal para él.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                               |

**Tabla 1.** Síndrome de Adaptación General (GAS) o Ley de Selye. Adaptado de Barandica (2010).

Fisiológicamente, existen tres tipos de respuesta al estrés que dan origen a tres tipos y fases de estrés (Mommensen et al., 1999; Iwama et al., 2006; Vargas- Chacoff et al., 2011; Herrera et al., 2012b):

a) Estrés primario/respuesta primaria. Ocurre inmediatamente tras la exposición al agente estresante. Consiste en la liberación de hormonas al torrente sanguíneo, catecolaminas y cortisol, principalmente.

b) Estrés secundario/respuesta secundaria. Dichas hormonas inducen cambios metabólicos orientados a recuperar la homeostasis o el estado inicial produciéndose un aumento de la concentración de metabolitos en sangre (glucosa, lactato, proteínas, triglicéridos).

c) Estrés terciario/respuesta terciaria. Si la situación de estrés se mantiene, se originan fallos fisiológicos generales (reversibles e irreversibles) a nivel individual y poblacional, pudiendo ocasionar finalmente la muerte de los individuos.

A nivel fisiológico, el indicador de estrés más aceptado es el cortisol. En peces, éste puede medirse en (revisado en Branson, 2008):

a) Plasma sanguíneo. Aún siendo invasiva, es la técnica más habitual, con protocolos bien definidos. No requiere el sacrificio de los peces para la obtención de las muestras. Sin embargo, sólo es posible con peces de un tamaño mínimo apropiado para la extracción de sangre (en Salas-Leiton et al., 2008).

b) Cuerpo completo. Se usa para larvas y pequeños peces a los que no es posible extraerles sangre. En este caso si es necesario sacrificar a los animales (en *Dicologlossa cuneata*, Herrera et al., 2016).

c) Heces. Es relativamente reciente en peces. Se miden glucocorticoides (entre ellos el cortisol) y metabolitos excretados en las heces tras su metabolismo. No precisa de un manejo intenso de los peces, sin embargo, hasta la fecha no se dispone de mucha información sobre esa metodología en comparación con las clásicas

(anteriores) (en *Cyprinus carpio*, Lupica et al., 2010, y en *Sparus aurata*, Herrera et al., 2016).

d) Agua de cultivo. Este método es el que supone menor estrés. Consiste en analizar el agua de cultivo del tanque de los peces, que contiene cortisol proveniente de la orina y las heces. Es un método laborioso porque supone el filtrado de volúmenes de agua considerables. Además, la metodología existente aún no está muy desarrollada (en *Salmo salar*, Kittilsen et al., 2009).

Otros indicadores fisiológicos de estrés son las catecolaminas (Kulkarni y Pruthviraj, 2017). Estas hormonas son liberadas rápidamente al torrente sanguíneo tras la exposición al estrés. Sin embargo, el uso de cortisol como marcador de estrés está mucho más extendido que el uso de las catecolaminas, ya que éstas últimas se liberan de forma tan rápida que es complicado medir los valores basales en peces no estresados.

El estrés origina cambios metabólicos importantes, sobre todo a nivel energético, ya que los individuos consumen sus reservas de energía para recuperar su estado inicial. Por tanto, otros indicadores relacionados con el estrés cuyas metodologías de análisis están plenamente desarrolladas también pueden ser las concentraciones plasmáticas de glucosa y lactato (respuesta secundaria al estrés) (Iwama et al. 2006), las concentraciones de sustratos energéticos en tejido (principalmente hígado) (en *Dicologlossa cuneata*, Herrera et al., 2009a,b), el consumo de oxígeno (Wendelaar Bonga, 1997), las actividades de enzimas del metabolismo intermedio (en *Dicologlossa cuneata*, Herrera et al., 2015), e incluso parámetros inmunológicos (Tort et al., 2005), ya que los peces estresados (carentes de bienestar) son más propensos a patologías.

Desde el punto de vista etológico, un método ampliamente utilizado para medir el estrés es el de evaluar el patrón de comportamiento del animal. Sin embargo, es muy difícil determinar un comportamiento en los peces de cultivo que sea indicativo de estrés ya que los hábitos de conducta de éstos varían enormemente en función de la especie y las condiciones ambientales, además de que en la práctica son

complicados de detectar y evaluar. Aún así, aunque existen variables cuantificables que podrían estar relacionadas con el estrés, sólo un análisis integrado de todas ellas y específico para las condiciones ambientales y la especie, podrían proporcionar una evaluación eficaz del estrés a nivel de comportamiento. Algunas de esas variables pueden ser: la frecuencia y rapidez de captura del alimento o presa, la respuesta motora a estímulos físicos o depredadores, los tipos de interacciones sociales y la actividad natatoria (Martins et al., 2012).

Los diferentes estresores que someten a los peces en acuicultura a situaciones de estrés y sus repuestas fisiológicas han sido analizados en numerosos estudios. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estas respuestas son muy variables y flexibles en los peces, en consonancia con la gran diversidad de adaptaciones que permiten a los animales vivir en una gran pluralidad de hábitats acuáticos (Wendelaar Bonga, 1997). Los efectos de la salinidad del agua y la densidad de cultivo, dos factores clave en la acuicultura, han sido estudiados en diferentes especies. En el pargo *Pagrus pagrus*, las diferentes densidades y salinidades a las que fueron sometidos los peces no afectaron en gran medida a su sistema de estrés, presentando únicamente pequeñas variaciones en los indicadores de estrés primarios y secundarios a nivel plasmático, hepático y muscular (Vargas-Chacoff et al., 2011). Sin embargo, los estudios sobre diferentes condiciones de densidad en lenguado *Solea senegalensis* (Salas-Leiton et al., 2008), mostraron que a altas densidades de cultivo los peces presentaban un mayor consumo de oxígeno e ingerían mayor cantidad de comida. Así mismo, en acedía, las densidades extremas y las altas salinidades ambientales provocaron un estrés a los animales que, en el caso de la salinidad, se asoció con un elevado coste energético (Herrera et al., 2009a,b).

## 5. LOS RITMOS BIOLÓGICOS, LA ALIMENTACIÓN Y SU INTERÉS EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS

La incorrecta alimentación de una especie se considera un agente estresante y puede tener como consecuencia un mal desarrollo de sus sistemas digestivo e

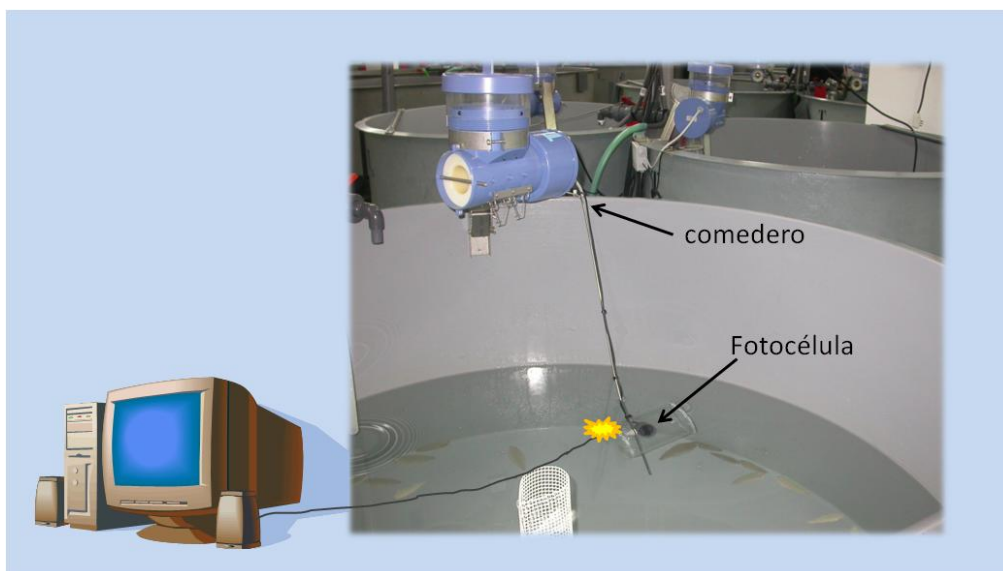
inmunitario, que pueden producir un inadecuado crecimiento y la aparición de patologías. Para lograr una óptima alimentación, es preciso conocer y respetar los ritmos biológicos de los animales, donde están más activos y con necesidad de alimentarse.

Los ritmos circadianos son ritmos biológicos cuyo período es cercano a las 24 h, y son sincronizados principalmente por los ciclos diarios de luz y oscuridad (sincronizadores ambientales), mediante relojes biológicos endógenos o marcapasos circadianos desarrollados por los animales. Estos últimos les permiten anticipar los cambios cíclicos ambientales (como por ejemplo el fotoperíodo) y adaptar su fisiología a ellos. La actividad alimentaria y la actividad locomotora forman parte de los denominados ritmos biológicos. El inicio y fin de cada una de estas actividades está controlado por el marcapasos circadiano propio de cada animal, que en la mayoría de los peces es la glándula pineal. En función de la fase del fotoperíodo en que el animal se encuentre activo, éstos se clasifican en: nocturnos, diurnos ó crepusculares. Determinadas especies pueden mostrar dos tipos de comportamiento, en ese caso se denomina comportamiento dual (Herrero, 2007). Lo poseen aquellos animales que tienen la capacidad de cambiar sus patrones de alimentación diurna a nocturna o viceversa durante su ciclo de vida (Madrid et al., 2001; Reebbs, 2002). Existe una gran variabilidad de patrones circadianos entre especies de peces y su sistema circadiano es mucho más flexible que el de vertebrados superiores (Oishi, 1991). La flexibilidad en las fases y cierto grado de independencia entre actividad locomotora y alimentaria puede ser vista como una respuesta adaptativa del sistema circadiano de los peces (Sánchez-Vázquez et al., 1996). Sin embargo, a pesar de esta plasticidad, la alteración de los correspondientes patrones de actividad tiene implicaciones en el crecimiento, en la eficiencia alimentaria, en la reproducción y probablemente en el sistema inmune de los peces (Herrero, 2007).

Para conocer el momento idóneo en el que una especie debe ser alimentada en cautividad, es necesario estudiar su actividad alimentaria diaria. Para ello se utilizan comederos de autodemanda, ya que el pez los activa en función de sus necesidades de alimentación, quedando las demandas registradas y mostrando así su comportamiento

alimentario (Navarro et al., 2009) (Figura 5). En la práctica acuícola, en muchos casos estas pautas alimentarias no son respetadas y como consecuencia se genera en la especie en cultivo una situación de estrés que produce a medio/largo plazo mermas en su crecimiento y capacidad reproductiva y un mal desarrollo de su sistema inmunitario.

Por otra parte, otro de los factores que habría que determinar es el tipo de estrategia alimentaria, programada o autodemanda, más adecuada para la especie en estudio, ya que se ha descrito que las diferentes estrategias de alimentación (programada vs. al azar) y el momento del día en el que se dispensa la comida afectan a la fisiología de los peces y están íntimamente relacionados con su bienestar (Vera et al., 2006; Kitagawa et al., 2015).



**Figura 5.** Método para el estudio de la actividad alimentaria en peces a través del uso de comederos de autodemanda y fotocélula infrarroja. Las activaciones de la fotocélula por parte de los peces son recogidas en un ordenador.

Desde los años 50 se vienen realizando numerosos estudios sobre el comportamiento alimentario y crecimiento de peces alimentados mediante comederos de autodemanda (Haralson y Bittermn, 1950). También se han llevado a cabo ensayos en los que se comparan diferentes estrategias de alimentación en especies como el salmón *Salmo salar* (Paspatis y Boujard, 1996), la lubina *Dicentrarchus labrax* (Boujard et al., 1996; Azzaydi et al., 1998), la dorada *Sparus aurata* (Velázquez et al., 2006) y la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Valente et al.,

2001), pero hasta el momento, no se ha realizado ningún estudio de este tipo en acedías. Una mejor comprensión de la relación entre los patrones de alimentación y la fisiología del estrés podría reducir el estrés de esta especie en cultivo y, por consiguiente, aumentar su tasa de supervivencia.

## 6. EL CONCEPTO DE *COPING STYLE*

Las prácticas acuícolas en los centros de producción someten a los peces a continuas situaciones de estrés. Estas situaciones pueden comprender un corto período de tiempo (manejo, transporte, muestreos, labores de limpieza, etc.) generando a los animales un estrés agudo, o pueden prolongarse en el tiempo (altas densidades de cultivo, shock osmótico, shock térmico, alimentación inadecuada, etc.) llegando a producir en este caso un estrés crónico. Sin embargo, cada individuo responde de una manera diferente a un mismo agente estresante, tanto a nivel fisiológico como a nivel comportamental, pudiéndose diferenciar así en cuanto a la capacidad de enfrentarse a estos estímulos externos (estresores). Existen determinados factores que influyen sobre esta capacidad, como pueden ser el genotipo, la fase del desarrollo del animal, el entorno, las relaciones sociales, etc. (Koolhaas et al., 1999).

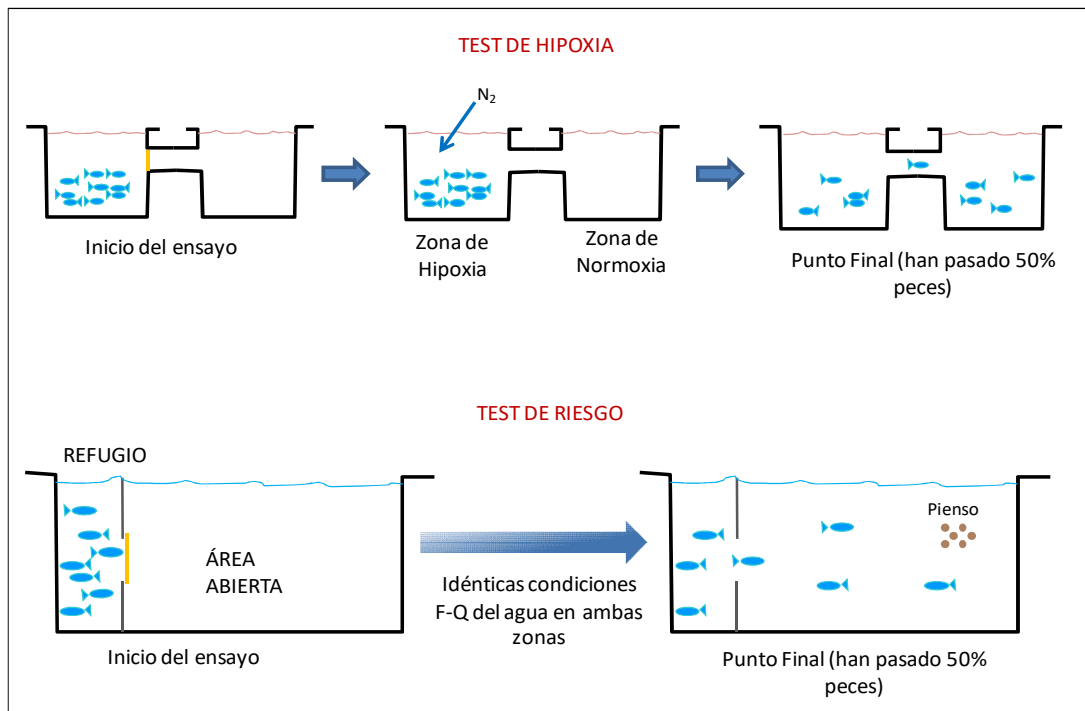
Estas distintas formas de enfrentarse al estrés, denominadas en la bibliografía como personalidades, temperamentos o *coping styles*, se definen como “un conjunto coherente de respuestas fisiológicas y comportamentales al estrés, que es consistente en el tiempo y característico de ciertos grupos de individuos” (Koolhaas et al., 1999). En los peces, como en el resto de vertebrados, se distinguen dos grupos extremos con respuestas fisiológicas y comportamentales muy diferentes entre sí: animales reactivos y animales proactivos. En general, los animales reactivos responden al peligro y a los estímulos negativos de forma más pasiva, tienden a ser poco agresivos y subordinados y suelen sufrir más los efectos del estrés. Además, sus pautas de comportamiento suelen ser flexibles. Por el contrario, los animales proactivos suelen responder de forma activa a las amenazas, suelen ser más agresivos y dominantes y resisten mejor el

estrés. Asimismo, son más propensos a desarrollar rutinas de comportamiento (Øverli et al., 2004a, 2005; Brelin et al., 2005; Frost et al., 2007; Silva et al., 2010; Castanheira et al., 2013a).

Existen numerosos tests para caracterizar *coping styles* en peces, adaptados de tests usados en animales de granja. Estos tests consisten en enfrentar a los peces a distintas situaciones y observar cambios comportamentales y/o fisiológicos. Entre ellos, algunos de los más utilizados en la bibliografía han sido: test de adaptación a un nuevo ambiente, donde se determina la motivación del pez a alimentarse tras ser trasladado a un nuevo entorno (Brelin et al., 2005); test del objeto novedoso, en cuyo caso se analizan las respuestas del individuo frente a la presencia de un nuevo objeto introducido en el tanque (Martins et al., 2011a); test de agresividad o del “intruso”, parecido al anterior, pero en este caso se introduce en el tanque un espécimen menor que el residente y se observan los intentos de ataque al “intruso” (Castanheira et al., 2013b); test de confinamiento o exposición al aire, donde se expone al pez en una red fuera del agua un tiempo determinado y se analizan los intentos de escape de la red por parte del pez (Silva et al., 2010). Las pruebas fisiológicas se basan en las mediciones de indicadores relacionados con el estrés, tras someter a los peces a situaciones estresantes.

Hasta la fecha, la mayoría de los tests utilizados para la caracterización de *coping style* han sido tests individuales. En la práctica, para los centros de producción y/o experimentación acuícola eso supone la realización de miles de pruebas para la identificación de los individuos. Además, este tipo de tests pueden provocar estrés a especies sociales. Por ello, algunos autores han realizado estudios empleando tests grupales en los que se han obtenido buenos resultados. Algunos ejemplos de estas pruebas son el test de hipoxia (Laursen et al., 2011; Castanheira et al., 2013b), que se basa en contabilizar los peces que se desplazan desde una zona en la que se ha disminuido el nivel de oxígeno (zona de hipoxia), hasta otra donde el nivel de oxígeno es el adecuado (zona de normoxia); y el test de riesgo, que consiste en detectar qué peces son los que se enfrentan a una situación de riesgo como un espacio abierto y cuáles los que la evitan (Castanheira et al., 2013a, Herrera et al., 2014). Ambos tests se

dan por concluidos cuando han pasado a la segunda zona el 50% de los individuos (Figura 6).



**Figura 6.** Tests grupales de Hipoxia y de Riesgo utilizados para la evaluación de *coping styles* en peces.

En base a los estudios realizados para la clasificación de *coping styles*, los individuos proactivos se caracterizaron a nivel comportamental por tener la capacidad de escapar con mayor actividad de un estresor, como en el caso de la trucha *Salmo trutta* (Brelín et al., 2005) que frente a una situación de hipoxia presentaron un mayor número de intentos de escape, o el lenguado *Solea senegalensis* (Silva et al., 2010; Martins et al. 2011c) donde emplearon más tiempo escapando de una red fuera del agua. En cuanto a la motivación a alimentarse en un nuevo ambiente, en la literatura los resultados son contradictorios: mientras que para unas especies los proactivos presentaron una alta recuperación del apetito en un entorno novedoso como sucedió con el lenguado *Solea senegalensis* (Silva et al., 2010; Martins et al., 2011c), para otras como la dorada *Sparus aurata* (Castanheira et al., 2013b) y la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Øverli et al., 2006a) se observó una baja capacidad de adaptación. También se identificaron como *coping styles* proactivos aquellos con un alto nivel de riesgo y exploración al exponerse a una situación novedosa y una alta

agresividad frente a un coespecífico de menor tamaño (“intruso”), como fue el caso de la dorada *Sparus aurata* (Castanheira et al., 2013a,b; Herrera et al., 2014), ya que fueron los que se adentraron antes en una zona de riesgo y mostraron mayor número de intentos de ataque al “intruso”. A nivel fisiológico y neuroendocrino estos individuos se caracterizaron por poseer una baja reactividad del eje HPI, presentando bajos niveles de cortisol plasmático tras ser expuestos a un agente estresor, [dorada *Sparus aurata*, (Castanheira et al., 2013a) y tucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* (Øverli et al., 2006b)], y por un alto consumo de oxígeno durante una situación estresante [lenguado *Solea senegalensis* (Martins et al., 2011c) y dorada *Sparus aurata* (Herrera et al., 2014)].

Existe una importante carencia de información en la bibliografía relacionada con la caracterización de *coping styles* en cuanto a la consistencia de las diferencias individuales. Aunque para la identificación de los *coping styles* en peces, la consistencia a través del tiempo y en diferentes situaciones es un factor clave, esto no excluye la posibilidad de que los individuos cambien su *coping style* a través del tiempo y del contexto (Castanheira et al., 2017). Esto es debido a que los animales pueden poseer cierta plasticidad que les permite adaptar su comportamiento frente a entornos nuevos o cambiantes y así, individuos que inicialmente presentaban un comportamiento pueden variarlo cuando las condiciones (ambientales, sociales, etc.) cambian (Frost et al., 2007; Basic et al., 2012). De hecho, se ha confirmado que el contexto social es un importante modulador del *coping style* para algunas especies como la trucha (Frost et al., 2007). Aunque recientemente se ha demostrado que existen mecanismos neurobiológicos relacionados con la plasticidad de los individuos (Ebbesson y Braithwaite, 2012; Johansen et al., 2012), aun queda mucho camino por recorrer y aspectos importantes que pueden influir sobre los *coping styles*, como la edad, el contexto social, nuevas condiciones en el entorno, etc., deberían ser estudiados en el futuro.

En acuicultura, discriminar individuos proactivos y reactivos dentro de una misma población puede suponer una ventaja desde un punto de vista productivo. Teniendo en cuenta que las características propias de los diferentes *coping styles* son

favorables en unos casos y perjudiciales en otros, se podrían diseñar ambientes de cultivos específicos para cada personalidad, pudiendo aumentar de esta manera la productividad. Además, el conocimiento de los *coping styles* puede facilitar el entendimiento de la vulnerabilidad a enfermedades relacionadas con el estrés (Silva et al., 2010), permitiendo tomar medidas correctoras para optimizar el cultivo. Por otro lado, a la hora de llevar a cabo estudios sobre fisiología de peces, una selección *a priori* de los diferentes *coping styles* facilitaría la interpretación de los datos al reducir la dispersión dentro de la población en estudio (Rey et al., 2016).



## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



## **II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

La acuicultura es una importante actividad económica que está adquiriendo cada vez más relevancia debido a que las poblaciones naturales de especies comerciales se están viendo muy afectadas a causa de la actividad pesquera incontrolada, de la contaminación marina y de otros factores que podrían llevar a la desaparición de determinadas especies. En la actualidad, en España son fundamentalmente tres las especies de peces cultivadas integralmente a gran escala: dorada, lubina y rodaballo, aunque en los últimos años el cultivo del atún rojo y la corvina se van configurando como buenas opciones para la diversificación de la acuicultura (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Plan Estratégico Plurianual de la Acuicultura Española 2014-2020).

Es evidente por tanto, la necesidad de una diversificación de especies cultivadas en el ámbito de la acuicultura marina española. La acedía se presenta como una firme candidata para la diversificación, ya que los estudios preliminares muestran que tiene un alto valor comercial y muy buena tasa de crecimiento (Herrera et al., 2005, 2006, 2008). Además, la presión a la que se ha visto sometida en los últimos años ha originado un descenso en sus capturas (Sobrino et al., 1994; Jiménez et al., 1998; Vila y Jiménez, 2002; IDAPES, Junta de Andalucía, 2016).

El principal problema para la diversificación es la falta de investigación que posibilite el desarrollo zootécnico efectivo de la especie. Hasta el momento, investigadores del centro IFAPA “Agua del Pino” han conseguido llevar a cabo la reproducción de este soleido en cautividad (Herrera, 2008), y se han realizado estudios previos sobre parámetros de cultivos como la osmolaridad y la densidad en determinadas fases de su desarrollo (Herrera et al., 2009a,b). Sin embargo, aún queda pendiente investigar muchos otros aspectos. En piscicultura, la densidad de cultivo y la alimentación son cuestiones clave (Valente et al., 2001; Bayarri et al., 2004; Sunuma et al., 2007). Hasta el momento no se conocen los ritmos de actividad diaria de la acedía (actividad locomotora y alimentaria) básicos para lograr que la alimentación sea la

adecuada, ni cuáles de las estrategias de alimentación más empleadas en la acuicultura (al azar o programada) origina menos estrés a esta especie. Por otra parte, aunque existen trabajos previos que han estudiado el efecto de las densidades de cultivo en juveniles, aun quedaría determinar qué densidades serían las óptimas en las demás fases de cultivo y las consecuencias que generarían en ellas densidades extremas. Además, a pesar de que la literatura más reciente pone de manifiesto la importancia de integrar las respuestas fisiológicas y comportamentales al estrés para un mejor entendimiento de su fisiología y para la optimización del cultivo (mejoras en el bienestar y la salud), hasta el momento nunca se ha investigado sobre este aspecto en la acedía. Por consiguiente, es necesario resolver todas estas cuestiones para lograr que el cultivo de la acedía llegue a ser exitoso.

En este contexto, el Objetivo General de la presente Tesis Doctoral es estudiar y desarrollar nuevos conocimientos acerca de la metodología de cultivo de la acedía, basándose principalmente en las respuestas fisiológicas y de comportamiento al estrés y su relación con las condiciones de cultivo.

Para la consecución este Objetivo General, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer las condiciones de cultivo (densidad y estrategia alimentaria) más adecuadas para la especie, teniendo en cuenta las respuestas fisiológicas relacionadas con el estrés y las variables zootécnicas clave (crecimiento y supervivencia).

1.1. Evaluar los valores adecuados de densidad de cultivo.

1.2. Determinar los ritmos diarios de alimentación y de actividad locomotora de la acedía.

1.3. Evaluar la estrategia alimentaria adecuada mediante el ensayo de tres modelos de alimentación: autodemanda (A), programada nocturna (N) y programada diurna (D).

2. Estudiar las respuestas al estrés relacionado con las condiciones de cultivo mediante la integración de la fisiología y del comportamiento de acuerdo con el concepto de *coping style*.

Estos objetivos se desarrollan en forma de cuatro capítulos experimentales diferentes siguiendo la estructura de un artículo. A continuación se enumeran dichos capítulos y se detallan los objetivos de cada uno de ellos.

**Capítulo 1.** RESPUESTAS FISIOLÓGICAS AL ESTRÉS EN EL DESARROLLO LARVARIO DE LA ACEDÍA *Dicologlossa cuneata* (MOREAU). El objetivo de este estudio es estudiar la respuesta fisiológica de las larvas de acedía sometidas a una situación de estrés por alta densidad de cultivo, y con ello determinar si los altos niveles de cortisol descritos en juveniles son intrínsecos en esta especie o, si por el contrario, aumentan progresivamente desde las etapas tempranas del desarrollo debido a las condiciones de cautividad u otros factores de su cultivo.

**Capítulo 2.** ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS METABÓLICAS RELACIONADAS CON EL ESTRÉS A ALTAS DENSIDADES DE CULTIVO EN LA ACEDÍA (*Dicologlossa cuneata*). Este estudio pretende determinar un indicador de estrés crónico para la acedía, centrándose en los cambios en el sistema de respuesta al estrés y en el metabolismo intermedio de la especie. Además se pretende estudiar los efectos de diferentes densidades de cultivo sobre la biometría, la supervivencia y el estado fisiológico.

**Capítulo 3.** RITMOS DE ACTIVIDAD DIARIA Y RESPUESTA AL ESTRÉS EN LA ACEDÍA (*Dicologlossa cuneata* MOREAU, 1881). El objetivo de este estudio es determinar los ritmos diarios de alimentación y de actividad locomotora de la acedía. Además, se pretende realizar un estudio comparativo de la eficiencia alimentaria y la respuesta relacionada con el estrés de tres estrategias de alimentación diferentes: autodemanda, alimentación programada diurna y alimentación programada nocturna.

**Capítulo 4.** IDENTIFICACIÓN DE *COPING STYLES* Y SU ASOCIACIÓN CON ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO EN ACEDÍAS (*Dicologlossa cuneata*). En este estudio se pretende estudiar las respuestas integradas (fisiología y comportamiento) al estrés de la acedía en cautividad para la identificación de diferentes *coping styles* y, posteriormente, detectar si existen entre ellos diferencias en el metabolismo basal.



### **III. CAPÍTULO EXPERIMENTALES**



**RESPUESTAS FISIOLÓGICAS AL ESTRÉS EN EL DESARROLLO LARVARIO DE  
LA ACEDÍA *Dicologlossa cuneata* (MOREAU)**

Los resultados obtenidos en este capítulo experimental están publicados en el artículo:

Herrera, M., Rodiles, A., Sánchez, B., López, Juan M., **De La Roca, E.** (2016) **Physiological stress responses to captivity in early developmental stages of the wedge sole *Dicologlossa cuneata* (Moreau).** Aquaculture Research 47, 732–740. doi:10.1111/are.12531



## RESUMEN

Las respuestas al estrés en estadios tempranos de la acedía han sido estudiadas para determinar si los altos niveles de cortisol descritos en juveniles están presentes desde estas etapas prematuras del desarrollo. Los contenidos de cortisol total en el cuerpo, glucosa y lactato, así como los parámetros biométricos en larvas de acedía fueron medidos a tres densidades de cultivo diferentes, durante 45 días. La supervivencia no varió significativamente entre los tratamientos. La densidad de cultivo afectó significativamente a las variables relacionadas con el crecimiento y las larvas a menores densidades de cultivo crecieron más rápidamente. En el momento de la eclosión, la concentración de cortisol total en el cuerpo fue de  $0.33 \pm 0.01 \text{ ng g}^{-1}$  y varió significativamente desde los 0 a los 30 días después de la eclosión (DDE) para cada densidad de cultivo, aunque los valores permanecieron estables durante el tiempo restante excepto en el grupo sometido a baja densidad de cultivo. Estos niveles hormonales aumentaron significativamente al final del experimento de manera proporcional a la densidad de cultivo ( $5.17 \pm 2.43 \text{ ng g}^{-1}$  en baja densidad de cultivo y  $22.10 \pm 4.95 \text{ ng g}^{-1}$  en alta densidad de cultivo). Las concentraciones de glucosa y lactato en el cuerpo no variaron entre los tratamientos. Concluimos que las respuestas al estrés debido a las altas densidades de cultivo de las larvas de acedía son detectables a partir de 45 DDE y que la densidad de cultivo puede ser un factor de estrés ya a esa edad. Como ya se ha descrito para la etapa juvenil, los valores de contenido de cortisol en larvas de acedía bajo condiciones supuestamente no estresantes (bajas densidades de cultivo) son uno de los más altos entre los descritos en la literatura. Estos valores elevados podrían ser consecuencia de las condiciones de cautividad, aunque también podría tratarse de una característica propia de la especie.

**Palabras clave:** cortisol, larva, alta densidad de cultivo, estrés, acedía.

## 1.1 INTRODUCCIÓN

El característico comportamiento de la acedía de nadar por toda la columna de agua como un pez pelágico y el hecho de que estudios preliminares sobre el cultivo hayan registrado altas tasas de mortalidad, pueden estar íntimamente relacionados con los altos valores de indicadores fisiológicos de estrés, como por ejemplo el cortisol, que presenta dicha especie en cautividad (Herrera et al., 2008). Por todo ello, se considera de gran importancia investigar sobre la fisiología del estrés de *D. cuneata* para así determinar y desarrollar tecnologías de cultivo asociadas a una reducción del estrés y un aumento en la supervivencia.

Experimentos previos han demostrado que la acedía muestra síntomas de estrés cuando se somete a ciertos agentes estresantes como shock osmótico y altas densidades de cultivo (Herrera et al., 2009a,b). Sin embargo, estos trabajos han sido realizados con los peces en estadio juvenil, por lo que hasta el momento no se poseen datos sobre estos aspectos durante el cultivo larvario. Por ello, estudiar la respuesta al estrés durante los primeros días tras la eclosión proporcionaría una oportunidad para intentar determinar si los elevados niveles basales de los indicadores de estrés en las etapas posteriores son propios de la especie o si derivan de las condiciones de cautividad.

Aunque en esos trabajos previos se midieron diferentes indicadores de estrés (metabolitos y cortisol plasmáticos, sustratos energéticos en tejidos, etc.), las variaciones de la hormona cortisol en plasma fueron consideradas las más importantes, debido a que el cortisol es un indicador fiable de estrés, especialmente en casos de estrés agudo y en experimentos a corto plazo (Wendelaar Bonga, 1997; Pickering, 1998; Salas-Leiton et al., 2008; Herrera et al., 2009b; Vargas-Chacoff et al., 2011). Aunque la concentración de esta hormona es usualmente analizada en sangre (plasma/suero), cuando los peces son demasiado pequeños para proporcionar la cantidad de sangre necesaria para el análisis, se utilizan otro tipo de métodos. En estos casos se mide la concentración de cortisol total en el cuerpo, proporcionando así información relevante sobre la fisiología de peces de pequeño tamaño o de larvas

(Ramsay et al., 2006; Sink et al., 2007; Peterson y Booth, 2010). Esta metodología ha sido aplicada con éxito en varios trabajos, tanto para obtener información sobre la formación y desarrollo de componentes del sistema endocrino como para evaluar la respuesta al estrés en larvas en diferentes condiciones (King y Berlinsky, 2006; Simontacchi et al., 2009; Bertotto et al., 2011; Pavlidis et al., 2011; Wunderink et al., 2012). Sin embargo, los peces planos (pleuronectiformes) apenas han sido objeto de este tipo de trabajos. Solamente la platija japonesa *Paralichthys olivaceus* (Temminck y Schlegel) y el lenguado senegalés *Solea senegalensis* (Kaup) han sido analizados para determinar los cambios en el cortisol y otros parámetros fisiológicos durante el desarrollo larvario (De Jesus et al., 1991; Bolasina et al., 2006; Wunderink et al., 2012).

El objetivo de este trabajo es estudiar la respuesta fisiológica de las larvas de acedía sometidas a una situación de estrés por alta densidad de cultivo, con el fin de determinar si los altos niveles de cortisol descritos en juveniles están presentes desde las etapas tempranas del desarrollo. Esto serviría para esclarecer si estos valores de indicadores de estrés son intrínsecos en esta especie, siendo ya altos justo después de la eclosión, o si por el contrario aumentan progresivamente debido a condiciones de cautividad estresantes u otros factores de su cultivo.

## 1.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1.2.1. Cría larvaria

Las larvas de acedía fueron obtenidas del stock de reproductores del Centro IFAPA Agua del Pino (Cartaya, España) y se siguieron los métodos de cultivo descritos para esta especie (Herrera et al., 2008). Tras la puesta, las larvas (aproximadamente 50000 individuos) fueron cultivadas en tanques cilíndricos de 70 L (Figura 1.1), manteniendo un volumen total de 45 L cada uno. La técnica de "aguas verdes" se utilizó mediante la adición diaria de microalgas de *Nannochloropsis* sp. (EasyAlgae®, Fitoplancton Marino, Cádiz, Spain), a 300 mg tanque<sup>-1</sup>.

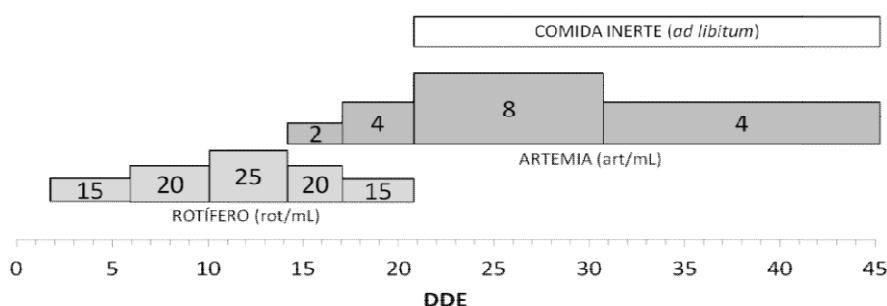


**Figura 1.1.** Tanque cilíndrico de cultivo larvario con “aguas verdes”.

El agua de mar (sistema abierto) era filtrada a  $1\ \mu\text{m}$  y esterilizada con luz ultravioleta ( $>32\ \text{mV cm}^{-2}$ ), y la temperatura se mantuvo a  $19^\circ\text{C}$  durante todo el cultivo larvario ( $19.6 \pm 0.9^\circ\text{C}$ ; media  $\pm$  SEM). En cada tanque se aplicó aireación mediante piedras porosas, asegurando una tasa de oxígeno disuelto de más de  $5\ \text{mg L}^{-1}$  ( $8.6 \pm 0.1\ \text{mg L}^{-1}$ ). La calidad del agua fue comprobada semanalmente mediante kits de Spectroquant (MERCK, Darmstadt, Germany), manteniendo los siguientes valores por cada tanque experimental ( $\text{mg L}^{-1}$ ): amoníaco no ionizado  $<0.001$ ; amoníaco total  $<0.04$ ; nitrito total  $<0.02$ ; nitrato total  $<0.03$ . El pH ( $7.75 \pm 0.02$ ) y la salinidad ( $34.5 \pm 0.31$ ) fueron monitorizados mediante sensores multiparamétricos. La renovación diaria del agua fue del 85% hasta 15 días después de la eclosión (DDE). Posteriormente se cambió al 170% hasta el final del experimento (45 DDE). El fotoperíodo fue natural, con una intensidad luminosa de 500-1000 lux.

Se ensayaron tres densidades de cultivo (DC) diferentes, con tres réplicas por tratamiento: 30, 60 y  $120\ \text{larva L}^{-1}$  [baja densidad de cultivo (BDC), media densidad de cultivo (MDC) y alta densidad de cultivo (ADC), respectivamente]. Las larvas fueron ubicadas en tanques de incubación (0 DDE) y se cultivaron durante 45 días a las densidades anteriores. El esquema de alimentación, mostrado en la Figura 1.2, garantizó la alimentación *ad libitum* para todas las densidades ensayadas (Herrera 2008), y los tanques fueron monitoreados diariamente para asegurar que las larvas

permanecieran vivas en ellos. Los experimentos cumplieron las Directrices del Consejo de la Unión Europea (2010/63 / EU) y del Gobierno español (RD1201 / 2005, RD53 / 2013 y 32/2007) para el uso de animales de laboratorio.



**Figura 1.2.** Esquema de alimentación para el experimento. Adaptado de Herrera (2008).

### 1.2.2. Muestreos

Las larvas fueron muestreadas a los 0, 30 y 45 DDE, para analizar el contenido de cortisol y metabolitos. El muestreo inicial (0 DDE) fue llevado a cabo con un lote de larvas procedentes del tanque de incubación utilizadas exclusivamente con ese propósito. Los datos biométricos (peso y longitud) fueron registrados únicamente a los 0 y 45 DDE.

Las larvas fueron recogidas desde los tanques de cultivo, sacrificadas con una sobredosis de anestésico ( $1 \text{ mL L}^{-1}$  de 2-fenoxietanol) y secadas con papel absorbente. Se agruparon (aproximadamente 100, 10, 3 larvas/lote para 0, 30 y 45 DDE) y se colocaron en tubos Eppendorf a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis. Para la evaluación de la longitud, 15-20 larvas de cada tanque fueron medidas en el microscopio (2x–8x) mediante el programa de análisis de imagen Nikon Digital Sight® DS-L1 (Nikon Instruments Europe B.V., Amsterdam, Netherlands). El peso corporal fue determinado con una balanza de precisión, después de secar cada larva con papel absorbente. La supervivencia final fue calculada analizando las fotografías de los tanques tomadas al final del experimento, después de detener la aireación y el flujo de aire. Las larvas

fueron contadas en la imagen usando el programa de imagen mencionado anteriormente. La tasa de crecimiento específico (SGR) y el factor de condición ( $K$ ) fueron calculados según las siguientes fórmulas:

$$\text{SGR (\% día}^{-1}\text{)} = 100 \cdot (\ln P_f - \ln P_o) \cdot t^{-1}$$

$$K = PC \cdot LT^{-3}$$

donde  $P_f$  y  $P_o$  son la media de los pesos final e inicial;  $PC$  y  $LT$ , peso corporal individual y longitud total; y  $t$ , tiempo (días).

### 1.2.3. Análisis de metabolitos y cortisol

Cada lote de larvas para la determinación de glucosa y lactato fue pesado y homogeneizado mediante sonicación en frío con 0.6 N ácido perclórico (7.5 veces el peso de la muestra), neutralizado en la misma proporción (usando 1 M de bicarbonato potásico) y centrifugado (3 minutos a 10000 g, Eppendorf 5415R), y el sobrenadante fue usado para el análisis. Los niveles de glucosa y lactato tisular fueron medidos usando kits comerciales de Química Analítica Aplicada S.A. (QCA Glucosa líquida Ref. 998225, Tarragona, España) y Spinreact (Lactato Ref. 1001330, Barcelona, España) adaptados a microplacas de 96 pocillos (Herrera et al., 2009b). Los valores de cortisol total en cuerpo fueron cuantificados mediante un kit ELISA (EA65, Oxford Biomedical Research, Rochester Hills, MI, USA) modificado y adaptado para peces (Herrera et al., 2015). Previamente, los lotes de larvas fueron pesados, homogeneizados mediante sonicador con tampón PBS (pH 7.4; 2  $\mu\text{L mg}^{-1}$ ), y mezclados con dietil éter (10  $\mu\text{L mg}^{-1}$ ). Después de la decantación, el sobrenadante fue trasladado a otro tubo y el dietil éter evaporado con gas nitrógeno. A continuación, la sustancia restante se diluyó (1:6) con un tampón de extracción suministrado por el fabricante del kit y se usó para la determinación espectrofotométrica final con el kit ELISA.

### 1.2.4. Análisis estadístico

Los datos están representados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). La normalidad y la homocedasticidad se verificaron por medio de las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente. Los datos no normales fueron transformados mediante la transformación Box-Cox. Para cada tiempo de muestreo, las diferencias entre los grupos a diferentes DC ( $P < 0.05$ ) se analizaron mediante una ANOVA de una vía cuando se cumplieron los criterios de normalidad y homoscedasticidad. En los casos de no normalidad y heteroscedasticidad, se utilizó el test de Kruskal-Wallis para analizar los datos. La diferencia entre edades dentro de una misma densidad se detectó mediante una t-Student para muestras pareadas.

## 1.3. RESULTADOS

La SGR, el factor de condición ( $K$ ), y el peso y longitud final fueron diferentes entre los tratamientos ( $P < 0.001$ ), siendo las larvas sometidas a la DC más baja las que crecieron más rápidamente (Tabla 1.1). Sin embargo, la supervivencia no difirió significativamente entre los tratamientos.

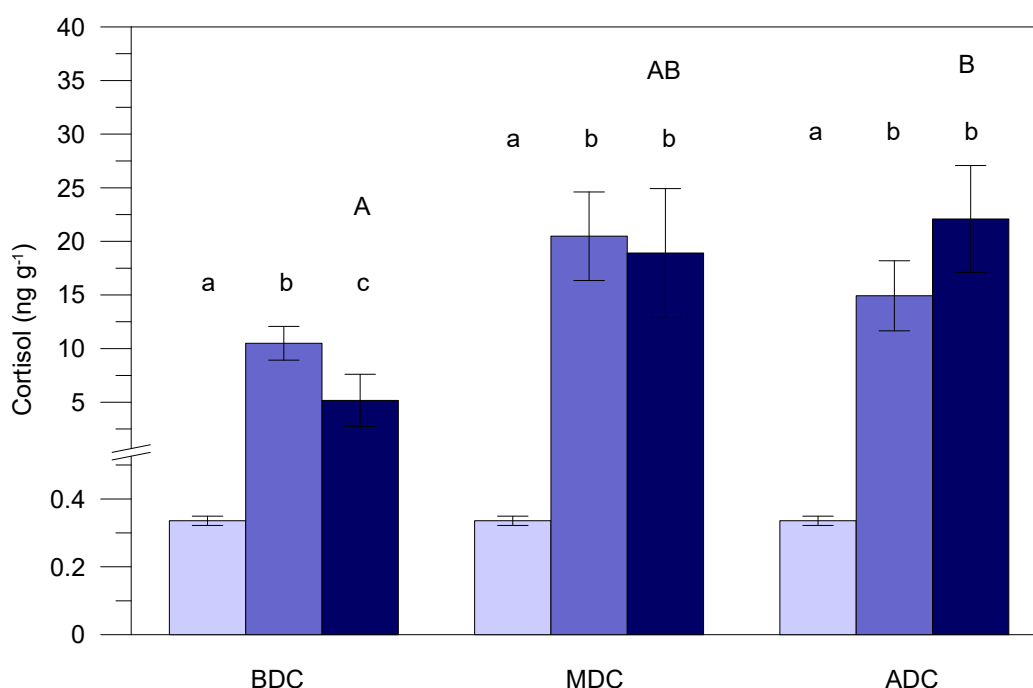
|                                 | BDC                  | MDC               | ADC               |
|---------------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Longitud total (cm)</b>      | $2.19 \pm 0.09^a$    | $1.73 \pm 0.06^b$ | $1.36 \pm 0.05^c$ |
| <b>Peso (g)</b>                 | $0.11 \pm 0.01^a$    | $0.05 \pm 0.00^b$ | $0.02 \pm 0.00^c$ |
| <b>SGR (% día<sup>-1</sup>)</b> | $4.78 \pm 0.10^a$    | $4.28 \pm 0.07^b$ | $3.77 \pm 0.08^c$ |
| <b><math>K</math></b>           | $0.84 \pm 0.03^{ab}$ | $0.80 \pm 0.02^a$ | $0.91 \pm 0.04^b$ |
| <b>Supervivencia (%)</b>        | $6.59 \pm 1.32$      | $7.76 \pm 1.06$   | $6.18 \pm 0.57$   |

**Tabla 1.1.** Datos biométricos y tasa de supervivencia al final del experimento; media  $\pm$  SEM ( $n=3$  para supervivencia, y  $n=45-60$  para el resto). Diferentes letras en superíndices indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Justo tras la eclosión (0 DDE), el peso medio y la longitud de las larvas fueron  $0.24 \pm 0.01$  mg y  $2.43 \pm 0.05$  mm, respectivamente. La concentración de cortisol total en el cuerpo fue de  $0.33 \pm 0.01$  ng g<sup>-1</sup>. Este parámetro aumentó significativamente

desde los 0 a los 30 DDE para cada densidad de cultivo (Gráfica 1.1). Durante el tiempo restante no cambió significativamente en MDC y ADC, pero si en BDC, donde se observó una reducción significativa.

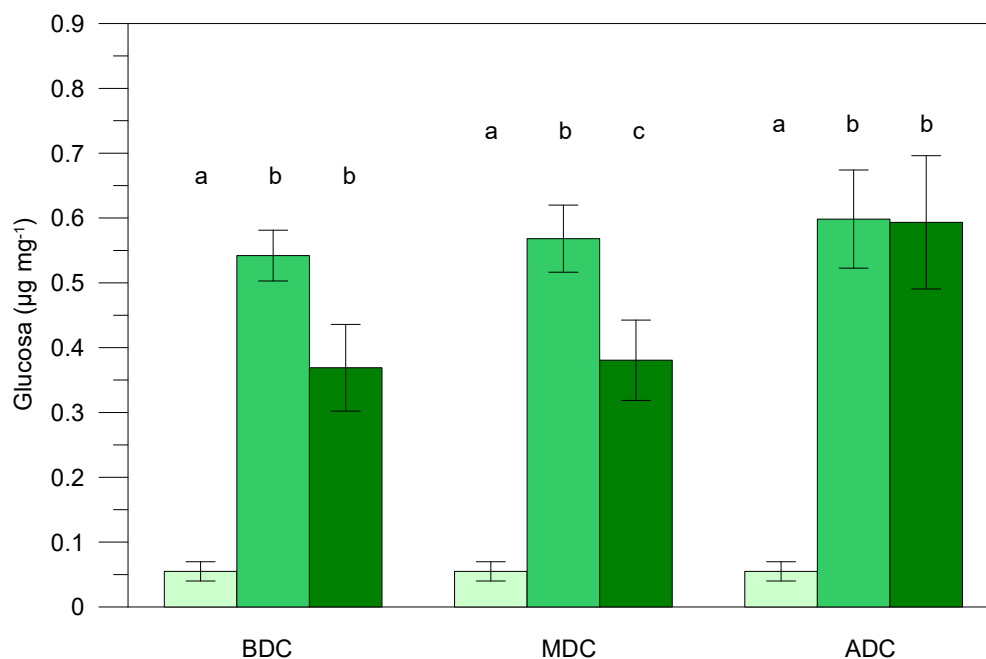
Al final del experimento (45 DDE), los niveles hormonales fueron significativamente más elevados en ADC que en BDC ( $22.1 \pm 4.95 \text{ ng g}^{-1}$ ,  $5.17 \pm 2.43 \text{ ng g}^{-1}$ , respectivamente).



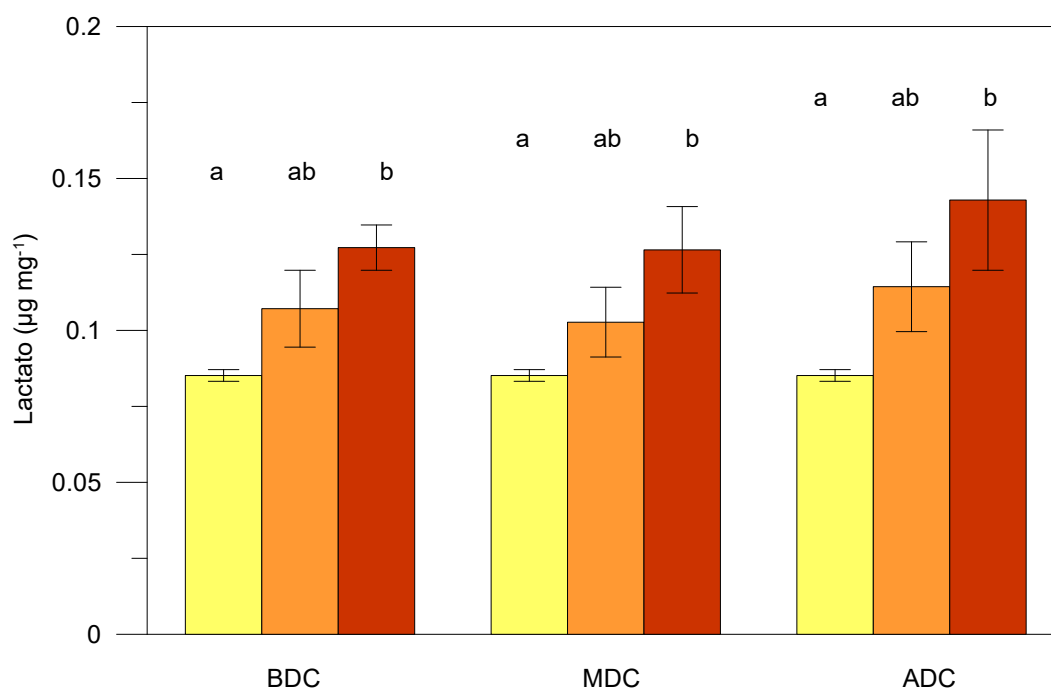
**Gráfica 1.1.** Contenido de cortisol total en el cuerpo en larvas de acedía. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM (n=8) para las diferentes densidades de cultivo: baja (BDC), media (MDC) y alta (ADC) densidad de cultivo. Las barras celestes, azules y azules marino son para 0, 30 y 45 DDE, respectivamente. Las letras minúsculas indican diferencias entre edades para cada densidad de cultivo. Las letras mayúsculas indican diferencias entre densidades de cultivo para cada edad.

El contenido de glucosa varió significativamente desde los 0 a los 30 DDE en las diferentes densidades (Gráfica 1.2), y continuó variando solo para MDC, con valores más bajos al final del experimento. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los tratamientos para este metabolito.

El patrón de variación de la concentración de lactato fue similar para todas las densidades de cultivo (Gráfica 1.3), incrementando significativamente con el tiempo aunque, como anteriormente, no se encontraron diferencias entre los tratamientos.



**Gráfica 1.2.** Contenido de glucosa en larvas de acedía. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n=8$ ) para las diferentes densidades de cultivo: baja (BDC), media (MDC) y alta (ADC) densidad de cultivo. Las barras verdes claro, verdes medio y verdes oscuro son para 0, 30 y 45 DDE, respectivamente. Las letras minúsculas indican diferencias entre edades para cada densidad de cultivo.



**Gráfica 1.3.** Contenido de lactato en larvas de acedía. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n=8$ ) para las diferentes densidades de cultivo: baja (BDC), media (MDC) y alta (ADC) densidad de cultivo. Las barras amarillas, naranja claro y naranja oscuro son para 0, 30 y 45 DDE, respectivamente. Las letras minúsculas indican diferencias entre edades para cada densidad de cultivo.

#### 1.4. DISCUSIÓN

Está descrito que la alta densidad de cultivo es un estresor común para muchas especies de peces, y que los peces que sufren estrés por altas densidades de cultivo son propensos a sufrir patologías, además de mostrar generalmente un crecimiento lento y bajas tasas de supervivencia (Ellis et al., 2002; Sangiao-Alvarellos et al., 2005b; Björnsson y Ólafsdóttir, 2006; Papoutsoglou et al., 2006; Sammouth et al., 2009; Santos et al., 2010). Sin embargo, esos descubrimientos están basados en experimentos con adultos o juveniles de peces pelágicos. Existen algunos trabajos sobre el efecto de diferentes densidades en larvas en los que se han observado tanto efectos negativos como no variaciones en el crecimiento y la supervivencia de éstas. Por ejemplo, en larvas de lubina *Dicentrarchus labrax* L. y de bacalao atlántico *Gadus morhua* L., el crecimiento y la supervivencia no se vieron afectados por la densidad de cultivo (Hatzithanasiou et al., 2002; Alver et al., 2007). Sin embargo, tanto en larvas de lucio *Sander lucioperca* L. como de mojarra mexicana *Cichlasoma urophthalmus* (Gunther) se vieron afectados negativamente por el incremento de las densidades de cultivo (Szkudlarek y Zakés, 2007; Jiménez-Martínez et al., 2009). En peces planos, Bolasina et al. (2006) encontraron bajas tasas de crecimiento y supervivencia en larvas de platija japonesa cultivadas a altas densidades. En nuestro estudio, aunque la tasa de supervivencia permaneció invariable, la SGR disminuyó significativamente con el aumento de la densidad de cultivo, lo que podría estar relacionado con una respuesta al estrés debido a esta situación.

El estrés provoca una modificación de las vías metabólicas energéticas y un aumento en el consumo de las reservas de energía para hacer frente a las situaciones adversas y recuperar así la homeostasis. Se ha observado que el cortisol desempeña un papel clave en el metabolismo energético (Barton y Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997; Pickering, 1998; Mommsen et al., 1999), por ello, es ampliamente aceptado como indicador de estrés en peces (Wendelaar Bonga, 1997). La respuesta del cortisol en nuestro estudio podría estar relacionada con la movilización de sustratos energéticos para hacer frente al estrés.

Sin embargo, hasta la fecha han sido pocos los trabajos que han tratado sobre el contenido de cortisol en las larvas de peces y principalmente se han enfocado en el desarrollo endocrino y no en efectos metabólicos (Barry et al., 1995; Jentoft et al., 2002; Deane y Woo, 2003; Szisch et al., 2005; Alsop y Vijayan, 2008; Applebaum et al., 2009; Pavlidis et al., 2011). Estos estudios han demostrado que el incremento del cortisol total en el cuerpo y la activación del eje hipotálamo-pituitaria-interrenal (HPI) tras una situación de estrés son detectables desde días hasta semanas después de la eclosión, dependiendo de la especie. Sin embargo, las respuestas fisiológicas de las larvas a los estresores relacionados con las condiciones de cultivo se han estudiado sólo en la lubina, el bacalao, el esturión blanco *Acipenser transmontanus* (Richardson) y la platija japonesa (Bolasina et al., 2006; King y Berlinsky, 2006; Simontacchi et al., 2009; Bertotto et al., 2011). En estos trabajos, la concentración de cortisol total en el cuerpo aumentó después de someter a las larvas a diferentes agentes estresantes: densidad de cultivo (Bolasina et al., 2006), captura/clasificado (King y Berlinsky, 2006), shock térmico (Bertotto et al., 2011) y flujo de agua turbulenta (Simontacchi et al., 2009). En nuestro estudio, se identificaron aumentos de cortisol a los 45 DDE debido al estrés por altas densidades de cultivo, pero no se detectó ningún efecto por este estresor en larvas de 30 DDE. Por lo tanto, las respuestas al estrés en las larvas de acedía debido a ADC fueron detectables a partir de 45 DDE.

En nuestro experimento hubo dos tipos de respuestas al estrés (Iwama et al., 2006): primaria (incremento de cortisol) y terciaria (bajo crecimiento). La secundaria no fue detectada, ya que los niveles de glucosa y lactato permanecieron constantes entre las diferentes densidades de cultivo. Esto podría deberse a una respuesta homeostática en los niveles de glucosa y lactato para hacer frente al gasto energético adicional de los individuos sometidos a estrés por altas densidades de cultivo. Esta situación obligaría a los peces a movilizar más cortisol, alcanzando un estado alostático en MDC y ADC (McEwen y Wingfield, 2003). Este estado (y un mayor contenido de cortisol) aumentaría la producción, la movilización y el gasto de metabolitos energéticos (principalmente glucosa y lactato), que se utilizarían para hacer frente a la situación estresante en lugar de crecer. Posiblemente por estas razones, los niveles de glucosa y lactato no variaron entre los tratamientos. Al igual que el cortisol, estas

sustancias se consideran buenos indicadores plasmáticos de estrés en peces (Wendelaar Bonga, 1997, Iwama et al., 2006), aunque hasta el momento no se habían evaluado en homogeneizados de larvas. Ciertamente, los resultados obtenidos en este trabajo indican que el contenido total en cuerpo de glucosa y lactato no son indicadores de estrés muy adecuados para evaluar el efecto de la densidad de cultivo durante el desarrollo larvario en la acedía, ya que se detectaron pocas variaciones (en su mayoría aumentos), posiblemente debido a la acumulación progresiva (probablemente en hígado y músculo) de estos sustratos energéticos mientras que las larvas se desarrollaron normalmente.

La acedía presenta altos valores de cortisol plasmático para condiciones supuestamente no estresantes (Herrera et al., 2009a,b). Sin embargo, esta especie no mostró un alto contenido de cortisol total en el cuerpo al eclosionar (Tabla 1.2). Todas las especies estudiadas mostraron valores superiores a excepción de la lubina que presentó valores más bajos (Pavlidis et al., 2011). No obstante, esta tendencia cambió a medida que las larvas crecían, alcanzando valores muy altos de cortisol a los 30 DDE, siendo éstos superados únicamente por los de la lubina (Pavlidis et al., 2011). En este sentido, los valores de cortisol en las larvas de acedía no estresadas son mayores que los de la mayoría de las especies de peces, como se observó en fases no larvarias (Herrera et al., 2009b). Por tanto, los altos valores de cortisol de esta especie en cautividad están presentes desde la fase larvaria. Todavía no se ha establecido cuando la larva de la acedía tiene un eje HPI funcional, aunque es muy probable que esto ocurra a los 2 DDE, cuando la mayoría de sus órganos se desarrollan completamente (Herrera et al., 2010).

En resumen, se podría concluir que las respuestas al estrés de las larvas de acedía son detectables a partir de los 45 DDE y que la densidad de cultivo puede ser un agente estresante ya en esa edad. Por otra parte, como ya se describió para la etapa juvenil, los valores de contenido de cortisol en larvas de acedía en condiciones supuestamente no estresantes están entre los más altos de los descritos en la literatura. Las condiciones de cautividad podrían ser responsables de esta situación aparentemente estresante, aunque no sabemos si esos valores son normales en

ejemplares silvestres. Sería necesario llevar a cabo más estudios para dilucidar esta cuestión.

| Especie                        | Cortisol total en el cuerpo (ng g <sup>-1</sup> ) |                            | Referencia                       |
|--------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
|                                | Eclosión                                          | Fase larvaria <sup>1</sup> |                                  |
| <i>Gadus morhua</i>            | 5-6 (corticosteroid)                              | -                          | King y Berlinsky (2006)          |
| <i>Ictalurus punctatus</i>     | 30-35                                             | -                          | Peterson y Booth (2010)          |
| <i>Dicentrarchus labrax</i>    | 1-2                                               | -                          | Bertotto <i>et al.</i> (2011)    |
|                                | 0.11-0.13                                         | 46-48 (27 DDE)             | Pavlidis <i>et al.</i> (2011)    |
| <i>Acipenser transmontanus</i> | 2.7-4.7 (1 DDE)                                   | 3.4-4.6 (35 DDE)           | Simontacchi <i>et al.</i> (2009) |
| <i>Acipenser fulvescens</i>    | 5-10 (1-2 DDE)                                    | 6-7 (31 DDE)               | Zubair <i>et al.</i> (2012)      |
| <i>Paralichthys olivaceus</i>  | -                                                 | 2.5-3 (25 DDE)             | Bolasina <i>et al.</i> (2006)    |
| <i>Dicologlossa cuneata</i>    | 0.32-0.34                                         | 9-12 (30 DDE)              | Este estudio                     |

<sup>1</sup>Los rangos en la fase larvaria representan los valores entre situaciones no estresante y estresante.

**Tabla 1.2.** Contenido de cortisol total en el cuerpo de algunas larvas de peces descrito en la literatura.

## 1.5. REFERENCIAS

- Alsop, D., Vijayan, M. (2008) Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **294**, R711–R719.
- Alver, M.O., Alfredsen, J.A., Øie, G. (2007) Estimating larval density in cod (*Gadus morhua*) first feeding tanks using measurements of feed density and larval growth rates. *Aquaculture* **268**, 216-226.
- Applebaum, S.L., Wilson, A., Holt, G.J., Nunez, B.S. (2009) The onset of cortisol synthesis and the stress response is independent of changes in CYP11B or CYP21 mRNA levels in larval red drum. *General and Comparative Endocrinology* **165**, 269–276.
- Arjona, F.J., Vargas-Chacoff, L., Ruiz-Jarabo, I., Martín del Río, M.P., Mancera, J.M. (2007) Osmoregulatory response of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) to

- changes in environmental salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology* **148A**, 413-421.
- Barnett, C.W. y Pankhurst, N.W. (1998) The effects of common laboratory and husbandry practices on the stress response of greenback flounder *Rhombosolea tapirina* (Günther, 1862). *Aquaculture* **162**, 313-329.
- Barry, T.P., Malison, J.A., Held, J.A., Parrish, J.J. (1995) Ontogeny of the cortisol stress response in larval rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology* **97**, 57–65.
- Barton, B.A., Iwama, G.K. (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Reviews of Fish Diseases* **129**, 3–26.
- Bauchot, M.L. (1987) Soleidae. In Fishes FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche (Revision 1). Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 38. Vol II. Vertébrés (Fisher, W., Bauchot, M.L., Schneider, M., eds.) pp.761-1530. FAO, Rome.
- Bertotto, D., Poltronieri, C., Negrato, E., Richard, J., Pascoli, F., Simontacchi, C., Radaelli, G. (2011) Whole body cortisol and expression of HSP70, IGF-I and MSTN in early development of sea bass subjected to heat shock. *General and Comparative Endocrinology* **174**, 44–50.
- Björnsson, B., Ólafsdóttir, S.R. (2006) Effects of water quality and stocking density on growth performance of juvenile cod (*Gadus morhua* L.). *ICES Journal of Marine Sciences* **63**, 326-334.
- Bolasina, S., Tagawa, M., Yamashita, Y., Tanaka, M. (2006) Effect of stocking density on growth, digestive enzyme activity and cortisol level in larvae and juveniles of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* **259**, 432-443.
- Costas, B., Aragão, C., Mancera, J.M., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C. (2008) High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in

- Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) juveniles. *Aquaculture Research* **39**, 1-9.
- De Jesus, E.G., Hirano, T., Inui, Y. (1991) Changes in cortisol and thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *General and Comparative Endocrinology* **82**, 369–376.
- Deane, E.E., Woo, N.Y.S. (2003) Ontogeny of thyroid hormones, cortisol, hsp70 and hsp90 during silver sea bream larval development. *Life Sciences* **72**, 805–818.
- Ellis, T., Yildiz, H.Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M.T., Tort, L., Øverli, Ø., Martins, C.I. (2012) Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiology and Biochemistry* **38**, 163-188.
- Hatziathanasiou, A., Paspatis, M. Houbart, M., Kestemont, P., Stefanakis, S., Kentouri, M. (2002) Survival, growth and feeding in early life stages of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) intensively cultured under different stocking densities. *Aquaculture* **205**, 89-102.
- Herrera, M. (2008) Biología y cultivo de la acedía (*Dicologoglossa cuneata* Moreau, 1881). Ph. D. Thesis. Universidad de Cádiz.
- Herrera, M., Hachero, I., Rosano, M., Ferrer, J.F., Márquez, J.M., Navas, J.I. (2008) First results on spawning, larval rearing and growth of the wedge sole (*Dicologoglossa cuneata*) in captivity, a candidate species for aquaculture. *Aquaculture International* **16**, 69-84.
- Herrera, M., Vargas-Chacoff, L., Hachero, I., Ruiz-Jarabo, I., Rodiles, A., Navas, J.I., Mancera, J.M. (2009a) Osmoregulatory changes in wedge sole (*Dicologoglossa cuneata* Moreau, 1881) after acclimation to different environmental salinities. *Aquaculture Research* **40**, 762-771.
- Herrera, M., Vargas-Chacoff, L., Hachero, I., Ruiz-Jarabo, I., Rodiles, A., Navas, J.I., Mancera, J.M. (2009b) Physiological responses of juvenile wedge sole

- Dicologlossa cuneata* (Moreau) to high stocking density. *Aquaculture Research* **40**, 790-797.
- Herrera, M., Hachero-Cruzado, I., Naranjo, A., Mancera, J.M. (2010) Organogenesis and histological development of the wedge sole *Dicologlossa cuneata* M. larva with special reference to the digestive system. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **20**, 489–497.
- Herrera, M., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff L., De La Roca, E., Mancera, J.M. (2015) Metabolic enzyme activities in relation to crowding stress in the wedge sole (*Dicologlossa cuneata*). *Aquaculture Research* **46**, 2808–2818.
- Iwama, G.K., Afonso, L.O.B., Vijayan, M.M. (2006) Stress in fishes. In *The Physiology of Fishes* (Evans, D.H. y Clairbone, J.B., eds), pp. 319-342. Boca Raton (US), CRC Press.
- Jentoft, S., Held, J.A., Malison, J.A., Barry, T. (2002) Ontogeny of the cortisol stress response in yellow perch (*Perca flavescens*). *Fish Physiology and Biochemistry* **26**, 371–378.
- Jiménez-Martínez, L.D., Alvarez-González, C.A., Contreras-Sánchez, W.M., Márquez-Couturier, G., Arias-Rodríguez, L., Almeida-Madrigal, J.A. (2009) Evaluation of Larval Growth and Survival in Mexican Mojarra, *Cichlasoma urophthalmus*, and Bay Snook, *Petenia splendida*, Under Different Initial Stocking Densities. *Journal of the World Aquaculture Society* **40(6)**, 753-761.
- King, V.W., Berlinsky, D.L. (2006) Whole-body corticosteroid and plasma cortisol concentrations in larval and juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* L. following acute stress. *Aquaculture Research* **37**, 1282-1289.
- McEwen, B.S., Wingfieldb, J.C. (2003) The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior* **43**, 2–15.

- Mommsen, T.P., Vijayan M.M., Moon, T.W. (1999) Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **9**, 211-268.
- Papoutsoglou, S.E., Karakatsouli, N., Pizzonia, G., Dalla, C., Polissidis, A., Papadopoulou-Daifoti, Z. (2006) Effects of rearing density on growth, brain neurotransmitters and liver fatty acid composition of juvenile white sea bream *Diplodus sargus* L. *Aquaculture Research* **37**, 87–95.
- Pavlidis. M., Karantzali, E., Fanouraki, E., Barsakis, C., Kollias, S., Papandroulakis, N. (2011) Onset of the primary stress in European sea bass *Dicentrarchus labrax*, as indicated by whole body cortisol in relation to glucocorticoid receptor during early development. *Aquaculture* **315**, 125-130.
- Peterson, B.C., Booth, N.J. (2010) Validation of a whole-body cortisol extraction procedure for channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fry. *Fish Physiology and Biochemistry* **36**, 661–665.
- Pickering, A.D. (1998) Stress responses of farmed fish. In *Biology of farmed fish* (Black, K. y Pickering, A., eds). Sheffield Academic Press, Sheffield.
- Ramsay, J.M., Feist, G.W., Varga, Z.M., Westerfield, M., Kent, M.L., Schreck, C.B. (2006) Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture* **258**, 565–574.
- Ribas, L. Flos, R., Reig, L., MacKenzie, S., Barton, B.A., Tort, L. (2007) Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: Stress responses and final product quality. *Aquaculture* **269**, 250-258.
- Salas-Leiton, E., Anguis, V., Manchado, M., Cañavate, J.P. (2008) Growth, feeding and oxygen consumption of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles stocked at different densities. *Aquaculture* **285**, 84-89.

- Sammouth, S., Roque d'Orbcastel, E., Gasset, E., Lemarié, G., Breuil, G., Marino, G., Coeurdacier, J.L., Fivelstad, S., Blancheton, J.P. (2009) The effect of density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) performance in a tank-based recirculating system. *Aquacultural Engineering* **40**, 72–78.
- Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán, J.M., Laiz-Carrión, R., Míguez, J.M., Martín del Río, M.P., Mancera, J.M., Soengas, J.L. (2005b) Interactive effects of high stocking density and food deprivation on carbohydrate metabolism in several tissues of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Journal of Experimental Zoology* **303A**, 761-775.
- Santos, G.A., Schrama, J.W., Mamauag, R.E.P., Rombout, J.H.W.M., Verreth, J.A.J. (2010) Chronic stress impairs performance, energy metabolism and welfare indicators in European seabass (*Dicentrarchus labrax*): The combined effects of fish crowding and water quality deterioration. *Aquaculture* **299**, 73-80.
- Simontacchi, C., Negrato, E., Pazzaglia, M., Bertotto, D., Poltronieri, C., Radaelli, G. (2009) Whole-body concentrations of cortisol and sex steroids in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*, Richardson 1836) during early development and stress response. *Aquaculture International* **17**, 7–14.
- Sink, T.D., Kumaran, S., Lochmann, R.T. (2007) Development of a whole-body cortisol extraction procedure for determination of stress in golden shiners, *Notemigonus crysoleucas*. *Fish Physiology and Biochemistry* **33**, 189–193.
- Sobrino, I., Jiménez, M.P., Ramos, F., Baro, J. (1994) Descripción de las pesquerías demersales de la región suratlántica española. *Informes Técnicos del Instituto Español de Oceanografía* **151**, 1–79.
- Szisch, V., Papandroulakis, N., Fanouraki, E., Pavlidis, M. (2005) Ontogeny of the thyroid hormones and cortisol in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *General and Comparative Endocrinology* **142**, 186–192.

- Szkudlarek, M., Zakés, Z. (2007) Effect of stocking density on survival and growth performance of pikeperch, *Sander lucioperca* (L.), larvae under controlled conditions. *Aquaculture International* **15**, 67–81.
- Vargas-Chacoff, L., Calvo, A., Ruiz-Jarabo, I., Villarroel, F., Muñoz, J.L., Tinoco, A.B., Cárdenas, S., Mancera, J.M. (2011) Growth performance, osmoregulatory and metabolic modifications in red porgy fry, *Pagrus pagrus*, under different environmental salinities and stocking densities. *Aquaculture Research* **42**, 1269-1278.
- Wendelaar Bonga, S.E. (1997) The stress response in fish. *Physiological Reviews* **7**, 591-625.
- Wunderink, Y.S., Martínez-Rodríguez, G., Yúfera, M., Morero, I.M., Flik, G., Mancera, J.M., Klaren, P.H.M. (2012) Food deprivation induces chronic stress and affects thyroid hormone metabolism in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) post-larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **162**, 317–322.
- Zubair, S.N., Peake, S.F., Hare, J.F., Anderson, W.G. (2012) The effect of temperature and substrate on the development of the cortisol stress response in the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, Rafinesque (1817). *Environmental Biology of Fish* **93**, 577–587.



**ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS METABÓLICAS RELACIONADAS CON EL  
ESTRÉS A ALTAS DENSIDADES DE CULTIVO EN LA ACEDÍA (*Dicologlossa  
cuneata*)**

Los resultados obtenidos en este capítulo experimental están publicados en el artículo:

Herrera, M., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff L., **De La Roca, E.**, Mancera, J.M. (2015). **Metabolic enzyme activities in relation to crowding stress in the wedge sole (*Dicologlossa cuneata*)**. Aquaculture Research, 46, 2808–2818. doi: 10.1111/are.12440



## RESUMEN

En este trabajo, se ha evaluado el efecto de diferentes densidades de cultivo sobre la biometría, supervivencia y estado fisiológico de la acedía (*Dicologlossa cuneata*), centrándose en los cambios en el sistema de estrés y metabolismo intermedio, con el objetivo de determinar un indicador de estrés para situaciones de estrés crónico en esta especie. Las acedías se mantuvieron en tres densidades de cultivo diferentes (0.2, 0.4 y 0.8 kg m<sup>-3</sup>) durante 197 días, y se evaluaron la supervivencia, el crecimiento, los metabolitos plasmáticos, el cortisol y las actividades enzimáticas. Las tasas de supervivencia más altas tuvieron lugar a baja densidad, aunque el crecimiento no varió significativamente entre los tratamientos. Las actividades enzimáticas, principalmente en el músculo, variaron dependiendo de la densidad de cultivo. En el hígado, los niveles más elevados de la actividad hexoquinasa se observaron en los peces mantenidos en baja densidad de cultivo mientras que no se detectaron diferencias para las otras enzimas analizadas. En el músculo, todas las enzimas aumentaron significativamente su actividad a altas densidades de cultivo. Concluimos que el cultivo a largo plazo a alta densidad alteró significativamente las actividades enzimáticas (hexoquinasa, glutamato deshidrogenasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa) en el músculo de la acedía, aunque las enzimas hepáticas, el cortisol plasmático y los metabolitos no variaron significativamente. Por lo tanto, las enzimas musculares, hexoquinasa y glutamato deshidrogenasa, podrían ser considerados indicadores de estrés en situaciones de estrés crónico para esta especie.

**Palabras clave:** estrés a alta densidad de cultivo, actividad enzimática, metabolismo energético, acedía.

## 2.1. INTRODUCCIÓN

En peces planos, la estimulación del sistema de estrés implica unas respuestas primaria, secundaria y terciaria, mientras que el metabolismo intermedio se activa para restablecer la homeostasis (Wendelaar Bonga, 1997; Iwama et al., 2006). El papel del cortisol en el metabolismo intermedio ya ha sido descrito (Mommsen et al., 1999), sin embargo, la importancia relativa de cada vía metabólica o actividad enzimática bajo diferentes condiciones de estrés permanece incierta. La mayoría de los estudios sobre el estrés y el metabolismo se basan en el análisis de metabolitos de tejidos/plasma, pero no lo hacen sobre mediciones de actividad enzimática (Montero et al., 1999; Sangiao-Alvarellos et al., 2005; Santos et al., 2010). Aunque la acumulación/disminución de los metabolitos en tejido y en plasma proporciona una valiosa información sobre el consumo de energía durante el estrés, no es posible identificar las vías metabólicas implicadas en este proceso a menos que se analicen las actividades enzimáticas. Además, la conexión entre los análisis plasmáticos y enzimáticos aporta una mejor comprensión de la capacidad de los tejidos a la hora de exportar/importar metabolitos en una situación de estrés.

Aunque los parámetros plasmáticos tales como la glucosa, el lactato y el cortisol son buenos indicadores de estrés bajo condiciones de estrés agudo y/o en situaciones a corto plazo (Herrera et al., 2009a,b, 2012; Vargas-Chacoff et al., 2011), a menudo no varían en situaciones de estrés crónico (Ellis et al., 2002; Sammouth et al., 2009; Santos et al., 2010; Herrera et al., 2012). Este hecho puede deberse a que las situaciones de estrés crónico pueden inducir la inhibición de la respuesta al estrés endocrino causada por una hiporregulación de la hormona adrenocorticotropa y/o los receptores del cortisol (Wendelaar Bonga, 1997; Santos et al., 2010).

Existen muy pocos trabajos que hayan evaluado las actividades enzimáticas en peces planos en condiciones adversas y la mayoría de ellos se han centrado en la osmorregulación, en procesos relacionados con la alimentación (por ejemplo, inanición, re-alimentación) o una combinación de ambos estresores (Harvis y Ballantyne, 2003; Sangiao-Alvarellos et al., 2003; Kirchner et al., 2005; Sangiao-

Alvarellós et al., 2005; Polakof et al., 2006). Sólo Sangiao-Alvarellós et al. (2005) han estudiado los efectos de la densidad de cultivo sobre el metabolismo de carbohidratos en la dorada (*Sparus aurata*), aunque éste no fue un experimento de larga duración, por lo que no se consideró una situación de estrés crónico. Por lo tanto, no existen hasta el momento estudios a largo plazo sobre cómo la densidad de cultivo afecta a la actividad enzimática en especies del orden Pleuronectiformes. Sin embargo, la expresión génica de algunas enzimas ha sido descrita como indicadores de estrés crónico en algunos peces expuestos a toxinas (Almeida et al., 2002; Albertsson et al., 2007; Smith et al., 2007).

La acedía (*Dicologlossa cuneata*) es un pez plano que presenta un comportamiento muy activo en cautividad, nadando continuamente en el tanque y mostrando altos valores basales de cortisol (Herrera, 2008). Basándonos en su cultivo experimental llevado a cabo en el Centro IFAPA “Agua del Pino”, podríamos considerarla como una especie potencial para la acuicultura debido a su alta tasa de crecimiento y fecundidad. En experimentos de corta duración con juveniles de acedía, éstos presentaron estrés producido por alta densidad de cultivo, aunque este estresor no fue tan significativo como el shock osmótico (Herrera et al., 2009a,b). En ambos trabajos, los efectos de los estresores no afectaron en ningún caso al crecimiento y la supervivencia, debido principalmente a la corta duración de los ensayos. Además, no se evaluaron las actividades enzimáticas, por lo que las principales vías metabólicas bajo situaciones de estrés no pudieron ser claramente identificadas.

En el presente estudio se han evaluado los efectos de diferentes densidades de cultivo sobre la biometría, la supervivencia y el estado fisiológico de la acedía (*D. cuneata*), centrándose en los cambios en el sistema de respuesta al estrés y en el metabolismo intermedio, con el objetivo de determinar un indicador de estrés crónico para esta especie.

## 2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.2.1. Condiciones experimentales

Los peces (peso:  $0.21 \pm 0.02$  g; longitud total:  $5.76 \pm 0.21$  cm) procedentes de puestas del stock de reproductores salvajes del IFAPA Agua del Pino (Cartaya, España), fueron distribuidos en tanques de propileno de 50 L (superficie  $0.2 \text{ m}^2$ , altura 25 cm) durante 197 días (3 réplicas por densidad de cultivo). Las densidades de cultivo experimentales (DC) fueron 250 (0.2), 500 (0.4), y 1000 (0.8) peces  $\text{m}^{-2}$  ( $\text{kg m}^{-3}$ ); BDC, MDC y ADC respectivamente. El agua fue filtrada a  $1 \mu\text{m}$  y esterilizada con UV, manteniendo el oxígeno disuelto por encima de 5 ppm por medio de piedras porosas. La calidad del agua de cultivo fue medida semanalmente mediante los kits comerciales Spectroquant (MERCK, Darmstadt, Alemania), manteniendo los siguientes valores en cada tanque experimental ( $\text{mg L}^{-1}$ ): amonio total  $<0.04$ ; nitrito total  $<0.02$ ; nitrato total  $<0.03$ . El pH ( $7.75 \pm 0.02$ ) y la salinidad ( $34.5 \pm 0.31$ ), que fueron monitorizados a través de sensores multiparamétricos. Los especímenes fueron mantenidos a una temperatura constante ( $19\text{-}20^\circ\text{C}$ ) y un fotoperíodo natural (latitud  $37^\circ 12' \text{ N}$ ; Octubre-Mayo) y fueron alimentados *ad libitum* con piensos comerciales para peces (Gemma®, Skretting, Burgos, España: 50% proteína, 20% lípidos) cuatro veces al día. La ración (1-3% de la biomasa del tanque) fue ajustada diariamente, dependiendo de la comida sobrante en los tanques.

Los experimentos cumplieron las Directrices del Consejo de la Unión Europea (2010/63 / EU) y del Gobierno español (RD1201 / 2005, RD53 / 2013 y 32/2007) para el uso de animales de laboratorio.

### 2.2.2. Metodología de muestreo

Para el muestreo biométrico (días 0, 22, 38, 55, 90, 120, 155 y 197), los peces fueron anestesiados con  $0.2 \text{ mL L}^{-1}$  de 2-fenoxietanol y se determinó el peso y la longitud total. Debido a que la acedía es muy sensible a la manipulación y al muestreo

(Herrera, 2008), no se realizó ningún muestreo intermedio de tejido y/o sangre. La supervivencia se registró diariamente durante la limpieza del tanque. Al final del experimento, los especímenes (n=20 por tratamiento) fueron extraídos de los tanques y sacrificados con una sobredosis de anestésico (1 mL L<sup>-1</sup> de 2-fenoxietanol) para llevar a cabo la toma de muestras. El tiempo entre la captura y la muerte de los peces fue inferior a 1 minuto. La sangre se recogió por punción del pedúnculo caudal en jeringas heparinizadas de 1 ml (25000 unidades de heparina de amonio/3 ml de solución salina al 0.9% de NaCl, Sigma, Aldrich, Madrid, España, H6279). El plasma fue separado de las células sanguíneas por centrifugación (3 minutos, 10000 g, 4°C), se congeló instantáneamente en N<sub>2</sub> líquido y se almacenó a -80°C hasta el posterior análisis de los parámetros metabólicos (glucosa, lactato, triglicéridos y proteínas) y hormonales (cortisol).

El hígado de cada pez (Figura 2.1), extraído y pesado para calcular el índice hepatosomático (IHS), se congeló en N<sub>2</sub> líquido y se almacenó a -80 ° C hasta el análisis. Se extrajeron muestras de músculo de la región dorsal, entre las aletas dorsal y pectoral (por encima de la línea lateral) del lado ocular y se congelaron y almacenaron siguiendo el mismo procedimiento empleado para las muestras hepáticas. Se calcularon las siguientes variables biométricas: tasa de crecimiento específico (SGR), índice hepatosomático (IHS) y factor de condición (K):

$$SGR (\% \text{ día}^{-1}) = 100 \cdot (\ln P_f - \ln P_o) \cdot t^{-1}$$

$$K = PC \cdot LT^{-3}$$

$$IHS = 100 \cdot (PH \times PC^{-1})$$

donde P<sub>f</sub> y P<sub>o</sub> son la media de los pesos final e inicial (por tanque), t el tiempo (días), PH el peso individual del hígado y PC y LT el peso corporal individual y la longitud total.



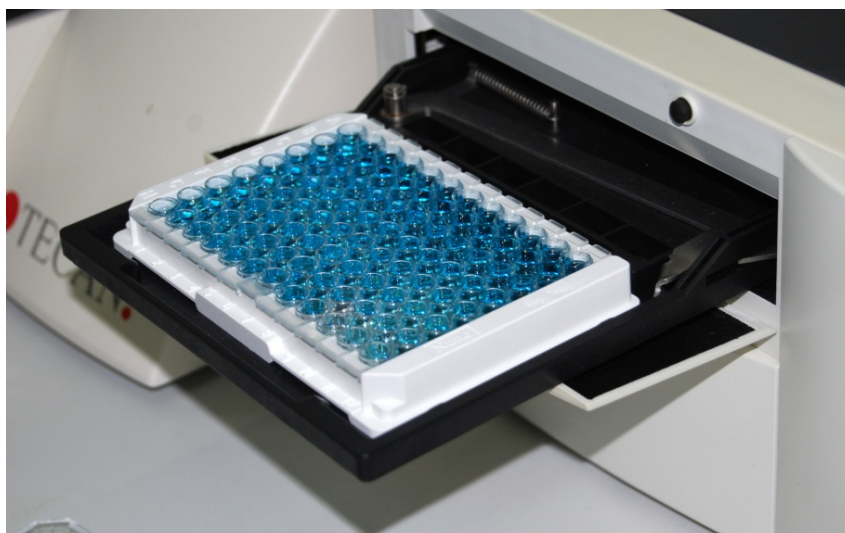
**Figura 2.1.** Extracción de hígado de juvenil de acedía.

### 2.2.3. Análisis plasmático

Los niveles de glucosa plasmática, lactato y triglicéridos se midieron utilizando kits comerciales de Spinreact (Glucosa-HK Ref. 1001200, Lactato Ref. 1001330, Triglicéridos Ref. 1001310) adaptados a microplacas de 96 pocillos. Las proteínas plasmáticas se determinaron en muestras de plasma diluido 1:5 con el kit QCA Total Proteins (Química Clínica Aplicada S.A., Barcelona, España). Todos los ensayos se realizaron con un lector de microplacas Tecan Sunrise, utilizando el software Magellan v2.5 para Windows (Tecan Austria, Salzburg, Austria) (Figura 2.2).

Los niveles plasmáticos de cortisol se cuantificaron usando un kit ELISA (EA65, Oxford Biomedical Research, MI, EE.UU.) modificado y adaptado para peces. El cortisol se extrajo de 20  $\mu\text{L}$  de plasma en 200  $\mu\text{L}$  de éter dietílico. El límite inferior de detección (81% de unión) fue de 0.1  $\text{ng mL}^{-1}$  de plasma. El coeficiente de variación inter-ensayo fue del 9.8%, mientras que el coeficiente medio de variación intra-ensayo fue del 4.6%. El porcentaje medio de recuperación fue del 90%. La linealidad se comprobó mediante una serie de diluciones obtenidas a partir de una muestra de plasma conocida (10  $\text{ng mL}^{-1}$ ) en plasma desprovisto de cortisol: previamente incubadas durante 24 horas con carbón activo (C5385, Sigma Chemical, St Louis, MO, EE.UU.), centrifugadas y filtradas. El coeficiente de correlación entre el cortisol teórico (calculado a partir de las

diluciones) y medido fue 0.970. Las principales reactividades cruzadas (>1%, dadas por el proveedor) fueron detectadas con prednisolona (47.4%), cortisona (15.8%), 11-desoxicortisol (15%), prednisona (7.8%), 6- $\beta$ -hidroxicortisol (1.37%), 17-hidroxiprogesterona (1.36%) y corticosterona (4.81%).



**Figura 2.2.** Lector de microplacas Tecan Sunrise.

#### 2.2.4. Evaluación de la actividad enzimática

Los tejidos utilizados para la evaluación de las actividades enzimáticas (músculo e hígado) se homogeneizaron por sonicación con 10 volúmenes de solución tampón que contenía 50 mmol L<sup>-1</sup> de HCl (pH 7.5), 15 mmol L<sup>-1</sup> de 2-mercaptoetanol, 100 mmol L<sup>-1</sup> de KF, 5 mmol de L<sup>-1</sup> de EDTA, 5 mmol de L<sup>-1</sup> EGTA y un cóctel inhibidor de proteasa (Sigma Aldrich, Madrid, España, P-2714). El homogeneizado se centrifugó (30 minutos a 10000 g, Eppendorf 5415R) y el sobrenadante se utilizó en los ensayos enzimáticos. Las actividades enzimáticas se determinaron utilizando un espectrofotómetro (PowerWave™ 340, BioTek Instruments, Winooski, VT, EE.UU.) con el Software de Análisis de Datos KCjunior para Microsoft® Windows XP. Las velocidades de reacción de las enzimas se determinaron por cambios en la absorbancia de NAD(P)H a 340 nm. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de homogeneizados (15  $\mu$ L) a una concentración de proteína preestablecida, omitiendo el sustrato en pocillos de control (volumen final de 275-295  $\mu$ L) y permitiendo que las

reacciones prosiguieran a 25°C durante unos tiempos preestablecidos (5-15 minutos). Los niveles de proteína se ensayaron por triplicado como en las muestras de plasma. Los análisis enzimáticos se realizaron bajo condiciones que cumplieran los requisitos para velocidades óptimas, según Arjona et al. (2009). Las condiciones específicas para las mediciones de las actividades de hexoquinasa (HK; EC 2.7.1.11), glutamato deshidrogenasa (GDH; EC 1.4.1.2), gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH; EC 1.1.1.8) y lactato deshidrogenasa (LDH; EC 1.1.1.27) fueron las descritas en la bibliografía (Sangiao-Alvarellos et al., 2003; Sangiao-Alvarellos et al., 2005; Polakof et al., 2006; Laíz-Carrión, 2004; Polakof, 2008; Vargas-Chacoff et al., 2009). En resumen, las soluciones de incubación y sustratos (todos ellos fueron adquiridos en Sigma Chemical) se presentan en la Tabla 2.1.

| ENZIMAS | SOLUCIÓN DE INCUBACIÓN                                                         | SUSTRATO                     |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| HK      | Imidazol 50 mM (pH=8)<br>MgCl <sub>2</sub> 5 mM<br>NADP 0.15 mM<br>ATP 1 mM    | Glucosa 5 mM                 |
| GDH     | Imidazol 50 mM (pH=7.8)<br>Acetato de amonio 250 mM<br>NADH 0.1 mM<br>ADP 1 mM | Ácido α-cetoglutarico 0.5 mM |
| LDH     | Imidazol 50 mM (pH=8.5)<br>DADP 2.5 mM,                                        | Ácido láctico 2.95 mM        |
| G3PDH   | Imidazol 50 mM (pH=7.6)<br>NADH 0.15 mM                                        | Dihidroxiacetona 0.2 mM      |

**Tabla 2.1.** Condiciones específicas para el ensayo de las enzimas utilizadas en este estudio.

#### 2.2.5. Análisis estadístico

Los datos están representados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Las diferencias entre grupos fueron detectadas mediante los tests ANOVA y Duncan como *post hoc* cuando se cumplieron los criterios de normalidad y homoscedasticidad y los tests de Kruskal-Wallis o Mann-Whitney para el resto. La normalidad y la homoscedasticidad se verificaron por medio de las pruebas de Shapiro-

Wilk y Levene, respectivamente. El método de Kaplan–Meier y el test de Cox–Mantel se usaron para comparar las diferentes distribuciones de supervivencia. Las relaciones entre el peso corporal y el tiempo se representaron gráficamente y se ajustaron a la ecuación de curva mediante el método MLE (Estimación de Máxima Probabilidad).

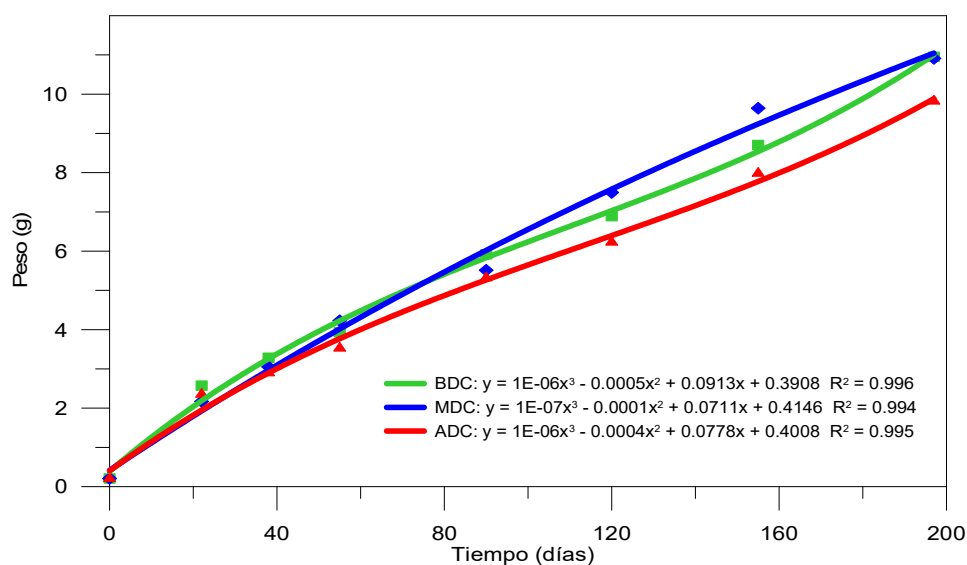
### 2.3. RESULTADOS

Los datos sobre los parámetros biométricos y de supervivencia se presentan en la Tabla 2.2. La Gráfica 2.1 muestra el crecimiento para cada densidad de cultivo y la variación de supervivencia aparece en la Gráfica 2.2. Las curvas de crecimiento fueron muy similares entre las distintas densidades y todas fueron ajustadas a una ecuación polinomial cúbica con altos coeficientes de correlación (Gráfica 2.1). La SGR no mostró diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 2.2), aunque varió entre 1.85% y 2.10% día<sup>-1</sup> (mínimo y máximo para todos los tratamientos). Para el resto de parámetros biométricos relacionados con el crecimiento (peso corporal y longitud total) tampoco se observaron diferencias significativas. Sin embargo, los valores de IHS fueron estadísticamente diferentes entre densidades extremas, siendo el más bajo para ADC (0.62 ± 0.04%) y el más alto para BDC (0.9 ± 0.06%) (Tabla 2.2).

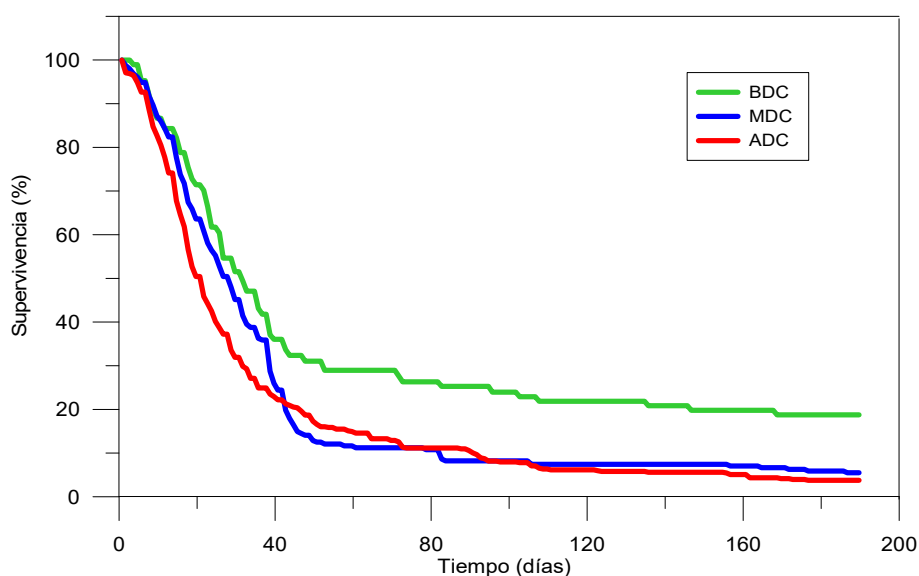
|                            | BDC                      | MDC                      | ADC                      |
|----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Peso inicial (g)           | 0.21 ± 0.02              | 0.21 ± 0.02              | 0.21 ± 0.02              |
| LT inicial (cm)            | 5.76 ± 0.21              | 5.76 ± 0.21              | 5.76 ± 0.21              |
| Peso final (g)             | 11.0 ± 1.11              | 10.9 ± 0.99              | 9.82 ± 0.82              |
| LT final (cm)              | 10.2 ± 0.32              | 10.5 ± 0.28              | 10.2 ± 0.34              |
| SGR (% día <sup>-1</sup> ) | 2.04 ± 0.03              | 1.92 ± 0.05              | 1.94 ± 0.05              |
| Supervivencia (%)          | 18.8 ± 1.70 <sup>a</sup> | 5.50 ± 1.24 <sup>b</sup> | 3.78 ± 0.45 <sup>b</sup> |
| K                          | 9.63 ± 0.41              | 7.85 ± 0.54              | 8.94 ± 0.50              |
| IHS (%)                    | 0.90 ± 0.06 <sup>a</sup> | 0.84 ± 0.06 <sup>a</sup> | 0.62 ± 0.04 <sup>b</sup> |

**Tabla 2.2.** Supervivencia y datos biométricos (media ± SEM, n=10) para cada densidad de cultivo (BDC: baja densidad de cultivo; MDC: media densidad de cultivo; ADC: alta densidad de cultivo). LT: longitud total; SGR: tasa de crecimiento específico; K: factor de condición; IHS: índice hepatosomático. Diferentes letras en superíndices indican diferencias significativas (p<0.05).

Las curvas de supervivencia mostraron tendencias similares entre los tratamientos, disminuyendo considerablemente durante los 70-100 días para después mantenerse estables hasta el final (Gráfica 2.2). Sin embargo, la supervivencia para BDC se estabilizó en valores más altos que para los otros dos grupos. De hecho, la tasa de supervivencia final en BDC fue la más alta ( $18.8 \pm 1.70\%$ ), no observándose diferencias significativas entre MDC y ADC (Tabla 2.2).



**Gráfica 2.1.** Crecimiento (media  $\pm$  SEM; n=20) de especímenes de *D. cuneata* mantenidos bajo diferentes densidades de cultivo (BDC: baja densidad de cultivo; MDC: media densidad de cultivo; ADC: alta densidad de cultivo) durante 197 días. Cada línea fue ajustada a una ecuación cúbica (método MLE).



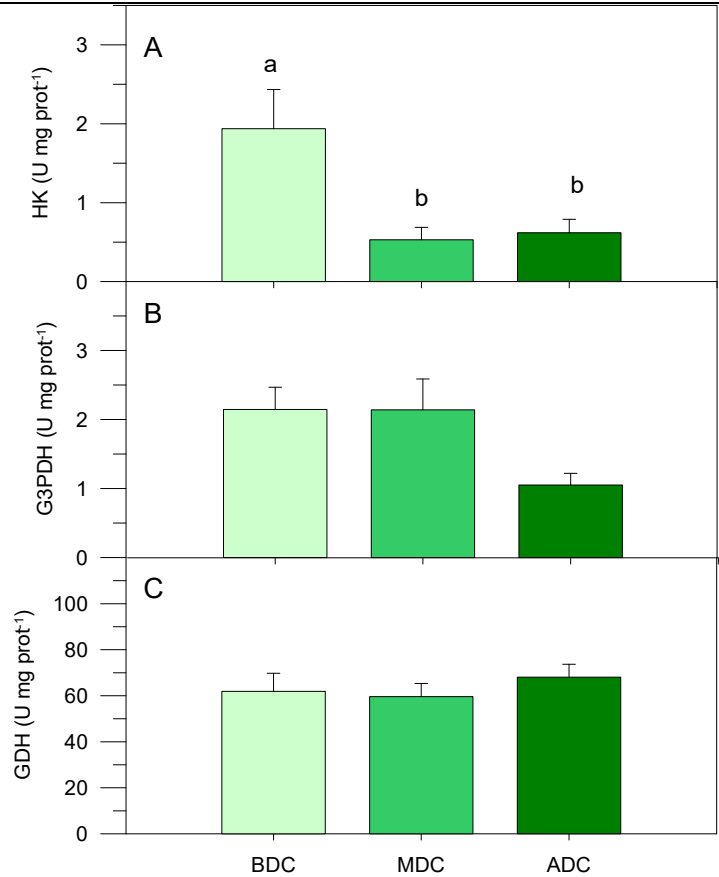
**Gráfica 2.2.** Distribución de la supervivencia registrada para especímenes de *D. cuneata* mantenidos bajo diferentes densidades de cultivo (BDC: baja densidad de cultivo; MDC: media densidad de cultivo; ADC: alta densidad de cultivo) durante 197 días.

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en lo referente al cortisol plasmático (Tabla 2.3), variando los valores entre 0.15 y 15.02 ng mL<sup>-1</sup> (valores extremos). Con respecto a los metabolitos plasmáticos (glucosa, lactato, triglicéridos y proteínas) sus valores mostraron una tendencia hacia una relación inversa con la DC, pero no se detectaron diferencias significativas (Tabla 2.3).

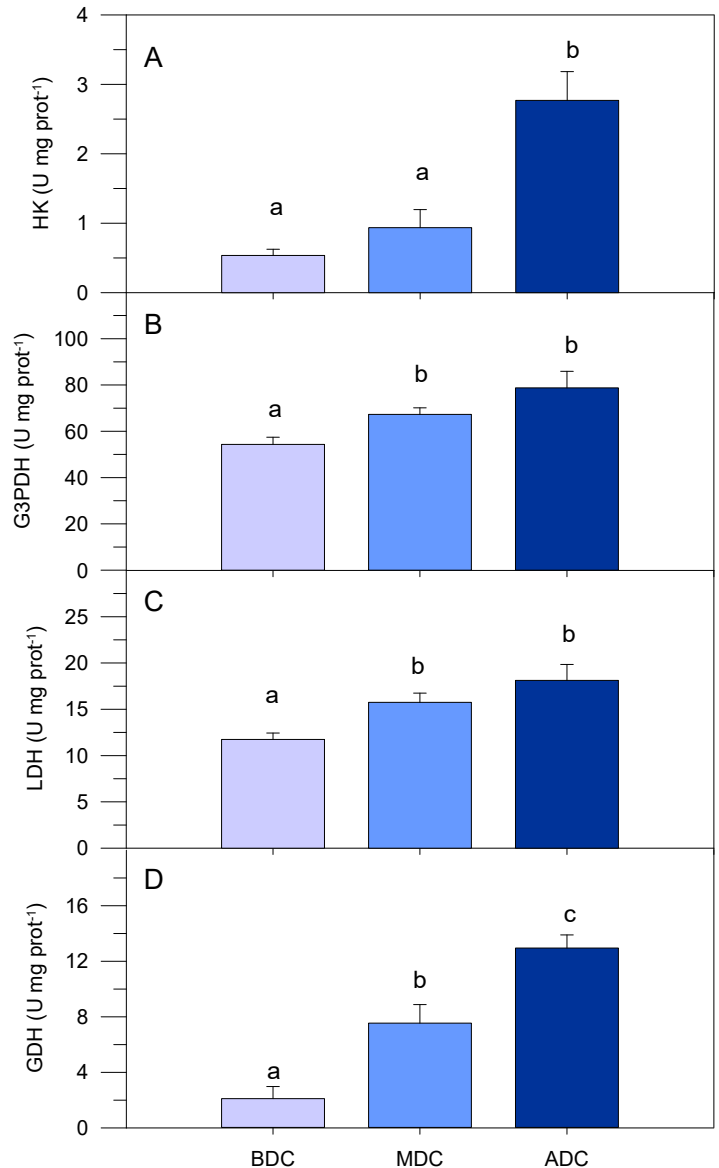
|                                  | BDC         | MDC         | ADC         |
|----------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Cortisol (ng mL <sup>-1</sup> )  | 5.04 ± 2.51 | 6.65 ± 2.99 | 5.05 ± 2.27 |
| Glucosa (mM)                     | 5.32 ± 0.85 | 3.74 ± 0.24 | 3.72 ± 0.32 |
| Lactato (mM)                     | 1.29 ± 0.02 | 1.01 ± 0.18 | 0.92 ± 0.13 |
| Triglicéridos (mM)               | 26.4 ± 2.08 | 23.0 ± 4.19 | 20.2 ± 2.72 |
| Proteínas (mg mL <sup>-1</sup> ) | 44.6 ± 13.0 | 41.6 ± 3.11 | 39.6 ± 2.88 |

**Tabla 2.3.** Cortisol y metabolitos plasmáticos (glucosa, lactato, triglicéridos y proteínas) registradas para cada densidad de cultivo (BDC: baja densidad de cultivo; MDC: media densidad de cultivo; ADC: alta densidad de cultivo). Los valores son media ± SEM. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

Sin embargo, las actividades enzimáticas, principalmente en el músculo, difirieron dependiendo de la DC. La actividad de la HK hepática fue significativamente mayor en BDC que en el resto de densidades ( $1.94 \pm 0.5$  frente a  $0.53 \pm 0.16$  y  $0.62 \pm 0.17$  U mg prot<sup>-1</sup>), mientras que no hubo diferencias para las otras enzimas evaluadas (Gráfica 2.3). En el músculo, todas las enzimas mostraron una actividad creciente (a veces significativa) en paralelo con un aumento en la DC (Gráfica 2.4). La mayor dependencia con respecto a la DC se detectó para la GDH ya que todos los grupos fueron significativamente diferentes variando los valores entre  $2.07 \pm 0.87$  y  $12.9 \pm 0.95$  U mg prot<sup>-1</sup> para BDC y ADC respectivamente.



**Gráfica 2.3.** Actividad de enzimas hepáticas (media  $\pm$  SEM; n=10) en especímenes de *D. cuneata* mantenidos bajo diferentes densidades de cultivo (BDC: baja densidad de cultivo; MDC: media densidad de cultivo; ADC: alta densidad de cultivo) durante 197 días. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).



**Gráfica 2.4.** Actividad de enzimas en músculo (media  $\pm$  SEM; n=10) en especímenes de *D. cuneata* mantenidos bajo diferentes densidades de cultivo (BDC: baja densidad de cultivo; MDC: media densidad de cultivo; ADC: alta densidad de cultivo) durante 197 días. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

## 2.4. DISCUSIÓN

Hasta la fecha, se han publicado varios trabajos sobre las respuestas al estrés en soleidos, principalmente sobre lenguado senegalés *Solea senegalensis* (Costas et al., 2008; Arjona et al., 2009; Herrera et al., 2009b; Salas-Leitón et al., 2010; Weber et al., 2011; Herrera et al., 2012b; López-Olmeda et al., 2013; Andrade et al., 2015; Benítez et al., 2017; Martín et al., 2017). Estos artículos han estudiado los efectos de ciertos estresores a través de indicadores de estrés tales como los parámetros plasmáticos y la expresión génica. Sin embargo, la actividad enzimática bajo condiciones de estrés crónico aún no ha sido analizada en peces planos.

Se ha demostrado que el aumento de la densidad de cultivo (DC) activa el sistema de respuesta al estrés, afectando negativamente a la tasa de supervivencia y al crecimiento de los peces (Ellis et al., 2002; Sangiao-Alvarellos et al., 2005; Björnsson y Ólafsdóttir, 2006; Papoutsoglou et al., 2006; Sammouth et al., 2009; Santos et al., 2010). Sin embargo, algunos estudios en salmónidos indican que la SGR no está influenciada por esta variable (Soderberg y Meade, 1987; Kjartansson et al., 1988), como también se ha descrito para el lenguado senegalés y el besugo (*Pagrus pagrus*) (Costas et al., 2008; Vargas-Chacoff et al., 2011), lo que indica que la forma en que la DC afecta al crecimiento depende directamente de la especie (Boujard et al., 2002).

La acedía en cautividad presenta problemas de patologías que pueden estar relacionados con el estrés crónico, que causan tasas de mortalidad significativas (Herrera, 2008). Herrera et al. (2009b) indicaron que el aumento de la densidad de cultivo puede ser estresante para la acedía a corto plazo (estrés agudo), por lo que esta especie podría sufrir un estrés crónico en un experimento a largo plazo. El estrés agudo induce una fase de activación en la respuesta inmune que refuerza las respuestas innatas, mientras que en situaciones de estrés crónico la respuesta inmune es reducida, lo que puede aumentar las posibilidades de que se produzca una infección (Tort, 2011). Por lo tanto, la tasa de supervivencia decreciente relacionada con la DC encontrada en nuestro trabajo podría deberse a la depresión del sistema inmune debido al estrés crónico inducido por la alta densidad. En otro soleido, el lenguado

senegalés, la DC no afectó al crecimiento ni a la supervivencia (Salas-Leiton et al., 2010). Sin embargo, los indicadores fisiológicos y moleculares han confirmado situaciones de estrés crónico en esta especie en condiciones de alta densidad de cultivo (Costas et al., 2008; Salas-Leiton et al., 2010).

Los típicos indicadores de estrés plasmático como los metabolitos (glucosa, lactato, proteínas y triglicéridos) y cortisol no variaron significativamente entre los tratamientos (Tabla 2.2), aunque en general, los valores disminuyeron mientras aumentó la densidad de cultivo. Se ha descrito que en situaciones de estrés crónico estos parámetros metabólicos no cambian debido a la aclimatación del eje hipotálamo-pituitaria-interrenal (HPI) (Montero et al., 1999; Procarione et al., 1999; Haukenes y Barton, 2004; Barton et al., 2005). La ausencia de diferencias significativas entre los grupos en relación a estos parámetros en nuestro estudio podría atribuirse a una situación similar. Sin embargo, las concentraciones más altas de metabolitos (pero no significativas) encontradas en la BDC podrían sugerir un menor uso de estos sustratos energéticos debido a que permanecen en un estado no estresado o más calmado, diferente al de las otras DC. El menor valor de IHS observado en especímenes sometidos a condiciones de ADC refuerza esta idea y sugiere un aumento en la exportación de reservas energéticas para su uso en otros tejidos como el músculo (véase más adelante). Ciertamente, en nuestro estudio no se detectaron diferencias en el cortisol plasmático en acedías sometidas a diferentes densidades, tal y como sucede en otras especies como la lubina *Dicentrarchus labrax* y la trucha arco iris *Onchorhynchus mykiss* (Ellis et al., 2002; Sammouth et al., 2009; Santos et al., 2010), lo que apoya por un lado la idea de una posible aclimatación del eje HPI, y por otro que el cortisol puede tener poco valor como indicador de estrés crónico si el bienestar es visto desde una perspectiva funcional (Ellis et al., 2012).

Con respecto a la actividad de las enzimas hepáticas, sólo la actividad HK disminuyó significativamente cuando aumentó la DC. Conde-Sieira et al. (2010) describieron la misma tendencia para la glucoquinasa, la principal hexoquinasa en el hígado, en la trucha arco iris (*O. mykiss*). Sin embargo, en dicho trabajo se encontró el patrón opuesto para la actividad HK. La mayoría de los tipos de HK (excepto la

glucoquinasa) tienen alta afinidad por la glucosa por lo que la actividad creciente de HK a una DC más baja podría estar relacionada con una alta concentración de glucosa en el hígado. El alto IHS en ese tratamiento podría apoyar esta idea. Por lo tanto, como la actividad HK cataliza la primera reacción en la glucólisis, podríamos afirmar que esta vía en el hígado aumentó a bajas densidades. Aunque el estrés generalmente aumenta la síntesis y la movilización de los sustratos energéticos a través de varias vías metabólicas (glucógenolisis, gluconeogénesis), se ha demostrado que éste también inhibe la glucólisis en el hígado (Randall et al., 1997; Mommsen et al., 1999). Esto podría explicar la relación inversa encontrada entre la densidad de cultivo y la actividad de la HK en nuestro trabajo. Por otro lado, la HK del músculo mostró el patrón opuesto al del hígado, por lo que se podría afirmar que el estrés por alta densidad de cultivo estimuló la glucólisis en el músculo, lo que sugiere una mayor demanda energética en este órgano en condiciones extremas de DC (véase más adelante).

Los resultados más notables de este trabajo se encontraron en el músculo. Hubo una clara relación directa entre las actividades enzimáticas y la DC, con diferencias significativas encontradas en la mayoría de los casos. Las enzimas analizadas son cruciales para el metabolismo intermedio, y por lo tanto los resultados sugieren que el aumento de la DC aumentó la demanda de energía en el músculo. Este aumento metabólico aparentemente tuvo lugar *in situ*, utilizando el músculo sus propios sustratos de reserva, ya que no se detectó variación en el flujo de sustancias energéticas entre los órganos (las concentraciones plasmáticas de metabolitos se mantuvieron estables entre los tratamientos).

La G3PDH es una enzima clave en el metabolismo de la glucosa, que cataliza el sexto paso de la glucólisis. En los mamíferos, la G3PDH también actúa en la endocitosis y la fusión de membrana, el transporte vesicular secretor y el control de la traducción, así como en el transporte de ARNt, la replicación del ADN y la reparación del ADN (Sirover, 2005), aunque ningún estudio ha confirmado estas funciones en los peces. Se ha demostrado que la G3PDH aumenta durante el estrés producido por el manejo y la exposición al frío en los salmónidos (Vanya Ewart et al., 2001; Driedzic y Vanya Ewart,

2004; Krasnov et al., 2005), mientras que en el bacalao (*Gadus morhua*) está implicada en el metabolismo celular durante la inanición y el desarrollo (Hall et al., 2006). Por tanto, los resultados de nuestro estudio demuestran que una alta DC estimuló la glucólisis (indicada por el aumento de la actividad de las enzimas HK y G3PDH) en el músculo, lo que podría estar relacionado con el aumento del consumo de reservas de energía debido al estrés.

La LDH es la enzima terminal de la vía de la glucólisis, que convierte de forma reversible el piruvato en lactato, y también participa en la gluconeogénesis. Se ha descrito que esta enzima es un excelente indicador de estrés, ya que muestra una mayor actividad en los tejidos aeróbicos, como el músculo, durante un déficit de oxígeno (Chatterjee et al., 2010). De hecho, la actividad de la LDH suele aumentar en peces sometidos a hipoxia (Rees et al., 2009). En nuestro estudio, el nivel de oxígeno en agua se mantuvo casi a nivel de saturación, por lo tanto la creciente actividad de la LDH en especímenes sometidos a densidades más altas no fue causada por un déficit de oxígeno. Lo más probable es que esté relacionada con una mayor actividad física de los peces durante la duración del estudio, limitando así las condiciones de oxígeno en el músculo (Verma et al., 2007). Este hecho es consistente con la continua actividad natatoria de la acedía, que nada normalmente sin descansar en el fondo de los tanques, comportamiento contrario al de otros peces planos (Herrera, 2008). Una situación de estrés podría agravar esta conducta, acelerando el metabolismo anaeróbico en el músculo.

La reacción en la que interviene la GDH juega un papel central en el metabolismo de los aminoácidos en los metazoos, participando en la producción de  $\alpha$ -cetoglutarato a partir de glutamato y viceversa. Es sabido que la síntesis de glutamato, asimilando amoníaco con  $\alpha$ -cetoglutarato (aminación reductora), es crucial para la destoxificación del amoníaco creado endógenamente a partir del catabolismo de aminoácidos y proteínas en diversos tejidos (Jürgers y Bastrop, 1995). En este sentido, Saha et al. (2002) describieron una mayor actividad de la GDH bajo estrés hiperamónico en el pez gato africano (*Clarias batrachus*), posiblemente para convertir el amoníaco acumulado en varios aminoácidos libres no esenciales. Sin embargo, en

nuestro estudio no parece ser ésta la causa de dicho aumento enzimático, ya que no se encontraron diferencias en la concentración de amoníaco entre tanques, por lo que la obtención de energía para hacer frente al estrés es una explicación más probable. Con esta mayor actividad, la energía podría obtenerse a partir del  $\alpha$ -cetoglutarato, que funciona en el ciclo de Krebs para producir ATP (Melo y Cuamazi, 2007). En este estudio, sólo la actividad de la GDH fue estadísticamente diferente entre todas las DC, y por lo tanto esta actividad podría desempeñar un papel clave en el suministro de energía para el estrés crónico en la acedía.

En conclusión, la alta densidad de cultivo a largo plazo provocó cambios significativos en las actividades enzimáticas (hexoquinasa, glutamato deshidrogenasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa) en el músculo de la acedía, aunque para las enzimas hepáticas y el cortisol y los metabolitos plasmáticos las variaciones no fueron tan evidentes. Por lo tanto, las enzimas musculares HK y GDH, las cuales muestran mayor variabilidad en relación a la densidad de cultivo, podrían ser consideradas indicadores de estrés para esta especie en situaciones de estrés crónico.

## 2.5. REFERENCIAS

- Albertsson, E., Kling, P., Gunnarsson, L., Larsson, D.G., Forlin, L. (2007) Proteomic analyses indicate induction of hepatic carbonyl reductase/20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase B in rainbow trout exposed to sewage effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **68**, 33–39.
- Almeida, J.A., Diniz, Y.S., Marques, S.F., Faine, L.A., Ribas, B.O., Burneiko, R. C., Novelli, E.L. (2002) The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environment International* **27**, 673–679.
- Andrade, T., Afonso, A., Pérez-Jiménez A., Oliva-Teles, A., de las Heras, V., Mancera, J.M. Serradeiro, R., Costas, B. (2015) Evaluation of different stocking densities in

- a Senegalese sole (*Solea senegalensis*) farm: Implications for growth, humoral immune parameters and oxidative status. *Aquaculture* **438**, 6–11.
- Arjona, F.J., Vargas-Chacoff, L., Ruiz-Jarabo, I., Gonçalves, O., Páscoa, I., Martín del Río, M.P., Mancera, J.M. (2009) Tertiary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) to osmotic challenge: Implications for osmoregulation, energy metabolism and growth. *Aquaculture* **287**, 419–426.
- Barton, B.A., Ribas, L., Acerete, L., Tort, L. (2005) Effects of chronic confinement on physiological responses of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., to acute handling. *Aquaculture Research* **36**, 172–179.
- Benítez-Dorta, V., Caballero, M.J., Betancor, M.B., Manchado, M., Tort, L., Torrecillas, S., Zamorano, M.J., Izquierdo, M., Montero, D. (2017) Effects of thermal stress on the expression of glucocorticoid receptor complex linked genes in Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Acute and adaptive stress responses. *General and Comparative Endocrinology* **252**, 173–185.
- Björnsson, B. y Ólafsdóttir, S.R. (2006) Effects of water quality and stocking density on growth performance of juvenile cod (*Gadus morhua* L.). *ICES Journal of Marine Sciences* **63**, 326–334.
- Boujard, T., Labbé, L., Aupérin, B. (2002) Feeding behaviour, energy expenditure and growth of rainbow trout in relation to stocking density and food accessibility. *Aquaculture Research* **33**, 1233–1242.
- Chatterjee, N., Pal, A.K., Das, T., Dalvi, R., Mohammad, M.S., Sarma, K., Mukherjee, S.C., Baruah, K. (2010) Effect of stocking density and journey length on the welfare of rohu (*Labeo rohita* Hamilton) fry. *Aquaculture International* **18**, 859–868.
- Conde-Sieira, M., Aguilar, A.J., López-Patiño, M.A., Míguez, J.M., Soengas, J.L. (2010) Stress alters food intake and glucosensing response in hypothalamus,

- hindbrain, liver, and Brockmann bodies of rainbow trout. *Physiology and Behavior* **101**, 483-493.
- Costas, B., Aragão, C., Mancera, J.M., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C. (2008) High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) juveniles. *Aquaculture Research* **39**, 1-9.
- Driedzic, W.R., Vanya Ewart, K. (2004) Control of glycerol production by rainbow smelt (*Osmerus mordax*) to provide freeze resistance and allow foraging at low winter water temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology B* **139**, 347–357.
- Ellis, T., North, B., Scott, A.P., Bromage, N.R., Porter, M., Gadd, D. (2002) The relationship between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *Journal of Fish Biology* **61**, 493-531.
- Ellis, T., Yildiz, H.Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M.T., Tort, L., Øverli, Ø., Martins, C.I. (2012) Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiology and Biochemistry* **38**, 163-188.
- Hall, J.R., Short, C.E., Driedzic, W.R. (2006) Sequence of Atlantic cod (*Gadus morhua*) GLUT 4, GLUT 2 and GPDH: developmental stage of expression, tissue expression and relationship to starvation-induced changes in blood glucose. *Journal of Experimental Biology* **209**, 4490–4502.
- Harvis, P.L., Ballantyne, J.S. (2003) Metabolic responses to salinity acclimation in juvenile shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*). *Aquaculture* **219**, 891–909.
- Haukenes, A.H., Barton, B.A. (2004) Characterization of the cortisol response following an acute challenge with lipopolysaccharide in the yellow perch and the influence of rearing density. *Journal of Fish Biology* **64**, 851–862.
- Herrera, M. (2008) Biología y cultivo de la acedía (*Dicologlossa cuneata* Moreau, 1881). Ph. D. Thesis. Universidad de Cádiz.

- Herrera, M., Vargas-Chacoff, L., Hachero, I., Ruiz-Jarabo, I., Rodiles, A., Navas, J.I., Mancera, J.M. (2009a) Osmoregulatory changes in wedge sole (*Dicologlossa cuneata* Moreau, 1881) after acclimation to different environmental salinities. *Aquaculture Research* **40**, 762-771.
- Herrera, M., Vargas-Chacoff, L., Hachero, I., Ruiz-Jarabo, I., Rodiles, A., Navas, J.I., Mancera, J.M. (2009b) Physiological responses of juvenile wedge sole *Dicologlossa cuneata* (Moreau) to high stocking density. *Aquaculture Research* **40**, 790-797.
- Herrera, M., Aragão, C., Hachero, I., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., Mancera, J.M., Conceição, I. (2012a) Physiological short-term response to sudden salinity change in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish Physiology and Biochemistry* **38(6)**, 1741-1751.
- Herrera, M., Ruiz-Jarabo, I., Hachero, I., Vargas-Chacoff, L., Amo, A., Mancera, J.M. (2012b) Stocking density affects growth and metabolic parameters in the brill (*Scophthalmus rhombus*). *Aquaculture International* **20(6)**, 1041-1052.
- Iwama, G.K., Afonso, L.O.B., Vijayan, M.M. (2006) Stress in fishes. In *The Physiology of Fishes* (Evans, D.H. y Clairbone, J.B., eds), pp. 319-342. Boca Raton (US), CRC Press.
- Jürss, K., Bastrop, R. (1995) Amino acid metabolism in fish. In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* (Hochachka, P.W. y Mommsen, T.P., eds.), pp. 159–189. Amsterdam, Elsevier.
- Kirchner, S., Seixas, P., Kaushik, S., Panserat, S. (2005) Effects of low protein intake on extra-hepatic gluconeogenic enzyme expression and peripheral glucose phosphorylation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **140B**: 333-340.

- Kjartansson, H., Fivelstad, S., Thommassen, J.M., Smith, M.J. (1988) Effects of different stocking densities on physiological parameters and growth of adult Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared in circular tanks. *Aquaculture* **73**, 261-274.
- Krasnov, A., Koskinen, H., Pehkonen, P., Rexroad III, C.E., Afanasyev, S., Mölsa, H. (2005) Gene expression in the brain and kidney of rainbow trout in response to handling stress. *BMC Genomics* **6**, 3.
- Laíz-Carrión, R. (2004) Osmorregulación en Dorada *Sparus aurata* L. Control Hormonal e Implicaciones Metabólicas. Ph. D. Thesis. Universidad de Cádiz.
- López-Olmeda, J. F., Blanco-Vives, B., Pujante, I. M., Wunderink, Y. S., Mancera, J. M., Sánchez-Vázquez, F. J. (2013) Daily Rhythms in the Hypothalamus-Pituitary-Interrenal Axis and Acute Stress Responses in a Teleost Flatfish, *Solea senegalensis*. *Chronobiology International* **30(4)**, 530-539.
- Martín, I., Gutierrez, J.R., Martos-Sitcha, J.A., Rasines, I., Rodríguez, C., Mancera, J.M., Chereguini, O. 2017. Prolonged emersion of *Solea senegalensis*, Kaup 1858, for its application in transport. *Aquaculture Research* **48**, 3393–3400.
- Melo, V., Cuamazi, O. (2007) *Bioquímica de los procesos metabólicos*. Mexico, Reverté Ediciones.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W. (1999) Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **9**, 211-268.
- Montero, D., Izquierdo, M.S., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J.M. (1999) High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry* **20**, 53-60.
- Papoutsoglou, S.E., Karakatsouli, N., Pizzonia, G., Dalla, C., Polissidis, A., Papadopoulou-Daifoti, Z. (2006) Effects of rearing density on growth, brain neurotransmitters

- and liver fatty acid composition of juvenile white sea bream *Diplodus sargus* L. *Aquaculture Research* **37**, 87–95.
- Polakof, S., Arjona, F.J., Sangiao-Alvarellos, S., Martín del Río, M.P., Mancera, J.M., Soengas, J.L. (2006) Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus auratus*. *Journal of Comparative Physiology* **176B**: 441-452.
- Polakof, S. (2008) Mecanismos glucosensores en cerebro y cuerpos de Brockmann de la trucha arcoiris como modelo de pez teleósteo. P. D. Thesis. Universidad de Vigo.
- Procarione, L.S., Barry, T.P., Malison, J.A. (1999) Effects of high rearing densities and loading rates on the growth and stress responses of juvenile rainbow trout. *North America Journal of Aquaculture* **61**, 91–96.
- Randall, D, Burggren, W, French, K, Eckert, R. (1997) Animal Physiology. Mechanisms and Adaptations. W.H. Freeman and Company, New York. 821 pp.
- Rees, B.B., Figueroa, Y.G., Wiese, T.E., Beckman, B.S., Schulte, P.M. (2009) A novel hypoxia-response element in the lactate dehydrogenase-B gene of the killifish *Fundulus heteroclitus*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **154**, 70–77.
- Saha, N., Dutta, S., Bhattacharjee, A. (2002) Role of amino acid metabolism in an air-breathing catfish, *Clarias batrachus* in response to exposure to a high concentration of exogenous ammonia. *Comparative Biochemistry and Physiology B* **133**, 235–250.
- Salas-Leiton, E., Anguis, V., Martín-Antonio, B., Crespo, D., Planas, J.V., Infante, C., Cañavate, J.P., Manchado, M. (2010) Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Potential effects on the immune response. *Fish and Shellfish Immunology* **28(2)**, 296-302.

- Sammouth, S., Roque d'Orbcastel, E., Gasset, E., Lemarié, G., Breuil, G., Marino, G., Coeurdacier, J.L., Fivelstad, S., Blancheton, J.P. (2009) The effect of density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) performance in a tank-based recirculating system. *Aquacultural Engineering* **40**, 72–78.
- Sangiao-Alvarellos, S., Laíz-Carrión, R., Guzmán, J.M., Martín del Río, M.P., Mígue, J.M., Mancera, J.M., Soengas, J.L. (2003) Acclimation of *S. auratus* to various salinities alters energy metabolism of osmoregulatory and nonosmoregulatory organs. *American Journal of Physiology* **285**, R897-R907.
- Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán, J.M., Laiz-Carrión, R., Mígue, J.M., Martín del Río, M.P., Mancera, J.M., Soengas, J.L. (2005b) Interactive effects of high stocking density and food deprivation on carbohydrate metabolism in several tissues of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Journal of Experimental Zoology* **303A**, 761-775.
- Sangiao-Alvarellos, S., Arjona, F.J., Martín del Río, M.P., Mígue, J.M., Mancera, J.M., Soengas, J.L. (2005c) Time course of osmoregulatory and metabolic changes during osmotic acclimation in *Sparus auratus*. *Journal of Experimental Biology* **208**, 4291-4304.
- Santos, G.A., Schrama, J.W., Mamauag, R.E.P., Rombout, J.H.W.M., Verreth, J.A.J. (2010) Chronic stress impairs performance, energy metabolism and welfare indicators in European seabass (*Dicentrarchus labrax*): The combined effects of fish crowding and water quality deterioration. *Aquaculture* **299**, 73-80.
- Sirover, M.A. (2005) New Nuclear Functions of the Glycolytic Protein, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, in Mammalian Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **95**, 45–52.
- Smith, R.W., Wang, J., Bucking, C.P., Mothersill, C.E., Seymour, C.B. (2007) Evidence for a protective response by the gill proteome of rainbow trout exposed to X-ray induced bystander signals. *Proteomics* **7**, 4171–4180.

- Soderberg, W., Meade, J.W. (1987) Effects of rearing density on growth, survival, and fin condition of Atlantic salmon. *Progressive Fish-Culturist* **49**, 280–283.
- Tort, L. (2011) Stress and immune modulation in fish. *Developmental Comparative Immunology* **35(12)**, 1366-1375.
- Vanya Ewart, K., Richards, R.C., Driedzic, W.R. (2001) Cloning of glycerol-3-phosphate dehydrogenase cDNAs from two fish species and effect of temperature on enzyme expression in rainbow smelt (*Osmerus mordax*). *Comparative Biochemistry and Physiology B* **128**, 401–412.
- Vargas-Chacoff, L., Arjona, F.J., Ruiz-Jarabo, I., Páscoa, I., Gonçalves, O., Martín del Río, M.P., Mancera, J.M. (2009) Seasonal variation in osmoregulatory and metabolic parameters in earthen pond-cultured gilthead sea bream *Sparus auratus*. *Aquaculture Research* **40**, 1279-1290.
- Vargas-Chacoff, L., Calvo, A., Ruiz-Jarabo, I., Villarroel, F., Muñoz, J.L., Tinoco, A.B., Cárdenas, S., Mancera, J.M. (2011) Growth performance, osmoregulatory and metabolic modifications in red porgy fry, *Pagrus pagrus*, under different environmental salinities and stocking densities. *Aquaculture Research* **42**, 1269-1278.
- Verma, A.K., Pal, A.K., Manush, S.M., Das, T., Dalvi, R.S., Chandrachoodan, P.P., Ravi, P.M., Apte, S.K. (2007) Persistent sublethal chlorine exposure elicits the temperature induced stress responses in *Cyprinus carpio* early fingerlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **87**, 229–237.
- Weber, R.A., Pérez-Maceira, J.J., Peleteiro, J.B., García-Martín, L., Aldegunde, M. (2011) Effects of acute exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil, MS-222, and metomidate on primary and secondary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Aquaculture* **321**, 108-112.
- Wendelaar Bonga, S.E. (1997) The stress response in fish. *Physiological Reviews* **77(3)**, 591-625.

## **CAPÍTULO 3**

### **RITMOS DE ACTIVIDAD DIARIA Y RESPUESTA AL ESTRÉS EN LA ACEDÍA (*Dicologlossa cuneata* MOREAU, 1881)**

Los resultados obtenidos en este capítulo experimental están publicados en el artículo:

**De la Roca, E., Sánchez, B., López, J.M., Herves, M.A., Canalejo A., Herrera, M. (2017) Daily activity rhythms and the stress-related response in the wedge sole (*Dicologlossa cuneata* Moreau, 1881). Physiology and Behavior 173, 272–278.**



## RESUMEN

Para conocer mejor la fisiología y el comportamiento de la acedía (*Dicologlossa cuneata* Moreau, 1881), se evaluaron sus ritmos diarios de alimentación y actividad locomotora y se compararon tres estrategias de alimentación diferentes: autodemanda (*A*), alimentación programada diurna (*D*) y alimentación programada nocturna (*N*). 450 peces divididos en tres grupos (tres repeticiones cada uno), se estudiaron durante 65 días. El grupo *A* tenía acceso libre a los comederos de autodemanda mientras que *D* y *N* fueron alimentados cuatro veces al día. Se determinaron los parámetros fisiológicos de estrés como cortisol, glucosa, lactato, proteínas y triglicéridos plasmáticos. En los tanques sometidos a autodemanda, el 91% de las demandas de alimentación se produjeron durante la fase oscura. Además, la actividad locomotora también fue mayor durante la escotofase (64% de la actividad total). Se observaron valores significativamente más altos para la tasa de crecimiento específico (SGR) y la tasa de eficiencia de alimentación (FER) en *N* (0.49 y 0.48% día<sup>-1</sup>, respectivamente), mientras que el grupo en *A* consumió mucho menos alimento que el resto y presentó una alta tasa de mortalidad (46%). Además, Los niveles de cortisol plasmático aumentaron drásticamente en *A* y *D* en comparación con *N* ( $21.8 \pm 6.1$ ,  $65.8 \pm 30.3$  y  $0.3 \pm 0.1$  ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente). En resumen, la acedía aparece como una especie con comportamientos locomotores y alimentarios nocturnos y *N* se considera la estrategia de alimentación más apropiada para su cultivo. Estos nuevos datos sobre el comportamiento y la fisiología de la acedía podrán resultar clave para futuros estudios sobre su cría en cautividad.

**Palabras clave:** estrategia de alimentación, cortisol, autodemanda, ritmos diarios, acedía.

### 3.1. INTRODUCCIÓN

El éxito del cultivo de una nueva especie en acuicultura depende en gran medida del conocimiento previo de muchos de sus rasgos comportamentales y fisiológicos. De éstos, la alimentación y su respuesta al estrés, son fundamentales. Conocer cuándo, cuánto y cómo deben alimentarse los peces cultivados es crucial ya que tiene un impacto directo sobre el bienestar de los animales, optimiza el consumo de alimento y mejora la calidad del agua. Por lo tanto, conocer el ritmo natural de alimentación de una especie es necesario para establecer un horario de alimentación adecuado y, así, optimizar su crecimiento y su eficiencia alimentaria (Azzaydi et al., 1998; Velázquez et al., 2006; Vera et al., 2006; Sánchez et al., 2009; López-Olmeda et al., 2012). Además, para mejorar el sistema de alimentación, también deben tenerse en cuenta los ciclos diarios de actividad para detectar cuando los animales están más activos.

En este sentido, se podría afirmar que la estrategia de alimentación más adecuada debería permitir que los peces obtuvieran el alimento de acuerdo con sus propias necesidades. Esto podría lograrse utilizando comederos de autodemanda. Estos sistemas de autoalimentación se han utilizado en varios estudios con el fin de evaluar el comportamiento diario de alimentación en peces (Vera et al., 2006; López-Olmeda et al., 2012; Kitagawa et al., 2015). De hecho, esta estrategia de alimentación ha proporcionado resultados exitosos en cuanto a la tasa de crecimiento, al índice de conversión y a la tasa de eficiencia alimentaria en diferentes especies como el salmón Atlántico *Salmo salar* (Paspatis et al., 1996), la lubina *Dicentrarchus labrax* (Boujard et al., 1996; Rubio et al., 2004), y la dorada *Sparus aurata* (Sánchez-Muros et al., 2003; Velázquez et al., 2006). En particular, en peces planos se han obtenido muy buenos resultados en el rodaballo *Scophthalmus maximus* (Burel et al., 1997), la platija japonesa *Verasper moseri* (Sunuma et al., 2007) y el lenguado senegalés *Solea senegalensis* (Navarro et al., 2009). Sin embargo, la capacidad de la acedía, *Dicologlossa cuneata*, para utilizar los comederos de autodemanda y sus ritmos diarios de alimentación aún se desconocen.

Se ha descrito que las diferentes estrategias de alimentación (programada vs. al azar) y el momento del día en el que se dispensa la comida afectan a la fisiología de los peces y están íntimamente relacionados con su bienestar (Vera et al., 2006; Kitagawa et al., 2015). Los primeros estudios sobre el cultivo de la acedía demostraron que ésta tiene una de las mayores tasas de crecimiento descritas para peces planos (Herrera, 2008). Sin embargo, también se observaron tasas de mortalidad significativas durante su aclimatación a la cautividad. Esto podría estar relacionado con el estrés producido por las condiciones de cultivo, como se deduce de los niveles de los parámetros fisiológicos de estrés como el cortisol y la glucosa plasmáticos (Herrera et al., 2009, 2015). No obstante, en estos estudios los peces fueron alimentados *ad libitum* utilizando alimentadores automáticos de 24 h, por lo que comieron durante todo el día sin seguir un patrón natural, hecho que podría alterar el desarrollo normal de sus funciones fisiológicas y por lo tanto favorecer la aparición de enfermedades. Hasta la fecha no se conocen los ritmos naturales de la acedía y las respuestas fisiológicas a diferentes estrategias de alimentación. Una mejor comprensión de la relación entre los patrones de alimentación y la fisiología del estrés podría reducir el estrés de esta especie en cultivo y, por consiguiente, aumentar su tasa de supervivencia.

Con el fin de obtener más información sobre el comportamiento y la fisiología de la acedía, el objetivo de este estudio fue determinar sus ritmos diarios de alimentación y de actividad locomotora. Además, se realizó un estudio comparativo de la eficiencia alimentaria y la respuesta relacionada con el estrés de tres estrategias de alimentación diferentes: autodemanda (A), alimentación programada diurna (D) y alimentación programada nocturna (N).

## 3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.2.1. Condiciones experimentales

Este estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Centro IFAPA “Agua del Pino” (Cartaya, España). Los peces se obtuvieron a partir de puestas naturales del stock de reproductores. Antes del experimento, fueron mantenidos en las instalaciones del centro, alimentados *ad libitum* por comederos automáticos de 24 horas con la misma dieta comercial usada en nuestro experimento. Para el presente trabajo, un lote de 450 acedías (peso:  $6.77 \pm 0.02$  g, longitud total:  $8.93 \pm 0.01$  cm) fue dividido al azar en nueve grupos, de 50 peces cada uno, y mantenidos durante 65 días en tanques circulares de fondo plano de 900 L ( $2.25 \text{ m}^2$  de superficie,  $0.5 \text{ kg m}^{-2}$  de densidad de cultivo). El fotoperíodo fue de 12L:12D (encendido de luces a las 8:00 h) y la temperatura del agua constante a 20 °C. El agua de mar se filtró a  $1 \mu\text{m}$  y se esterilizó con UV ( $>32 \text{ mV cm}^{-2}$ ). El oxígeno disuelto se mantuvo por encima de los  $5 \text{ mg L}^{-1}$  a través de piedras porosas. La tasa de renovación diaria del agua fue del 180%. Los peces fueron alimentados con piensos comerciales (pellets Gemma Diamond de 1.2 mm, Skretting®: 60% de proteínas, 15% de lípidos) utilizando diferentes estrategias de alimentación (ver apartado 3.2.2).

Este estudio fue diseñado y llevado a cabo de acuerdo con las Directrices del Consejo de la Unión Europea (2010/63 / EU) y del Gobierno español (RD1201 / 2005, RD53 / 2013 y 32/2007) para el uso de animales de laboratorio.

### 3.2.2. Diseño experimental

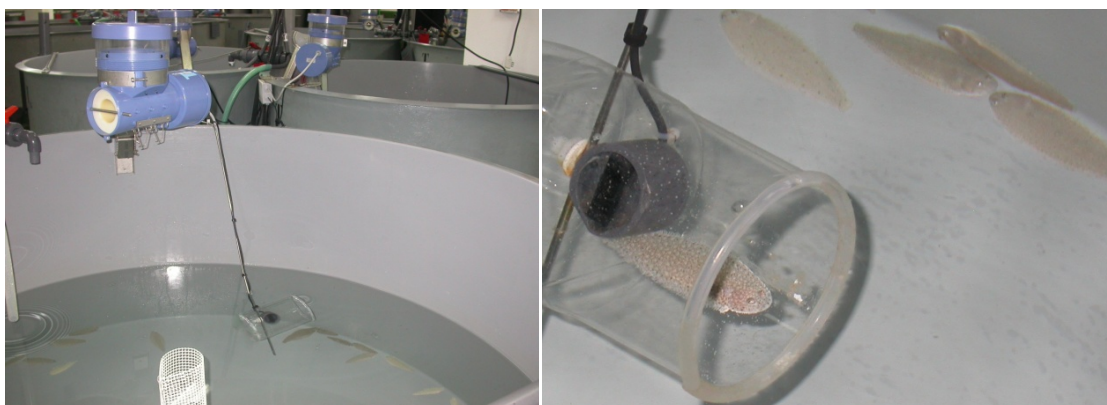
Debido a que los ritmos diarios de alimentación de la acedía no se conocían, en este estudio se probaron simultáneamente tres estrategias de alimentación diferentes: autodemanda (A), programada diurna (D) y programada nocturna (N) (3 réplicas por tratamiento). En el primer grupo (A), los peces tenían acceso libre a los comederos de autodemanda (Arvo-Tec T Drum 2000 feeder, Finlandia) (Figura 3.1).

Para activar los comederos se utilizó un sensor de infrarrojos (Innovaqua IR 020-1) colocado en la pared lateral de un cilindro horizontal de 9 cm de diámetro, situado 20 cm debajo de la superficie del agua, justo debajo del comedero. El fondo del cilindro fue retirado para evitar que los peces lo usaran como refugio y así impedir que activaran el sensor accidentalmente, según Navarro et al. (2009). Los peces debían atravesar el haz de luz del sensor para activar el comedero y cuando esto se producía se dispensaba 0.25 g de alimento inmediatamente después de cada activación. En el segundo (*D*) y tercer grupo experimental (*N*), los peces fueron alimentados por comederos automáticos programados. En la estrategia nocturna (*N*), los comederos suministraban automáticamente 1 g de alimento a las 20:30, 22:30, 00:30 y 02:30 h (1% de la biomasa del tanque, diariamente). En la diurna (*D*), se distribuyó la misma cantidad de alimento a las 8:30, 10:30, 12:30 y 14:30 h. Se realizaron pruebas preliminares para verificar la cantidad de alimento suministrado en cada tratamiento.

Con el fin de determinar los ritmos diarios de alimentación de la acedía, se registraron las demandas realizadas por los peces alimentados mediante la estrategia de autodemanda. Los comederos se conectaron a un ordenador y el número de activaciones del dispositivo se registró de forma continua. Las activaciones se agruparon en intervalos de 10 minutos. Los datos se analizaron utilizando el programa Softscada (Innovaqua) y Microsoft Excel. El comportamiento alimentario diario se calculó según el promedio de las activaciones de los comederos de autodemanda por hora en un día. Además, para evaluar la capacidad de utilizar estos comederos, se analizó la evolución del aprendizaje/actividad de autodemanda.

Por otra parte, con el fin de conocer los ciclos diarios en los que esta especie era más activa, también se estudió su actividad locomotora. En este caso, se utilizaron sensores similares a los utilizados en los comederos de autodemanda. Una fotocélula infrarroja situada a 5 cm del fondo del tanque y debajo de cada comedero, fijada a la pared con una ventosa, era activada cada vez que un pez atravesaba el haz de luz del sensor. El sensor se conectó a un ordenador para registrar el número de interrupciones del haz luminoso en intervalos de 10 minutos (Montoya et al., 2010). Como para el caso del estudio de los ritmos diarios de alimentación, los ritmos de

actividad locomotora fueron cuantificados por el promedio de las activaciones de los sensores por hora en un día. Para este estudio, se utilizó el grupo de peces alimentados por autodemanda.



**Figura 3.1.** Comedero Arvo-Tec T Drum 2000 feeder (Finlandia). Detalle del sensor de infrarrojos (Innovaqua IR 020-1) incluido en el cilindro de plástico.

### 3.2.3. Muestreo

Los peces muertos fueron contabilizados y retirados de los tanques diariamente para determinar la tasa de supervivencia (TS). El alimento restante se retiró después de cada comida y se cuantificó diariamente para calcular la ingesta total de alimentos (alimento total consumido, ATC). A los 15, 30, 45 y 65 días, tras 24 horas de ayuno, se muestrearon 30 peces por tanque para los datos biométricos (peso y longitud). Antes de los muestreos, los peces se anestesiaron con 2-fenoxietanol ( $0.2 \text{ mL L}^{-1}$ ). En el muestreo final (65 días), todos los peces muestreados fueron sacrificados con sobredosis anestésica ( $1 \text{ mL L}^{-1}$  de 2-fenoxietanol) y se tomaron muestras de sangre. Teniendo en cuenta los posibles ritmos diarios de cortisol plasmático según Oliveira et al. (2013), las muestras fueron tomadas en el mismo momento del día. El tiempo entre la captura y la muerte de los peces fue inferior a 1 minuto. La sangre fue recogida por punción del pedúnculo caudal mediante jeringas heparinizadas de 1 ml (25000 unidades de heparina con amonio/3 mL de solución salina al 0.9% de NaCl, Sigma H6279). La sangre fue centrifugada para la obtención del plasma (3 minutos, 10000 g,  $4^{\circ}\text{C}$ ), congelada de manera instantánea en  $\text{N}_2$  líquido y mantenida a  $-80^{\circ}\text{C}$

hasta el posterior análisis de metabolitos plasmáticos (glucosa, lactato, triglicéridos y proteínas) y cortisol. Se determinaron los siguientes parámetros biológicos y de alimentación: tasa de supervivencia (TS), alimento total consumido (ATC), variación de la biomasa (VB), tasa de eficiencia alimentaria (FER) y tasa de crecimiento específico (SGR), según las fórmulas:

$$TS = 100 - (M \cdot 100 / n_0)$$

$$ATC = AC - AS$$

$$VB = (P_f \cdot n_f) - (P_o \cdot n_o)$$

$$FER = (P_f - P_o) / (AC - AS)$$

$$SGR (\% \text{ día}^{-1}) = 100 \cdot (\ln P_f - \ln P_o) \cdot t^{-1}$$

donde M es la media del total de peces muertos, AC y AS son alimento suministrado y alimento sobrante (g),  $P_f$  y  $P_o$  son la media de los pesos final e inicial (g), y  $n_o$  y  $n_f$  son el número inicial y final de individuos.

#### 3.2.4. Análisis plasmático

Para estudiar la relación entre las tres estrategias de alimentación y el estrés fisiológico, se evaluaron varios marcadores de estrés plasmático. Los niveles de glucosa, lactato y triglicéridos plasmáticos se midieron usando kits comerciales de Spinreact (Glucosa-HK Ref. 1001200, Lactato Ref. 1001330, Triglicéridos Ref. 1001310) adaptados a microplacas de 96 pocillos. Las proteínas plasmáticas se determinaron en muestras de plasma diluido 1:5 (v/v) con el kit QCA Total Proteins (Química Clínica Aplicada S.A., Barcelona, España). Todos los ensayos se realizaron con un lector de microplacas Tecan Sunrise, utilizando el software Magellan v2.5 para Windows (Tecan Austria, Salzburgo).

Los niveles de cortisol plasmático se cuantificaron mediante un kit ELISA (EA65, Oxford Biomedical Research, MI, EE.UU.) modificado y adaptado para peces

(Herrera et al., 2015). El cortisol se extrajo de 20  $\mu\text{l}$  de plasma en 200  $\mu\text{l}$  de dietil éter. El límite inferior de detección (81% de unión) fue 0.1  $\text{ng mL}^{-1}$  de plasma. El coeficiente de variación entre los ensayos fue de 9.8%, mientras que el coeficiente de variación intra-ensayo medio fue del 4.6%. El porcentaje medio de recuperación fue del 90%. Se detectó reactividad cruzada principal (>1%, dada por el proveedor) para anticuerpos anti cortisol con corticosterona (3.38%), cortisona (2.08%) y desoxicorticosterona (2%).

### 3.2.5. Análisis estadístico

Los datos numéricos se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). La independencia entre grupos se garantizó mediante la selección al azar de los peces de diferentes tanques. Se realizaron transformaciones mediante la raíz del arco seno de los datos en porcentajes para lograr homogeneidad de la varianza. Las diferencias entre grupos se detectaron mediante una ANOVA de una vía para grupos normales con varianzas homogéneas y Kruskal-Wallis para el resto. La normalidad y la homoscedasticidad se analizaron a través de las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene. Las pruebas *post hoc* fueron las de Duncan y U Mann-Whitney, respectivamente.

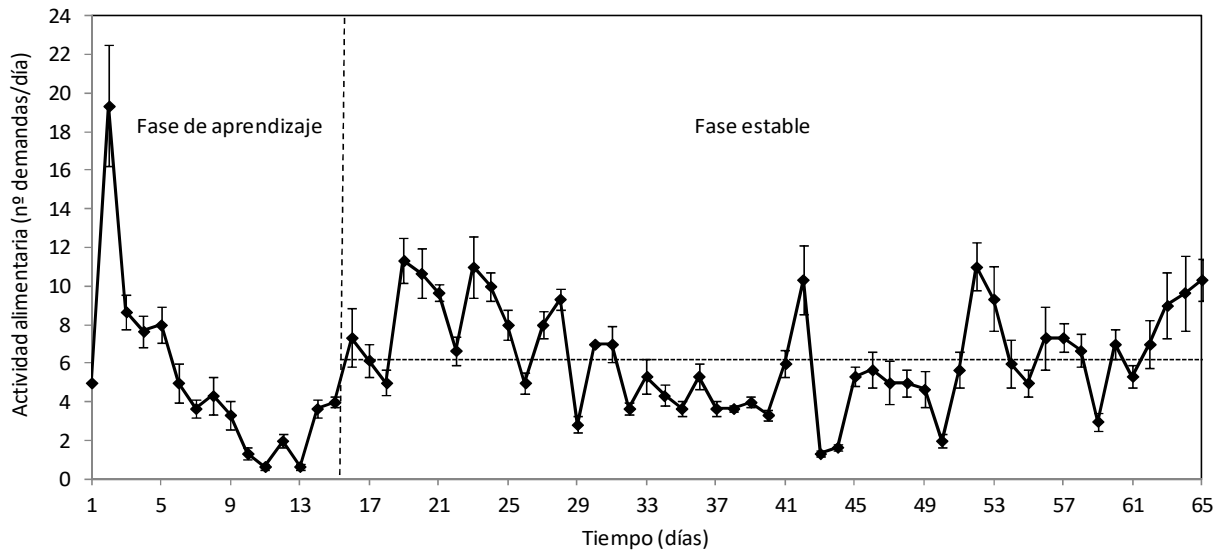
## 3.3. RESULTADOS

### 3.3.1. Ritmos diarios de alimentación

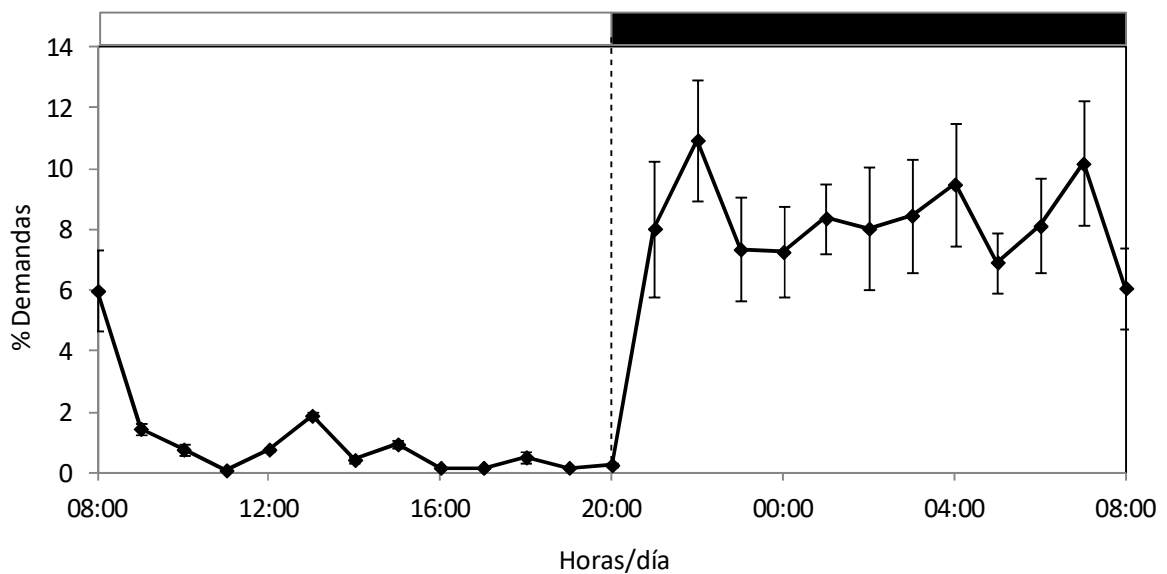
Desde el inicio del ensayo, se detectaron demandas en los tres tanques sometidos a alimentación por autodemanda. En la Gráfica 3.1 se pueden observar dos fases diferenciadas, un primer período de aprendizaje de aproximadamente dos semanas y un segundo período (fase estable) desde el día 15 hasta el final del experimento, donde las oscilaciones de las demandas se redujeron en gran medida. La demanda media diaria para la fase estable fue de  $6.6 \pm 2.7$  demandas  $\text{día}^{-1}$ .

Como se muestra en la Gráfica 3.2, la acedía mostró un claro comportamiento de alimentación nocturno. El porcentaje de demandas durante la fase oscura (20:00-

08:00 h) fue del 91%. Justo después de que las luces se apagaran (inicio de la escotofase), los peces comenzaron a demandar alimento, mostrando el pico más alto de demandas (acrofase) a las 22:00 h, y dos picos más bajos, uno a las 04:00 h y otro a las 07:00 h, justo antes del encendido de las luces.



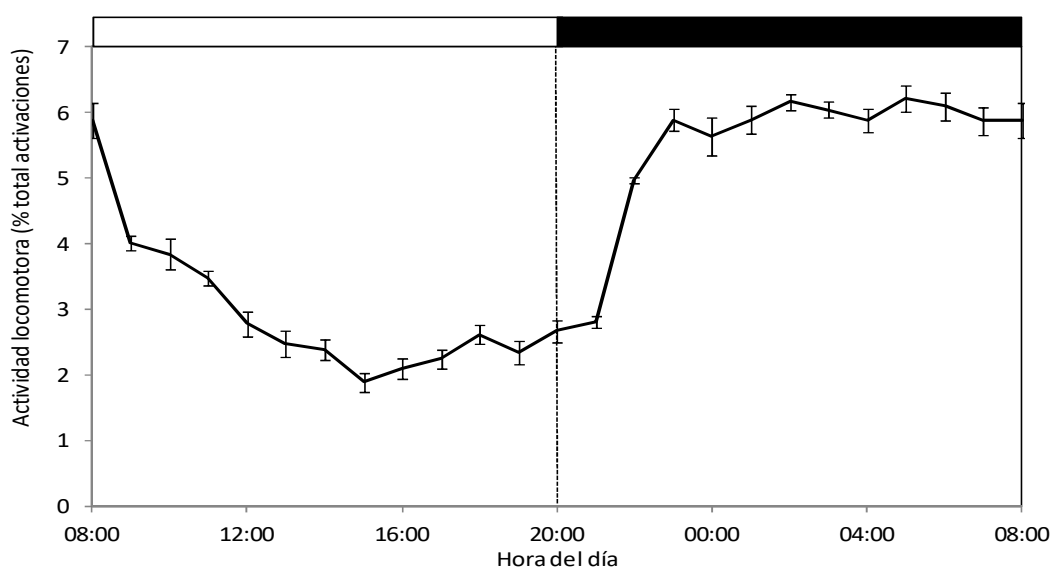
**Gráfica 3.1.** Evolución del comportamiento alimentario diario de la acedia sujeta a alimentación por autodemanda durante el período experimental (total de las demandas diarias en los tres tanques). Los valores son las medias  $\pm$  SEM de las tres réplicas.



**Gráfica 3.2.** Promedio diario de la actividad alimentaria de las acedias sometidas a alimentación por autodemanda (A). Cada punto representa el % del total de las demandas diarias por hora, por día. Las barras blancas y negras en la parte superior de las gráficas representan las fases de luz y oscuridad (12:12 LD), respectivamente. Los valores son la media  $\pm$  SEM de las tres réplicas.

### 3.3.2. Ritmos diarios de actividad locomotora

Al igual que en el caso del comportamiento alimentario, el pico de actividad en peces bajo autodemanda se observó durante la escotofase, con un aumento justo después de que las luces se apagaran a las 20:00h para luego permanecer prácticamente estables hasta que las luces se encendieron a las 8:00h (64% del total de las interrupciones del haz de luz) (Gráfica 3.3). Por lo tanto, la acedía puede considerarse como una especie con un ritmo de actividad locomotora nocturno.



**Gráfica 3.3.** Promedio diario de la actividad locomotora de la acedía sujeta a autodemanda (A). Las barras blancas y negras en la parte superior de las gráficas representan las fases de luz y oscuridad (12:12 LD), respectivamente. Cada punto representa el % de interrupciones del haz de luz del sensor por períodos de 1 h durante un ciclo de 24 h (% de actividad) y es representado como la media  $\pm$  SEM.

### 3.3.3. Parámetros biológicos y de alimentación bajo diferentes estrategias alimentarias

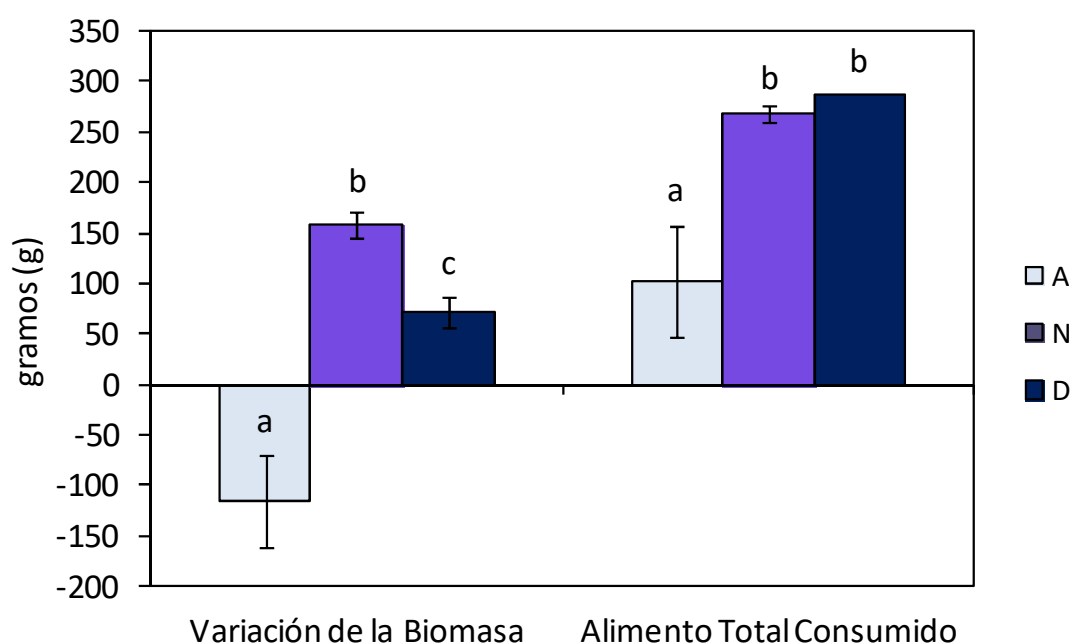
Se detectaron diferencias significativas entre las tres estrategias de alimentación: alimentación por autodemanda (A), programada diurna (D) y programada nocturna (N), para la tasa de crecimiento específico (SGR), tasa de eficiencia alimentaria (FER) y tasa de supervivencia (TS) (Tabla 3.1). Los valores más

altos de SGR y FER se observaron en el grupo *N*. Mientras que la supervivencia fue similar entre *N* y *D*, se observó una mayor mortalidad en el grupo *A* (46%).

Por otra parte, no se observó diferencia en el consumo de alimentos entre los grupos *D* y *N* (Gráfica 3.4). Por el contrario, los peces del grupo *A* consumieron mucho menos alimento. Además, el aumento de la biomasa fue mayor en los peces del grupo *N* que en el grupo *D*. En el grupo *A* este parámetro disminuyó a lo largo del estudio.

|                            | Estrategias alimentarias |                        |                        |
|----------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
|                            | Autodemanda ( <i>A</i> ) | Nocturna ( <i>N</i> )  | Diurna ( <i>D</i> )    |
| SGR (% día <sup>-1</sup> ) | < 0 <sup>a</sup>         | 0.49±0.04 <sup>b</sup> | 0.30±0.02 <sup>c</sup> |
| FER                        | < 0 <sup>a</sup>         | 0.58±0.05 <sup>b</sup> | 0.25±0.05 <sup>c</sup> |
| TS (%)                     | 56±13.6 <sup>a</sup>     | 89±1.8 <sup>b</sup>    | 87±7.7 <sup>b</sup>    |

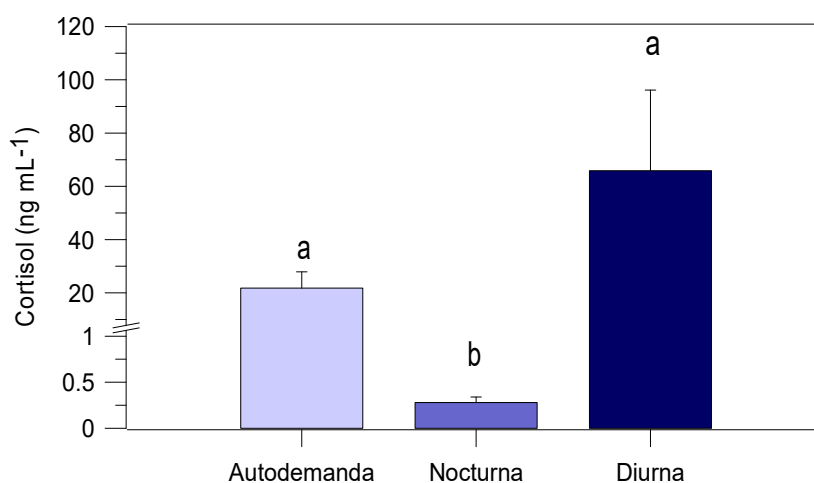
**Tabla 3.1.** Parámetros biológicos y de alimentación: tasa de crecimiento específico (SGR), tasa de eficiencia alimentaria (FER), tasa de supervivencia (TS), medidos al final del ensayo. Diferentes letras en superíndices indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ;  $n=30$ ; media  $\pm$  SEM)



**Gráfica 3.4.** Variación de la Biomasa y Alimento Total Consumido en las tres estrategias alimentarias: autodemanda (*A*), programada nocturna (*N*) y programada diurna (*D*). Diferentes letras indican diferencias significativas entre estrategias ( $P<0.05$ ;  $n=30$ ; media  $\pm$  SEM).

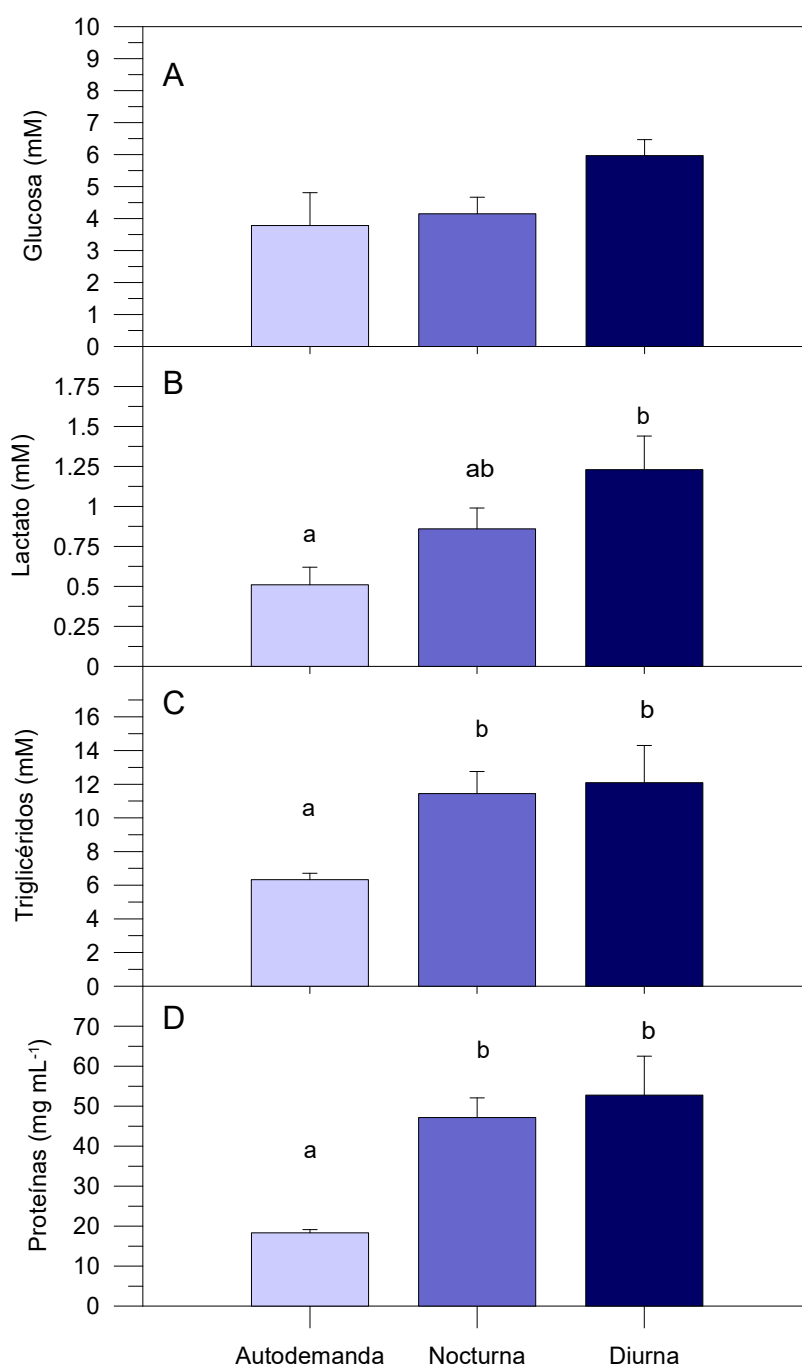
### 3.3.4. Cortisol plasmático y metabolitos

Los niveles más altos y reducidos de cortisol plasmático fueron registrados para el tratamiento diurno y nocturno, respectivamente ( $65.8 \pm 30.3$  frente a  $0.3 \pm 0.1$  ng mL<sup>-1</sup>,  $P < 0.05$ ), mientras que el cortisol medio en el grupo de peces A ( $21.8 \pm 6.1$  ng mL<sup>-1</sup>) no fue significativamente diferente al del tratamiento D (Gráfica 3.5).



**Gráfica 3.5.** Cortisol plasmático en acedias sometidas a diferentes estrategias alimentarias: Autodemanda (A), programada nocturna (N) y programada diurna (D). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ;  $n = 30$ ; mean  $\pm$  SEM).

Las concentraciones plasmáticas de glucosa (Gráfica 3.6) no mostraron diferencias significativas entre las tres estrategias de alimentación, mostrando una concentración de  $3.8 \pm 1$  mM en A,  $4.1 \pm 0.5$  mM en N y  $5.9 \pm 0.5$  mM en D. Los valores de lactato plasmático fueron  $0.5 \pm 0.1$ ,  $0.9 \pm 0.1$  y  $1.2 \pm 0.2$  mM en A, N y D, respectivamente ( $P < 0.05$ ), siendo significativamente mayor en D en comparación con A. Los niveles de triglicéridos y proteínas mostraron un patrón similar, con los valores más bajos y más altos observados en los grupos A y D, respectivamente (triglicéridos:  $6.3 \pm 0.4$ ,  $11.4 \pm 1.3$  y  $12.1 \pm 2.2$  mM y proteínas:  $18.3 \pm 0.8$ ,  $47.1 \pm 4.9$  y  $52.8 \pm 9.7$  mg mL<sup>-1</sup>, en A, N y D, respectivamente,  $P < 0.05$ ).



**Gráfica 3.6.** Metabolitos plasmáticos en acedias sometidas a diferentes estrategias alimentarias: Autodemandada (A), programada nocturna (N) y programada diurna (D). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ;  $n = 30$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ).

### 3.4. DISCUSIÓN

Uno de los principales objetivos de este estudio fue conocer el ritmo de alimentación diaria de una nueva especie prometedora en acuicultura como es la acedía *Dicologlossa cuneata*. La determinación de los patrones de la actividad alimentaria diaria requiere el uso de un sistema de alimentación que no imponga ninguna restricción temporal a las demandas de los peces, siendo éstos capaces de activar el comedero tanto en la fase de luz como en la de oscuridad, en función de su apetito (Navarro et al., 2009).

Para determinar el ritmo de alimentación de la acedía se utilizaron en este estudio y por primera vez en esta especie, comederos de autodemanda. Aunque la acedía fue capaz de activar estos comederos desde el comienzo del experimento, fueron necesarias aproximadamente dos semanas para adquirir un patrón estable de las demandas. Sin embargo, en comparación con otras especies de peces planos, necesitó menos tiempo para alcanzar esta fase estable. Por ejemplo, el rodaballo *Scophthalmus maximus* y la platija japonesa *Verasper moseri* requirieron 20 y 28 días respectivamente (Burel et al., 1997; Sunuma et al., 2007). Un estudio previo con otro soleido, *Solea senegalensis*, concluyó que la duración de esta fase de aprendizaje estaba estrechamente relacionada con el tipo de sensor utilizado (varilla, cuerda y óptico) y el número de individuos en el tanque (Navarro et al., 2009). En cuanto a la acedía, esta es la primera vez que se estudia su comportamiento alimentario, y hasta ahora sólo se ha probado el sensor óptico. Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos en el lenguado senegalés utilizando este mismo sensor fueron satisfactorios (Navarro et al., 2009), el sensor óptico también podría ser adecuado para esta estrategia de alimentación en la acedía. En cuanto al número de individuos en el tanque, pequeños grupos de lenguado senegalés (escala de laboratorio) necesitaron varios días o incluso semanas para establecer un aprendizaje asociativo, mientras que grupos más grandes (condiciones de cultivo comerciales) aprendieron a manejar los comederos de autodemanda unas horas después de la instalación del sistema (Navarro et al., 2009). Esto sugiere que el tiempo para adquirir un aprendizaje asociativo es

inversamente proporcional a la densidad de la población. La acedía en cautividad presenta problemas de patologías que podrían estar relacionados con el estrés crónico, causando tasas de mortalidad significativas (Herrera et al., 2008). Debido a que se trata de una especie en estudio y la densidad de cultivo adecuada aún no se conoce, en nuestro ensayo se utilizaron bajas densidades de cultivo para evitar posibles situaciones de estrés crónico y para asegurar la supervivencia de los peces. Este motivo podría haber retrasado el aprendizaje asociativo en nuestro estudio.

Otro hallazgo importante de este trabajo fue que la acedía mostró un claro comportamiento de alimentación nocturno (90,6% de las demandas en la escotofase). Este comportamiento es similar al de algunas especies de peces planos como *Verasper moseri* y *Solea senegalensis* (Sunuma et al., 2007; Navarro et al., 2009), pero contrario al de otras, donde el comportamiento es diurno, como *Scophthalmus maximus* (Burel et al., 1997). Nuestros resultados también sugieren que la actividad de alimentación nocturna fue coincidente con la actividad locomotora, ya que en el estudio de este comportamiento la mayoría de las interrupciones del haz de luz infrarroja ocurrieron igualmente durante la escotofase. No obstante, también se detectaron interrupciones durante la fotofase. Según Herrera et al. (2008, 2009), a pesar de ser un pez bentónico, la acedía es una especie que muestra una actividad natatoria continua a lo largo del día, a diferencia de otros pleuronectiformes como el lenguado senegalés o el rodaballo. Sin embargo, hasta la fecha no está claro si este es un comportamiento común de la acedía en su medio natural o si deriva de las condiciones de cautividad. Por otra parte, algunas especies de peces con gran plasticidad pueden modificar sus actividades de acuerdo con los ciclos ambientales (del Pozo et al., 2011). La acedía podría ser una de esas especies y dicha plasticidad le podría permitir tener cambios espontáneos de fase entre una actividad nocturna y diurna.

En este estudio también se compararon tres estrategias de alimentación, autodemanda (A), programada diurna (D) y programada nocturna (N). Los resultados indicaron que los peces del grupo N mostraron los mejores resultados en cuanto a SGR, TS y FER, en comparación con los otros grupos. Por el contrario, el grupo A presentó los peores resultados, con la mayor tasa de mortalidad y valores negativos

para SGR y FER. Con respecto a la variación de la biomasa, el grupo *N* casi duplicó el valor del grupo *D*. Esto apoya la hipótesis de algunos autores que afirman que el desconocimiento del patrón natural de alimentación diaria a la hora de diseñar una estrategia alimentaria en cautividad puede afectar negativamente al crecimiento (Madrid et al., 2001; Herrero et al., 2005; Navarro et al., 2009). Por otro lado, los resultados obtenidos con el grupo *A* sugieren que, aunque la acedía demostró su capacidad para activar los comederos de autodemanda, su uso no fue eficiente ya que los peces perdieron peso desde el inicio del experimento y presentaron una alta tasa de mortalidad (46%), a pesar de que la cantidad de alimento era adecuada y no presentaban síntomas de enfermedad. Sin embargo, cabe mencionar que incluso con esta reducción en el número de individuos, los niveles de demandas permanecieron constantes hasta el final del experimento. Esto podría deberse a la existencia de una jerarquía social en el tanque, mediante la cual un cierto grupo de individuos adquirió el rol de activar el comedero, originando éstos la mayoría de las demandas, como se ha descrito anteriormente en otras especies (Alanärä et al., 1993; Brännäs et al., 1993; Covès et al., 2006). Curiosamente, en un estudio con la lubina, Covès et al. (2006) demostraron que uno o dos peces en un grupo de 48 realizaban más del 70% del total de las activaciones. Por lo tanto, se podría pensar que en nuestro estudio las demandas continuaron porque los peces que aprendieron a autodemandar permanecieron vivos durante todo el ensayo. Sin embargo, como no fue posible identificar a los individuos que activaron los sensores, no puede descartarse que otros peces que no activaron los comederos sobrevivieran también. Además, en el estudio de Covès et al. (2009), los peces que no realizaron ninguna demanda mostraron un ligero aumento en la SGR o un mayor peso final en comparación con aquellos que demandaron en pocas ocasiones e incluso con aquellos que activaron los comederos un gran número de veces. Es importante destacar que esto coincide con nuestros resultados que demuestran que no hubo una gran diferencia de peso entre los peces sometidos a autodemanda. Debe tenerse también en cuenta que el uso adecuado de la estrategia de autodemanda y, por tanto, la optimización del crecimiento y la eficiencia alimentaria, dependen de muchos factores, incluyendo no sólo la capacidad de operar el comedero sino también de la temperatura del agua, del fotoperíodo, del

nivel de recompensa en los comederos, del contenido energético de la dieta, de la densidad de población y del dominio social (Valente et al., 2001; Rubio et al., 2004). Hasta la fecha no se ha realizado ningún trabajo que haya estudiado estos factores en la acedía. Indudablemente, sería necesario realizar estudios futuros considerándolos, antes de afirmar que este sistema de alimentación no es adecuado para esta especie.

A nivel fisiológico, el grupo A mostró valores bajos para los metabolitos plasmáticos de reserva (glucosa, lactato, triglicéridos y proteínas). Esto podría deberse a una inadecuada alimentación que no proporcionó suficientes sustratos energéticos para los procesos fisiológicos. Además, el alto nivel de cortisol (indicador de respuesta primaria al estrés) en el grupo A sugiere una situación estresante de los peces sometidos a esta estrategia de alimentación. Esto podría estar relacionado con el hecho de que bajo esta situación, el pez debe mantenerse en alerta constante para alcanzar la cantidad de alimento necesaria, lo que indicaría que tal y como describieron Kulczykowska y Sánchez-Vázquez (2010), la falta de una alimentación programada puede ser estresante y compromete el bienestar de los peces. Además, la relación inversa entre el cortisol y los metabolitos en la estrategia A podría explicarse por los siguientes motivos: 1) sufrieron una situación estresante como la alimentación al azar, que aumentó el nivel de cortisol, y 2) el estado nutricional deficiente derivado de una alimentación insuficiente disminuyó los niveles de metabolitos de reserva plasmáticos, al contrario de lo esperable en situaciones de estrés.

En relación a los metabolitos plasmáticos, la glucosa plasmática, indicador de la respuesta secundaria al estrés, no mostró un cambio significativo entre los tres grupos. Esto podría sugerir que la glucosa no es relevante para esta especie como sustrato energético durante una situación de estrés relacionada con la alimentación. Esta misma respuesta se ha observado con el lactato en acedías sometidas a otra situación de estrés diferente (Herrera et al., 2009). Sin embargo, las concentraciones plasmáticas de lactato, triglicéridos y proteínas mostraron diferencias significativas entre las estrategias programadas (con valores similares), y la estrategia de autodemanda. Las concentraciones bajas de metabolitos encontradas en A podrían deberse a una ingesta inadecuada de alimento, como se mencionó anteriormente. Por

otra parte, la ausencia de diferencias entre *D* y *N* coincide con resultados de trabajos anteriores. En este sentido, Kitagawa et al. (2015) describieron en la pacamã (*Lophiosilurus alexandri*), que las diferentes estrategias programadas ensayadas fueron capaces de optimizar la captura de alimento y los procesos digestivo y metabólico, pero no hubo diferencias entre ellas en cuanto al rendimiento y la supervivencia o los niveles de glucosa y de proteína total en plasma. Además, también se ha descrito que en situaciones de estrés crónico estos parámetros metabólicos pueden permanecer sin variación debido a una adaptación del eje de estrés HPI (hipotálamo-pituitaria-interrenal) (Herrera et al., 2015).

Por otro lado, contrariamente a los resultados aportados por el estudio de Kitagawa et al. (2015), donde no se observaron diferencias en los niveles de cortisol entre las estrategias diurna y nocturna, en nuestro trabajo encontramos que las estrategias programadas mostraron valores totalmente opuestos, detectándose el más alto en *D* y el más bajo en *N*. Según los resultados obtenidos en este estudio, la alimentación durante la fotofase es incompatible con la alimentación natural y otros ritmos biológicos de la acedía, lo que a su vez podría afectar el curso correcto de las diferentes funciones fisiológicas y el bienestar de los peces (Navarro et al., 2009). Los ritmos naturales de secreción, activación o síntesis de enzimas digestivas y/o metabólicas están estrechamente relacionados con el ritmo natural de alimentación y si este último no se considera correctamente, los ritmos fisiológicos pueden verse afectados (Sánchez-Muros, 2003). Por consiguiente, las estrategias *A* y *D* fueron claramente las más estresantes, y la primera también fue la menos eficiente.

Considerando de manera conjunta en nuestro estudio las diferentes respuestas al estrés, las estrategias que presentaron las mayores concentraciones de cortisol plasmático (*A* y *D*) indujeron una respuesta terciaria al estrés caracterizada por un déficit en el crecimiento, presentando *A* los valores más bajos de SGR. Sin embargo, no se puede afirmar que hubiera una respuesta secundaria clara ya que las concentraciones de metabolitos plasmáticos no aumentaron después de la respuesta primaria.

En resumen, nuestros resultados sugieren que los ritmos diarios de la acedía están caracterizados por una actividad nocturna. Por otra parte, aunque esta especie fue capaz de activar y usar comederos de autodemanda, este tipo de alimentación no resultó ser lo suficientemente adecuada en términos de crecimiento y bienestar. Por el contrario, la alimentación programada nocturna se asoció con los mayores niveles de eficiencia de crecimiento y los niveles más bajos de estrés y, por lo tanto, se considera como la estrategia de alimentación más adecuada para la acedía. Estos nuevos datos sobre el comportamiento y la fisiología de la acedía podrán resultar clave para futuros estudios sobre su cría en cautividad.

### 3.5. REFERENCIAS

- Alanärä, A., Brännäs, E. (1993) A test of the individual feeding activity and food size preference in rainbow trout using demand feeders. *Aquaculture International* **1**, 47-54.
- Azzaydi, M., Madrid, J.A., Zamora, S., Sánchez-Vázquez, F.J., Martínez, F.J. (1998) Effect of three feeding strategies (automatic, ad libitum demand-feeding and time-restricted demand-feeding) on feeding rhythms and growth in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* **163**, 285–296.
- Boujard, T., Jourdan, M., Kentouri, M., Divanach, P. (1996) Diel feeding activity and the effect of time-restricted self-feeding on growth and feed conversion in European sea bass. *Aquaculture* **139**, 117-127.
- Brännäs, E., Alanärä, A. (1993) Monitoring the feeding activity of individual fish with a demand feeding system. *Journal of Fish Biology* **42**, 209-215.
- Burel, C., Robin, J., Boujard, T. (1997) Can turbot, *Psetta maxima*, be fed with self-feeders?. *Aquatic Living Resources* **10**, 381-384.
- Covès, D., Beauchaud, M., Attia, J., Dutto, G., Bouchut, C., Bégout, M.L. (2006) Long-term monitoring of individual fish triggering activity on a self-feeding system:

an example using European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* **253**, 385–392.

Kitagawa, A. T., Santos Costa, L., Rosa Paulino, R., Kennedy Luz, R., Vieira Rosa, P., Guerra-Santos, B., Fortes-Silva, R. (2015) Feeding behavior and the effect of photoperiod on the performance and hematological parameters of the pacamã catfish (*Lophiosilurus alexandri*). *Applied Animal Behaviour Science* **171**, 211–218.

Kulczykowska, E. Sánchez-Vázquez, F.J. (2010) Neurohormonal regulation of feed intake and response to nutrients in fish: aspects of feeding rhythm and stress. *Aquaculture Research* **41**, 654-667.

Herrera, M., Hachero, I., Rosano, M., Ferrer, J.F., Márquez, J.M., Navas, J.I. (2008) First results on spawning, larval rearing and growth of the wedge sole (*Dicologlossa cuneata*) in captivity, a candidate species for Aquaculture. *Aquaculture International* **16**, 69–84.

Herrera, M., Vargas-Chacoff, L., Hachero, I., Ruiz-Jarabo, I., Rodiles, A., Navas, J.I., Mancera, J.M. (2009) Physiological responses of juvenile wedge sole *Dicologlossa cuneata* (Moreau) to high stocking density. *Aquaculture Research* **40**, 790–797.

Herrera, M., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., De La Roca, E., Mancera, J.M. (2015) Metabolic enzyme activities in relation to crowding stress in the wedge sole (*Dicologlossa cuneata*). *Aquaculture Research*, **46 (11)**, 2808-2818.

Herrero, M.J, Pascual, M., Madrid, J.A., Sánchez-Vázquez, F.J. (2005) Demand-feeding rhythms and feeding-entrainment of locomotor activity rhythms in tench (*Tinca tinca*). *Physiology y Behavior* **84**, 595–605.

López-Olmeda, J.F., López-García, I., Sánchez-Muros, M.J., Blanco-Vives, B., Aparicio, R., Sánchez-Vázquez, F.J. (2012) Daily rhythms of digestive physiology,

- metabolism and behaviour in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture International* **20**, 1085-1096.
- Madrid, J.A., Boujard, T., Sánchez-Vázquez, F.J. Feeding rhythms, in: D.F. Houlihan, T. Boujard, M. Jobling (Eds.), *Food Intake in Fish*, Blackwell Science Ltd., Oxford, 2001, pp. 189-215.
- Montoya, A., López-Olmeda, J.F., Yúfera, M., Sánchez-Muros, M.J., Sánchez-Vázquez, F.J. (2010) Feeding time synchronises daily rhythms of behavior and digestive physiology in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, **306** 315–321.
- Navarro, D.B., Rubio, V.C., Luz, R.K., Madrid, F.J., Sánchez-Vázquez, J.A. (2009) Daily feeding rhythms of Senegalese sole under laboratory and farming conditions using self-feeding systems. *Aquaculture* **291**, 30-135.
- Oliveira, C., Aparicio, R., Blanco-Vives, B., Chereguini, O., Martín, I., Sánchez-Vázquez, F.J. (2013) Endocrine (plasma cortisol and glucose) and behavioral (locomotor and self-feeding activity) circadian rhythms in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) exposed to light/dark cycles or constant light. *Fish Physiol. Biochem.* **39**, 479–487.
- Paspatis, M., Boujard, T. (1996) A comparative study of automatic feeding and self-feeding in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets of different energy levels. *Aquaculture* **145**, 245-257.
- del Pozo, A. Sánchez-Férez, J. A., Sánchez-Vázquez, F. J. (2011) Circadian rhythms of self-feeding and locomotor activity in zebrafish (*Danio Rerio*). *Chronobiology International* **28(1)**, 39-47.
- Rubio, V.C., Vivas, M., Sánchez-Mut, A., Sánchez-Vázquez, F.J., Covès, D., Dutto G., Madrid, J.A. (2004) Self-feeding on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) under laboratory and farming conditions using a string sensor. *Aquaculture* **233**, 393-403.

- Sánchez, J.A., López-Olmeda, J.F., Blanco-Vives, B., Sánchez-Vázquez, F.J. (2009) Effects of feeding schedule on locomotor activity rhythms and stress response in sea bream. *Physiology y Behavior* **98**, 125-129.
- Sánchez-Muros, M.J., Corchete, V., Suárez, M.D., Cardenete, G., Gómez-Milán, E., de la Higuera, M. (2003) Effect of feeding method and protein source on *Sparus aurata* feeding patterns. *Aquaculture* **224**, 89-103.
- Sunuma, T., Amano, M., Yamanome, T., Furukawa, K., Yamamori, K. (2007) Self-feeding activity of a pleuronectiform fish, the barfin flounder. *Aquaculture* **270**, 566-569.
- Valente, L.M.P., Fauconneau, B., Gomes, E.F.S., Boujard, T. (2001) Feed intake and growth of fast and slow growing strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed by automatic feeders or by self-feeders. *Aquaculture* **195**, 121-131.
- Velázquez, M., Zamora, S., Martínez, F.J. (2006) Effect of different feeding strategies on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) demand-feeding behaviour and nutritional utilization of the diet. *Aquaculture Nutrition* **12**, 403-409.
- Vera, L.M., Madrid, J.A., Sánchez-Vázquez, F.J. (2006) Locomotor, feeding and melatonin daily rhythms in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Physiology y Behavior* **88**, 167-172.

## CAPÍTULO 4

### IDENTIFICACIÓN DE *COPING STYLES* Y SU ASOCIACIÓN CON ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DEL METABOLISMO ENERGÉTICO EN ACEDÍAS (*Dicologlossa cuneata*).

Los resultados obtenidos en este capítulo experimental se encuentran en preparación para ser publicados en la revista *Physiology and Behavior* con la siguiente referencia:

**De la Roca, E., Sánchez, B., López, J., Herves, M.A., Canalejo, A., Herrera, M.**  
**Identification of *coping styles* and its association with enzyme activities of energy metabolism in wedge sole (*Dicologlossa cuneata*).**



## RESUMEN

El conocimiento de las variaciones individuales del comportamiento (*coping styles*) puede ser una herramienta muy útil para la acuicultura, ya que podría permitir adaptar las condiciones de cultivo a las diferentes personalidades y, así, disminuir el estrés en los peces y obtener una mejor producción. El objetivo principal del presente trabajo es la identificación de patrones asociados a *coping styles* en la acedía (*Dicologlossa cuneata*). Además, se ha evaluado la posible asociación entre los diferentes *coping styles* y algunas actividades enzimáticas del metabolismo energético. Tras someter a las acedías a diferentes tests (adaptación a un nuevo ambiente, del “objeto novedoso”, de agresividad y de exposición al aire), los resultados mostraron una alta variabilidad interindividual en la adaptación a un nuevo ambiente (CV= 90.92%), en la latencia para mostrar el primer intento de escape (CV= 114.14%) y en el nivel de cortisol (CV= 105.56%), demostrándose así la existencia de *coping styles* en esta especie. Se definieron dos personalidades diferentes: el grupo CS1 (individuos reactivos) y el grupo CS2 (individuos proactivos). Los peces CS1 tardaron más tiempo en recuperar el apetito, reaccionaron antes a la exposición al aire, emplearon más tiempo en intentar escapar de la red y lucharon un mayor número de veces para huir de la exposición al aire, presentando niveles de cortisol plasmático más altos tras una situación de estrés. Además, se detectaron diferencias significativas para la glucógeno fosforilasa (GPasa) que actúa en la glucógenolisis, presentando el grupo CS1 los valores más altos ( $0.80 \pm 0.17$  vs.  $0.48 \pm 0.02$  U mg prot<sup>-1</sup>). En conclusión, este estudio demuestra por primera vez la existencia de *coping style* en *Dicologlossa cuneata*, resultando efectivos los tests aplicados para esta identificación. Se observaron dos grupos bien diferenciados con respuestas comportamentales y fisiológicas específicas que se ajustan a los patrones de proactivos y reactivos. Además estos grupos demostraron diferencias en el metabolismo energético de los carbohidratos en estado basal.

**Palabras clave:** *coping style*, metabolismo energético, cortisol, personalidad, peces planos.

#### 4.1. INTRODUCCIÓN

Los peces cultivados están frecuentemente sometidos a agentes estresantes derivados de las técnicas de producción (clasificado, muestreos, labores de limpieza, altas densidades, etc.). Sin embargo, la información sobre cómo éstos afrontan dichas situaciones y cómo les afecta, considerando además aspectos de comportamiento, es escasa. Por ello, las investigaciones más recientes sobre estrés en peces no se basan únicamente en mecanismos y procesos fisiológicos, sino que también incluyen aspectos de comportamiento. De esta forma ha surgido el concepto de *coping style* (personalidad o temperamento). La mayoría de los autores coinciden en aceptar la definición descrita por Koolhaas et al. (1999) que afirma que un *coping style* es un conjunto coherente de respuestas fisiológicas y comportamentales al estrés, que es consistente en el tiempo y característico de ciertos grupos de individuos. En base a este concepto, éstos se clasifican según sus respuestas en dos grandes tipos: proactivos, aquellos individuos agresivos, que en general evitan los estímulos negativos y que presentan bajos niveles de cortisol en sangre tras ser expuestos a condiciones de estrés, y reactivos, que por el contrario presentan bajos niveles de agresión y evasión de estos estímulos negativos, presentando niveles más altos de cortisol (Brelvi et al., 2005). Este concepto ha tomado relevancia en los últimos años y los estudios basados en las variaciones individuales del comportamiento de los peces se han incrementado notablemente en numerosas especies como trucha (*Salmo trutta*) (Brelvi et al., 2005), pez gato africano (*Clarias gariepinus*) (Martins et al., 2008), halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) (Kristiansen y Ferno, 2007), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Øverli et al., 2006a,b), tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Martins et al., 2011b), lenguado (*Solea senegalensis*) (Silva et al., 2010; Martins et al., 2011a), carpa (*Cyprinus carpio*) (Huntingford et al., 2010), lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Ferrari et al., 2014) y dorada (*Sparus aurata*) (Castanheira et al., 2013a, b; Herrera et al., 2014).

Esta tendencia es debida a que el concepto de *coping style* está íntimamente relacionado con aspectos de cultivo tan importantes como el bienestar y salud de los peces y la susceptibilidad a desarrollar enfermedades (Martins et al., 2011b;

Castanheira et al., 2013b). El conocimiento de los *coping styles* puede ser una herramienta muy útil desde un punto de vista práctico para la acuicultura ya que puede facilitar el entendimiento de la capacidad adaptativa individual y la vulnerabilidad a enfermedades relacionadas con el estrés (Silva et al., 2010). Además, conocer esa individualidad puede permitir tomar medidas correctoras que optimicen el cultivo. Adicionalmente, trabajos recientes han probado que para estudios fisiológicos, una selección *a priori* de los diferentes *coping styles* facilitaría la interpretación de los datos al reducir la dispersión dentro de la población en estudio (Rey et al., 2016).

La existencia de diferencias en el metabolismo entre individuos de las mismas especie y/o población también han sido atribuidas a *coping styles* (Abrahams & Sutterlin 1999; Finstad et al. 2007; Huntingford et al., 2010; Killen et al., 2011; Martins et al., 2011a; Herrera et al., 2014). Algunos de estos estudios relacionados con el metabolismo energético se han basado en la medición del consumo de oxígeno mediante cámaras de respirometría (Martins et al., 2011a; Herrera et al., 2014). Los resultados demostraron que existían diferencias fisiológicas entre los *coping styles*, siendo los individuos que consiguieron mayor puntuación en el test de riesgo los que consumieron más oxígeno. Otros trabajos han evaluado la variación en las actividades enzimáticas de vías metabólicas relacionadas con la osmorregulación, (dorada, Laíz-Carrión et al., 2002, 2003; Sangiao-Alvarellos et al., 2003b, 2005a), el metabolismo energético (acedía, Herrera et al., 2015) o del cerebro (trucha arcoíris, Sangiao-Alvarellos et al., 2003a, 2004), bajo diferentes agentes estresantes (confinamiento, altas salinidades, altas densidades, etc.). Sin embargo, hasta el momento no existe ningún trabajo en que se haya estudiado la posibilidad de encontrar variaciones semejantes asociadas a *coping styles*.

Se ha demostrado que la acedía presenta un comportamiento en cultivo diferente al observado en pleuronectiformes afines a ella, además de valores altos de indicadores de estrés fisiológico (Herrera et al., 2014), por lo que se perfila como una interesante especie para estudios sobre respuestas fisiológicas y de comportamiento.

En ese sentido, aun no existen datos sobre la posible individualidad con respecto a comportamiento y fisiología frente a situaciones de estrés.

Por tanto, el objetivo principal del presente trabajo es la identificación de patrones asociados a *coping styles* en la acedía. Para ello, se han estudiado las respuestas integradas (fisiología y comportamiento) al estrés. Además, se ha evaluado la posible asociación entre los diferentes *coping styles* y las actividades enzimáticas del metabolismo energético.

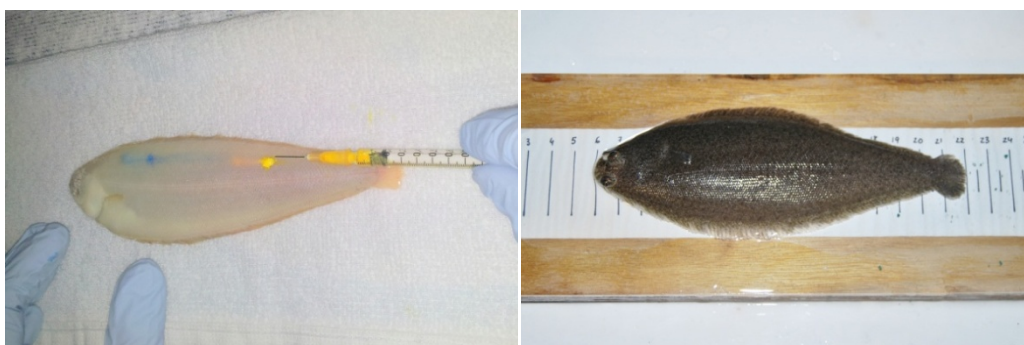
## 4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en las instalaciones del Centro IFAPA “Agua del Pino” (Cartaya, España). Se llevó a cabo en dos etapas: la primera para detectar la posible existencia de diferentes *coping styles* en la acedía y la segunda para determinar si existían diferencias en el metabolismo energético entre los posibles *coping styles*, mediante el análisis de su actividad enzimática en hígado. Todos los experimentos descritos se realizaron de acuerdo con las Directrices del Consejo de la Unión Europea (2010/63 / EU) y del Gobierno español (RD1201 / 2005, RD53 / 2013 y 32/2007) para el uso de animales de laboratorio.

### 4.2.1. Identificación de *coping styles*

Un total de 39 peces con un peso y longitud inicial de  $26.07 \pm 1.03$  g y  $13.44 \pm 0.11$  cm (media  $\pm$  SEM) fueron seleccionados al azar del tanque de alevines de las instalaciones del centro. Los individuos fueron marcados por su cara ciega con códigos de colores. Se utilizaron cinco colores diferentes de tinta para tatuaje. Los colores fueron inyectados mediante una aguja de insulina en la zona opuesta al abdomen y paralelos a la dirección del músculo y en la zona caudal (Rodiles et al., 2015) (Figura 4.1). Antes del marcaje, las acedías se anestesiaron individualmente con un baño de 2-fenoxietanol (Prolabo, VWR International, USA) a 0.2 mL/L durante 2-3 minutos. Con este procedimiento, los peces alcanzaron el estado de anestesia quirúrgica (Zahl et al.,

2012). Tras el marcaje, los peces se mantuvieron bajo condiciones de cultivo controladas durante dos semanas, hasta el inicio de los experimentos: fotoperíodo constante 12L:12D, temperatura del agua de  $20 \pm 1$  °C en circuito abierto, tasa de renovación de agua de 150% diario y alimentación *ad libitum*. Al comienzo del ensayo, cada pez se transfirió a un tanque de poliéster (250 L y 0.5 m<sup>2</sup>), subdividido en dos habitáculos mediante una plancha de PVC, y fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de cultivo (Figura 4.2). Posteriormente, siguiendo un cronograma previsto, fueron sometidos a los siguientes tests: de adaptación a un nuevo ambiente, del “objeto novedoso”, de agresividad y de exposición al aire.



**Figura 4.1.** Acedías marcadas con pinturas al agua mediante inyección subcutánea. Muestreo biométrico.

#### 4.2.2. Test de adaptación a un nuevo ambiente

Para determinar la adaptación de los peces a un nuevo ambiente se consideró la motivación a alimentarse tras ser trasladados a un entorno nuevo (Brelín et al., 2005; Martins et al., 2011c). Para ello se midió la ingesta diaria de alimento durante los primeros 14 días. Los peces fueron alimentados a mano diariamente (10:00 h), con pienso comercial (60% proteínas, 37% lípidos, 3% carbohidratos) al 1% de su masa corporal (de acuerdo con las tablas de alimentación de otras especies de peces planos suministradas por el proveedor de piensos, Skretting). La comida se distribuyó en los tanques de manera aleatoria en cada toma. Pasadas las dos primeras horas, los pellets sobrantes fueron retirados y contabilizados. El promedio de la comida ingerida se calculó en base al número de pellets consumidos por cada individuo durante los

primeros 14 días (ADAPT: nº pellets consumidos durante las dos primeras horas durante los primeros 14 días).



**Figura 4.2.** Tanques de poliéster (250 L y 0.5 m<sup>2</sup>), utilizados en los ensayos de identificación de coping style. Cada tanque está dividido en dos habitáculos.

#### **4.2.3. Test del “objeto novedoso”.**

Este test se llevó a cabo de acuerdo con el método de Castanheira et al. (2013b), a los 30 días desde la finalización del test de adaptación a un nuevo ambiente para asegurar una perfecta aclimatación de los peces. Al inicio de la prueba se colocó en el centro de un círculo de 10 cm de radio dibujado previamente en el fondo del tanque, un cilindro de PVC (3 cm diámetro x 1.5 cm altura). A partir de ese momento se contabilizaron el número de veces que el pez entraba en el área delimitada por el círculo durante 15 minutos (NENT) para un posible reconocimiento del objeto de PVC. Los peces fueron grabados mediante una cámara de vídeo durante 1.5 h (Handycam SONY DCR-SR32) para un análisis posterior de su comportamiento.

#### 4.2.4. Test de agresividad

Un mes después del test del “objeto novedoso”, un individuo de la misma especie fue introducido en el tanque (con un 50% de la biomasa del pez residente, aproximadamente). Para este test, basándonos en la metodología descrita por Brelin et al. (2005), se contabilizaron por un lado la latencia del primer ataque (LATAT) y posteriormente el número de ataques realizados por el pez residente al “intruso” (NAT) durante 3 minutos, comenzando desde el momento del primer ataque. Al igual que en el caso anterior, los peces fueron grabados con una cámara de vídeo durante 1.5 h.

#### 4.2.5. Test de exposición al aire

Tras 30 días desde la realización del test de agresividad, los peces fueron sometidos a una prueba de estrés por exposición al aire que consistió en mantener a cada pez individualmente en una red fuera del agua durante 4 minutos. En este tiempo se midieron los siguientes parámetros: latencia de escape (LATESC) o tiempo en segundos que necesitó cada pez para mostrar el primer intento de escape (los intentos de escape fueron definidos como la elevación del cuerpo desde la red), número de intentos de escape (NESC) y tiempo total empleado en los intentos de escape (TESC: tiempo total en segundos desde el primero hasta el último intento de escape) (Silva et al., 2010; Castanheira et al., 2013b). A continuación el pez era devuelto a su tanque, y tras 30 minutos se tomaron muestras individuales de sangre para medir el contenido en cortisol plasmático (CORT). La sangre era recogida por punción desde el pedúnculo caudal mediante jeringas de heparina de 1 mL (25000 unidades de heparina con amonio/3 mL solución salina 0.9% NaCl, Sigma H6279). La sangre fue centrifugada para la obtención del plasma (3 minutos, 10000 g, 4 °C), congelada de manera instantánea en N<sub>2</sub> líquido y mantenida a -80 °C hasta su posterior análisis. Previamente a la extracción de sangre, los peces eran anestesiados con 0.2 mL L<sup>-1</sup> de 2-fenoxietanol. Se mantuvieron en ayuno 24 h antes de la realización de la prueba.

#### 4.2.6. Análisis de Cortisol

Los niveles de cortisol plasmático fueron cuantificados mediante un kit ELISA (EA65, Oxford Biomedical Research, MI, USA) modificado y adaptado para peces (Herrera et al., 2014). Para ello el cortisol fue extraído desde 20  $\mu$ L de plasma en 200  $\mu$ L de dietil éter. El límite inferior de detección (81% de unión) fue 0.1 ng mL<sup>-1</sup> de plasma. El coeficiente de variación entre los ensayos fue de 9.8%, mientras que el coeficiente de variación intra-ensayo medio fue del 4.6%. El porcentaje medio de recuperación fue del 90%. La reactividad cruzada principal (>1%, dada por el proveedor) para el anticuerpo anti cortisol se detectó con corticosterona (3.38%), cortisona (2.08%) y desoxicorticosterona (2%).

#### 4.2.7. Evaluación de las actividades enzimáticas hepáticas

Una vez finalizados los tests comportamentales, los peces fueron trasladados a un tanque circular de fondo plano de 900 L y mantenidos bajo las condiciones de cultivo controladas (ver apartado 2.1). Pasado un período de dos meses, los peces fueron sacrificados con una sobredosis de anestésico (1 mL L<sup>-1</sup> de 2-fenoxetanol) y posteriormente se extrajo el hígado de cada uno de ellos y se congeló en N<sub>2</sub> líquido a -80 °C, hasta su análisis. El hígado utilizado para la evaluación de las actividades enzimáticas fue, como describió previamente Herrera et al. (2015), homogeneizado por sonicación con 10 volúmenes de tampón KF, 5 mmol L<sup>-1</sup> EDTA, 5 mmol L<sup>-1</sup> EGTA y un inhibidor de proteasas (P-2714, Sigma Aldrich, Madrid, España). El homogeneizado se centrifugó (30 minutos a 10000 g, Eppendorf 5415R) y el sobrenadante se usó en ensayos enzimáticos. Las actividades enzimáticas se determinaron utilizando un espectrofotómetro de microplacas Tecan Sunrise con el software Magellan v2.5 (Tecan Austria, Salzburgo, Austria). La velocidad de reacción de las enzimas se determinó por cambios en la absorbancia de NAD(P)H a 340 nm. Las reacciones se iniciaron mediante la adición al homogeneizado (15  $\mu$ L) a una concentración de proteína preestablecida, omitiendo el sustrato en pocillos de control (volumen final de 275-295  $\mu$ L) y permitiendo que las reacciones prosiguieran a 25 °C durante 5-15 minutos. Los análisis

enzimáticos se realizaron bajo condiciones que cumplieran los requisitos para velocidades óptimas, según Arjona et al. (2009). Las condiciones específicas para las mediciones de las actividades de Alanina aminotransferasa (AlaT, EC 2.6.1.2 ), Fructosa 6-bifosfatasa (FBPasa, EC 3.1.3.11), Glucógeno fosforilasa (GPasa, EC 2.4.1.1) y Fosfofructoquinasa (PFK, EC 2.7.1.11) fueron las descritas en la bibliografía (Sangiao-Alvarellos et al., 2003a,b; Laíz-Carrión, 2004; Sangiao-Alvarellos et al., 2005a; Polakof et al., 2006; Polakof, 2008; Vargas-Chacoff et al., 2009). En resumen, las soluciones de incubación y sustratos (todos ellos fueron adquiridos en Sigma Chemical) se presentan en la Tabla 4.1.

| ENZIMAS       | Solución de incubación                                                                                                                                                 | Enzima                                                                     | Cofactor                | Sustrato                 |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| <b>AlaT</b>   | Imidazol 50 mM (pH=7.8)<br>Piridoxal fosfato 0.025 mM<br>a-cetoglutarato 10 mM<br>NADH 0.2 mM                                                                          | 0.02 U/μL LDH                                                              | -                       | 7.5 mM Alanina           |
| <b>FBPasa</b> | Imidazol 85 mM (pH=7.7)<br>MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 5 mM<br>NADP <sup>+</sup> 0.5 mM                                                                       | 2.375 mU/μL<br>fosfoglucoasa<br>0.76 mU/μL<br>G6PDH                        | -                       | fructosa-1,6-2P<br>0.1mM |
| <b>GPasa</b>  | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM<br>MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 27 mM<br>EDTA 19.5 mM<br>AMP 2.5mM<br>NADP <sup>+</sup> 0.5 mM                           | 1 mU/μL PGM<br>0.743 mU/μL<br>G6PDH                                        | 50 mM<br>Glucosa-1,6-2P | 5 mg/ml Glucógeno        |
| <b>PFK</b>    | Imidazol 100 mM (pH=8.25)<br>KCl 50 mM<br>MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 5 mM<br>SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 4 mM<br>ATP 1mM<br>NADH 0.15 mM | 0.491 mU/μL<br>Aldolasa<br>4.916 mU/μL<br>Triosa<br>0.983 mU/μL<br>GlycPDH | 5 μM                    | 0.1 mM Fructosa-6-P      |

**Tabla 4.1.** Condiciones específicas para el ensayo de las enzimas utilizadas en este estudio.

#### 4.2.8. Análisis de datos

Todos los grupos de datos fueron analizados mediante los tests de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para comprobar la normalidad y el test de Levene para la homocedasticidad. Las relaciones entre las variables fueron investigadas

usando los coeficientes de correlación de Pearson y Spearman para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente. Al igual que Herrera et al. (2014) y Brelin et al. (2008), para clasificar los individuos en diferentes grupos o *coping styles* se usó un Análisis de Conglomerados (modelo en dos etapas, medida de log-verosimilitud de la distancia, cinco variables, dos grupos). Las diferencias entre las variables, de acuerdo con el resultado de los grupos obtenidos, se analizaron mediante una comparación de medias (t-Student) para conjuntos de datos normales y con varianzas homogéneas y un test U de Mann-Whitney para el resto. El mismo procedimiento fue utilizado para detectar diferencias entre las actividades enzimáticas analizadas. El nivel de significancia para todos los análisis estadísticos fue de 0.05. Los valores se encuentran expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM).

#### 4.3. RESULTADOS

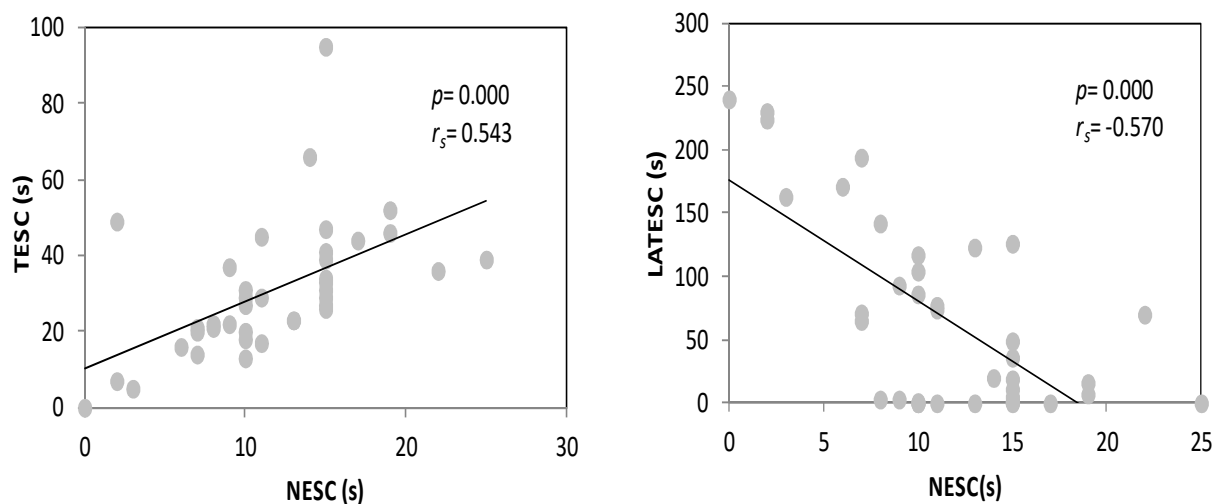
##### 4.3.1. Existencia de *coping styles*

En la Tabla 4.2 se muestran los parámetros estadísticos de cada variable correspondientes a los ensayos realizados. Tanto para el test de agresividad como para el test del “objeto novedoso”, los peces no mostraron ninguna reacción ni frente al objeto ni frente al “intruso” de la misma especie introducidos en el tanque, por lo que no se detectó ninguna respuesta. Sin embargo, se observó una alta variabilidad interindividual especialmente en la adaptación a un nuevo ambiente (CV= 90.92%), en la latencia para mostrar el primer intento de escape (CV= 114.14%) y en el nivel de cortisol (CV= 105.56%).

Las correlaciones entre las variables que se evaluaron en los test de comportamiento (variables comportamentales) se muestran en la gráfica 4.1. Los resultados obtenidos indican que existía una correlación significativa entre las variables NESC y LATESC por un lado y NESC y TESC por otro, siendo negativa en el primer caso y positiva en el segundo. Para la variable ADAPT no se observó ninguna correlación.

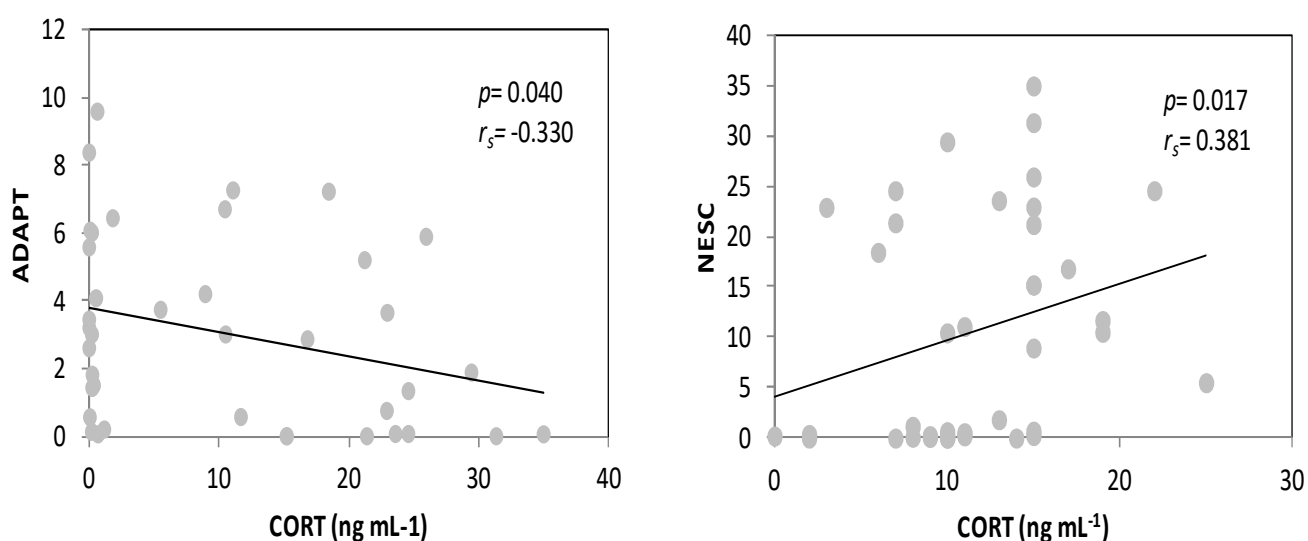
| Test   | Adaptación nuevo ambiente | Objeto novedoso | Agresividad |     | Exposición al aire |       |       |        |
|--------|---------------------------|-----------------|-------------|-----|--------------------|-------|-------|--------|
|        | ADAPT                     | NENT            | LATAT       | NAT | LATESC             | TESC  | NESC  | CORT   |
| Media  | 3.03                      | 0               | 0           | 0   | 65.20              | 30.61 | 11.61 | 10.6   |
| SD     | 2.75                      | 0               | 0           | 0   | 74.43              | 17.35 | 5.36  | 11.19  |
| SEM    | 0.44                      | 0               | 0           | 0   | 11.92              | 2.78  | 0.86  | 1.79   |
| CV     | 90.92                     | 0               | 0           | 0   | 114.14             | 56.68 | 46.21 | 105.56 |
| Mínimo | 0                         | 0               | 0           | 0   | 0                  | 0     | 0     | 0.02   |
| Máximo | 9.57                      | 0               | 0           | 0   | 240                | 95    | 25    | 34.98  |

**Tabla 4.2.** Media, desviación típica, error estándar, coeficiente de variación (%), valores máximos y mínimos de las variables consideradas en este estudio (n = 39): ADAPT: nº pellets consumidos a las 2h; NENT: nº de entradas al círculo con “objeto novedoso”; LATAT (s): latencia de ataque al “intruso”; NAT: número de ataques al “intruso”; LATESC (s): latencia de escape de la red; TESC (s): tiempo total empleado escapando; NESC: nº intentos de escape; CORT (ng mL<sup>-1</sup>): cortisol plasmático.



**Gráfica 4.1.** Gráficas de correlación entre variables comportamentales LATESC (s): latencia de escape de la red; TESC (s): tiempo total empleado escapando; NESC: nº intentos de escape; (n= 39). P: nivel de significancia,  $r_s$ : Coeficiente de correlación de Pearson.

En cuanto al cortisol plasmático (CORT) y las variables comportamentales (Gráfica 4.2), se detectaron relaciones entre las variables ADAPT (correlación negativa) y NESC (correlación positiva).



**Gráfica 4.2.** Gráficas de correlación entre variable fisiológica (CORT (ng mL<sup>-1</sup>): cortisol plasmático) y comportamentales (ADAPT: nº pellets consumidos a las 2 h y NESC: nº intentos de escape. (n= 39)). P: nivel de significancia,  $r_s$ : Coeficiente de correlación de Pearson.

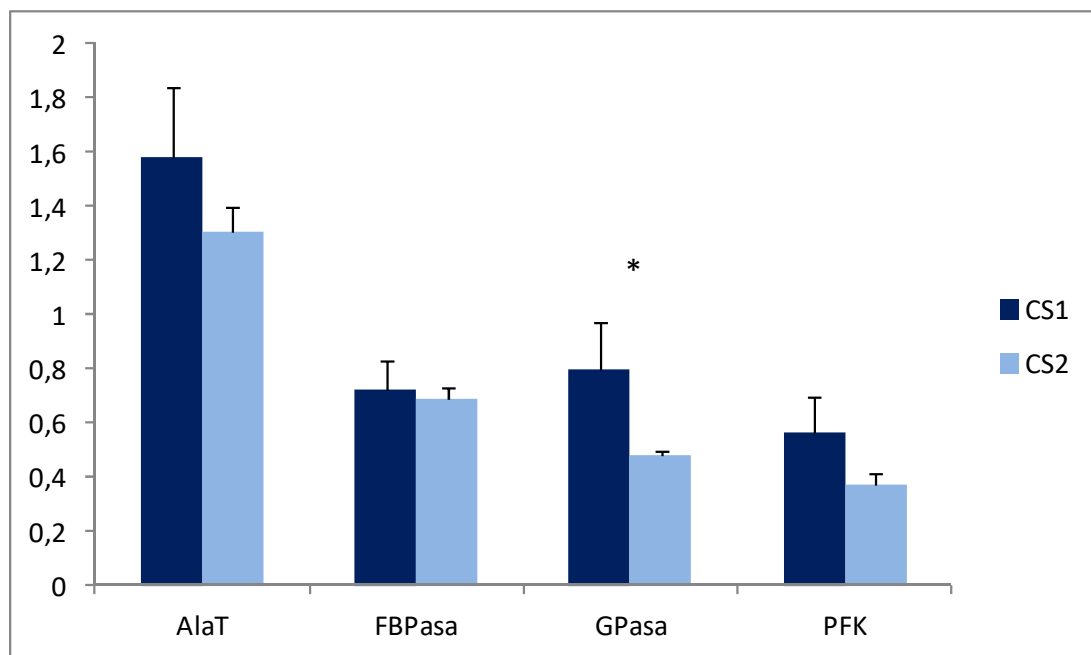
Mediante el análisis de conglomerados se obtuvieron dos grupos diferenciados de individuos que se denominaron CS1 y CS2, en relación a su comportamiento y fisiología. Como se muestra en la Tabla 4.3, los CS1, a diferencia de los CS2, emplearon menos tiempo en comenzar los intentos de escape frente a un agente estresante, mostraron más tiempo escapando de la red y mayor número de intentos de escape y presentaron mayores niveles de cortisol en sangre tras esta exposición al estresor. Sin embargo, en cuanto a la motivación al alimento tras ser transferidos a un nuevo ambiente, no se observaron diferencias entre grupos a lo largo del experimento.

|     | N  | ADAPT                     | LATESC                     | TESC                      | NESC                      | CORT                      |
|-----|----|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| CS1 | 17 | 2.322 ± 0.62 <sup>a</sup> | 21.29 ± 8.13 <sup>a</sup>  | 41.64 ± 4.22 <sup>a</sup> | 16.41 ± 0.75 <sup>a</sup> | 15.85 ± 2.60 <sup>a</sup> |
| CS2 | 22 | 3.58 ± 0.60 <sup>a</sup>  | 99.13 ± 17.05 <sup>b</sup> | 22.09 ± 2.51 <sup>b</sup> | 7.09 ± 0.72 <sup>b</sup>  | 6.55 ± 2.12 <sup>b</sup>  |

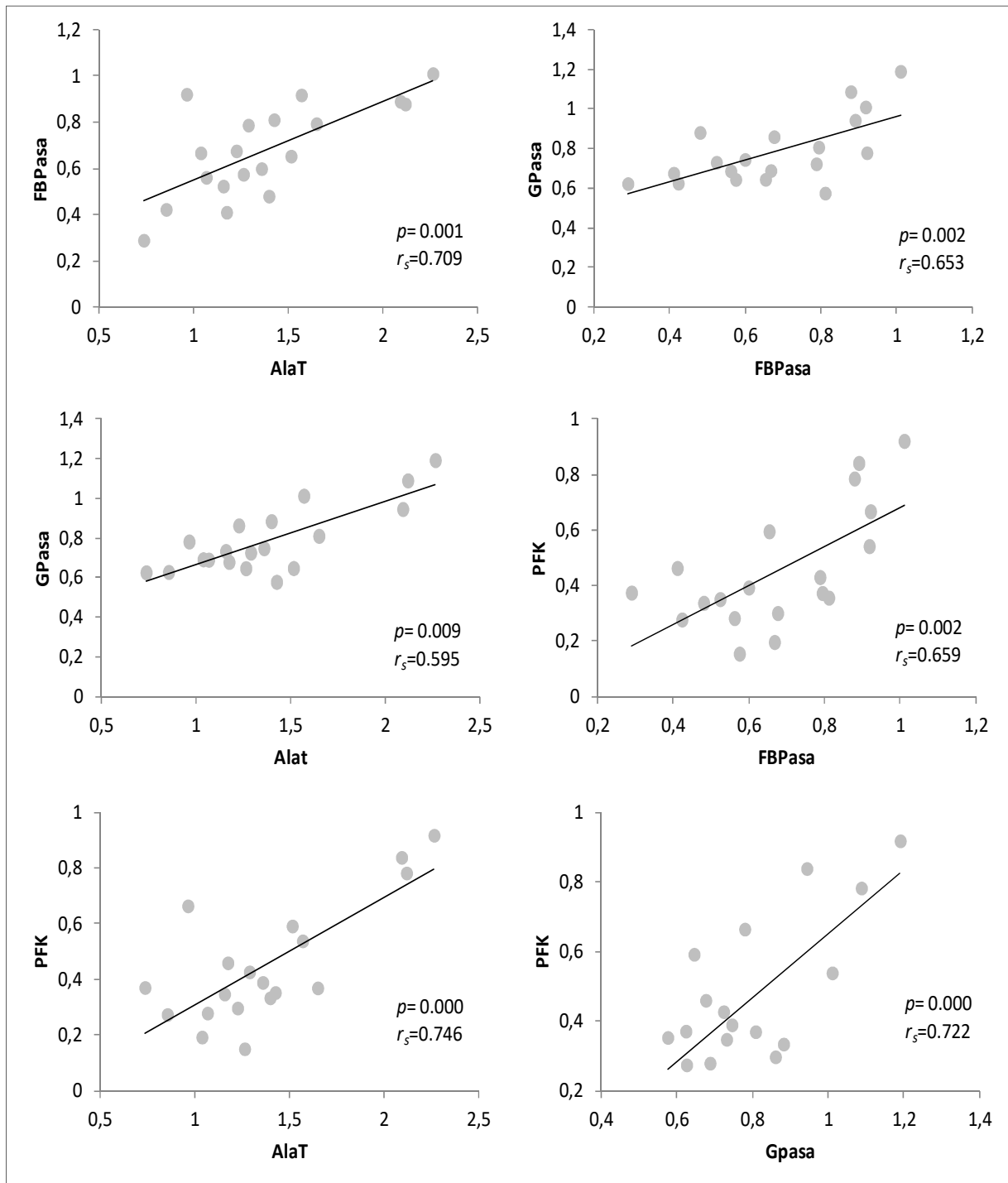
**Tabla 4.3.** Resultados de los tests de comportamiento y fisiología de los diferentes grupos. Los valores son la media ± SEM (n=39). ADAPT: nº pellets consumidos a las 2h; LATESC (s): latencia de escape de la red; TESC (s): tiempo total empleado escapando; NESC: nº intentos de escape; CORT (ng mL<sup>-1</sup>): cortisol plasmático. Diferentes letras en superíndices indican diferencias significativas (p<0.05).

#### 4.3.2. Diferencias en el metabolismo energético de los coping styles

En la gráfica 4.3 se resumen los resultados obtenidos al evaluar las actividades enzimáticas del hígado. En general, se observa una tendencia a que el grupo CS1 presente niveles de actividad más elevados, aunque no siempre se alcanza significación estadística. Con respecto a la enzima Alanina aminotransferasa (AlaT), relacionada con el metabolismo de los aminoácidos, no se observaron diferencias. En relación a las enzimas que intervienen en el metabolismo de los carbohidratos, se detectaron diferencias significativas para la glucógeno fosforilasa (GPasa) que actúa en la glucólisis, presentando el grupo CS1 los valores más altos ( $0.80 \pm 0.17$  vs.  $0.48 \pm 0.02$  U mg prot<sup>-1</sup>), no encontrándose sin embargo diferencias para el resto, la fructosa 6-bifosfatasa (FBPasa) que interviene en la gluconeogénesis, y la fosfofructoquinasa (PFK) que actúa en la glucólisis. Además, se detectó una fuerte correlación positiva entre todas las enzimas (Gráfica 4.4).



**Gráfica 4.3.** Resultados de la actividad enzimática hepática (U mg prot<sup>-1</sup>) de cada grupo. Las enzimas son: Alanina aminotransferasa (AlaT), Fructosa 6-bifosfatasa (FBPasa), Glucógeno fosforilasa (GPasa) y Fosfofructoquinasa (PFK). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos CS1 y CS2 ( $p < 0.05$ ). Los valores son media  $\pm$  SE (n=19).



**Gráfica 4.4.** Gráficas de correlación entre las distintas enzimas hepáticas ( $\text{U mg prot}^{-1}$ ). Las enzimas son: Alanina aminotransferasa (AlaT), Fructosa 6-bifosfatasa (FBPaSa), Glucógeno fosforilasa (GPaSa) y Fosfofructoquinasa (PFK). P: nivel de significancia,  $r_s$ : Coeficiente de correlación de Pearson.

#### 4.4. DISCUSIÓN

Para este estudio se seleccionó una batería de tests de aceptación general en la literatura para detectar la existencia de *coping style* en peces, basándonos en las características de la especie. En trabajos previos realizados con lenguados (Silva et al., 2010), en ningún caso se utilizaron tests relacionados con la agresión, ya que esta especie parece ser poco agresiva. Sin embargo, al tener la acedía un comportamiento muy distinto al del lenguado y en general al de otros peces planos, en este trabajo sí se tuvieron en cuenta. El test del “objeto novedoso” ha sido utilizado por numerosos autores para diferenciar entre individuos atrevidos (proactivos) y tímidos (reactivos) según la latencia a acercarse a éste y el número de veces que se acerca (Frost et al., 2007; Martins et al., 2011c; Galhardo et al., 2012; Castanherira et al., 2013b). Sin embargo, cuando se llevaron a cabo en este estudio los test de agresividad y del “objeto novedoso”, no se observaron diferencias entre los individuos. Esta ausencia de respuesta podría deberse a que, al igual que sucede con el lenguado (Martins et al., 2011a), ni la exploración ni la agresividad son rasgos característicos del comportamiento innato de la acedía. Cuando los resultados de los tests no muestran respuestas o no son consistentes, no deberían ser considerados para determinar la existencia de *coping styles* (Galhardo et al., 2012; Castanherira et al., 2013a).

Por otra parte, los resultados del resto de tests realizados y los altos coeficientes de variación obtenidos para determinadas variables (ADAPT=90.92; LATESC=114.14; CORT=105.56) indicaron que los peces muestran significativas variaciones individuales tanto en el comportamiento como en su fisiología tras ser expuestos a diferentes estímulos. Por tanto, tal y como se ha demostrado en estudios anteriores donde los peces mostraron una pronunciada variación individual (Øverli et al., 2007; Silva et al., 2010; Martins et al., 2011a,b), podemos afirmar por primera vez la existencia de *coping style* en *Dicologlossa cuneata* y sugerir que los tests aplicados para esta identificación son efectivos.

En base a los resultados se definieron dos personalidades diferentes: una representada por el grupo CS1, donde los peces tardaron más tiempo en recuperar el apetito, reaccionaron antes a la exposición al aire, emplearon más tiempo en intentar escapar de la red y lucharon un mayor número de veces para huir de la exposición al aire, presentando niveles de cortisol plasmático más altos tras una situación de estrés, y la otra, constituida por el grupo CS2, donde por el contrario los peces recuperaron más rápidamente la ingesta de alimento en un nuevo ambiente, tardaron más tiempo en reaccionar al ser expuestos al aire, presentando un menor número de intentos de escape durante esta exposición y menos tiempo intentando escapar y mostraron menores niveles de cortisol plasmático tras ser sometidos a un agente estresor.

En nuestro estudio, los individuos que presentaron altas concentraciones de cortisol post-estrés (característica típica de reactivos) presentaron un carácter luchador al ser expuestos al exterior. Los intentos de escape tanto de una red como de un espacio confinado han sido utilizados para discriminar diferentes *coping style* en diferentes especies de peces. Sin embargo, se han obtenido en ellos resultados contradictorios. Mientras que en unos casos los individuos proactivos se han caracterizado por presentar un alto número de intentos de escape cuando los peces son mantenidos un período de tiempo en espacios pequeños como una red o pequeñas cajas (Silva et al., 2010; Martins et al., 2011c; Castanheira et al., 2013b), en otros, al igual que en el presente estudio, este elevado número de intentos de escape se ha atribuido al *coping style* reactivo (Øverli et al., 2006a).

Los individuos que tardaron más tiempo en escapar (con mayor latencia de escape, LATESC) fueron también los que exhibieron menor número de intentos de escape. Además, la correlación entre esta variable y el número de intentos de escape fue negativa. Esto coincide con lo observado en otras especies como el lenguado senegalés (Martins et al., 2011c). Sin embargo, en esta especie este comportamiento se entendió como una respuesta pasiva (propia de individuos reactivos) hacia un estrés agudo por confinamiento, mientras que en la acedía esta situación tuvo lugar en el grupo de individuos proactivos.

Estos resultados contradictorios se han observado también en otros tests realizados para discriminar *coping styles*. Así, en un trabajo sobre el lenguado (Castanheira et al., 2013b), los peces que necesitaron más tiempo para recuperar el apetito en un nuevo ambiente fueron aquellos que intentaron escaparse de la red un mayor número de veces, mientras que en tilapia (Martins et al., 2011c) y en trucha (Øverli et al., 2006a), los que realizaron un mayor número de intentos de escape se adaptaron antes al nuevo hábitat. Dicha disparidad de resultados puede ser debida al comportamiento específico de la especie y/o a experiencias previas (por ejemplo, experiencias sociales, antecedentes nutricionales) a las que los peces fueron expuestos antes del inicio de los experimentos (Castanheira et al., 2013b). Galhardo et al. (2012) llegaron a determinar que en las especies altamente sociales, los rasgos de personalidad pueden variar con el contexto social y cuando esto sucede, es crucial tener en cuenta el entorno social al evaluar los rasgos de personalidad. En muchos de los estudios nombrados con anterioridad los tests realizados se han hecho de manera individual, por lo que el entorno social ha cambiado. Por el momento no hay estudios que demuestren la existencia de un comportamiento social en la acedía, pero sí se ha observado durante la realización de este estudio que ésta es una especie que en situaciones de aislamiento no presenta la típica actividad natatoria que se observa en grupo, sino todo lo contrario, permanece estática en el fondo del tanque. Este cambio en su comportamiento podría ser interpretado, tal y como proponen Galhardo et al. (2012), como una variación de sus rasgos de personalidad al variar su contexto social. Por lo tanto, habría que tener en consideración la realización de tests grupales y sus resultados antes de describir las características que definen a cada uno de los *coping styles*. Además, existen otros aspectos como la edad y nuevas condiciones ambientales que podrían producir cambios en estas características (Castanheira et al., 2017). Por ello trabajos futuros podrían tener la finalidad de analizar estos rasgos en grupos.

En base a la variabilidad inter-específica en cuanto a los resultados de los tests y teniendo en cuenta que la reacción del eje Hipotálamo-Pituitaria-Interrenal (HPI) como respuesta fisiológica al estrés es considerada como una de las diferencias más significativas entre los individuos proactivos y reactivos (Castanheira et al., 2013b),

siendo los individuos proactivos los que presentan mayores niveles de cortisol plasmático tras ser expuestos a un agente estresante, en nuestro caso podríamos identificar a los peces pertenecientes al grupo CS1 como reactivos y a los incluidos en el grupo CS2 como proactivos.

Uno de los objetivos de nuestro trabajo fue determinar si podrían detectarse diferencias metabólicas entre los diferentes *coping styles* identificados. Para ello, se midió la actividad enzimática de ciertas enzimas hepáticas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y de aminoácidos en estado basal. Hasta el momento, los estudios que se han llevado a cabo han analizado cómo ciertas situaciones estresantes pueden provocar cambios en el metabolismo (diferentes osmolaridades, Sangiao-Alvarellos et al., 2003; cambios en la densidad de cultivo y en la administración del alimento, Sangiao-Alvarellos et al., 2005; Herrera et al. 2015; estados de hipo e hiperglucemia, Conde-Sieira et al., 2015), o la relación entre el metabolismo energético y los *coping styles* pero tras someter a los individuos a un agente estresante (Martins et al., 2011; Herrera et al., 2014).

En nuestro caso, por primera vez se han estudiado diferencias individuales en el metabolismo energético en estado basal. Los resultados de nuestro estudio demostraron que los diferentes *coping style* presentaron diferencias significativas para la actividad de la enzima GPasa, responsable de controlar el catabolismo del glucógeno a glucosa 1-fosfato (Moon et al. 1999) y de mantener la homeostasis de la glucosa plasmática, presentando los individuos reactivos (CS1) niveles más elevados de actividad enzimática que los proactivos (CS2). Los individuos del grupo CS1 se caracterizaron por tener un elevado número de intentos de escape de la red al ser expuestos al aire y por presentar un alto contenido de cortisol en plasma tras la exposición al agente estresante. Es probable que este grupo de peces reactivos, en una situación no estresante también presenten mayores niveles de cortisol plasmático, tal y como se ha descrito para lenguado (Silva et al., 2010). Esos niveles basales de cortisol podrían indicar una mayor actividad y un mayor gasto energético diario, lo que explicaría una mayor actividad de la GPasa en hígado, ya que el metabolismo del

glucógeno es la principal fuente de energía tanto en vertebrados como en invertebrados (Oliveira et al., 2005; Chang et al., 2007) y la degradación del glucógeno es principalmente iniciada por la Glucógeno fosforilasa (GPasa).

En conclusión, este estudio demuestra por primera vez la existencia de *coping style* en *Dicologlossa cuneata*, resultando efectivos los tests aplicados para esta identificación, en especial el de adaptación a un nuevo ambiente y el de exposición al aire. Se observaron dos grupos bien diferenciados con respuestas comportamentales y fisiológicas específicas que se ajustan a los patrones de proactivos y reactivos. Además estos grupos demostraron diferencias en cuanto a su actividad enzimática en el metabolismo energético de los carbohidratos en estado basal, concretamente para la actividad hepática glucógeno fosforilasa (GPasa) relacionada con la glucógenolisis.

#### 4.5. REFERENCIAS

- Abrahams, M.V., Sutterlin, A. (1999) The foraging and antipredator behaviour of growth enhanced transgenic Atlantic salmon. *Animal Behaviour* **58**, 933–942.
- Arjona, F.J., Vargas-Chacoff, L., Ruiz-Jarabo, I., Gonçalves, O., Páscoa, I., Martín del Río, M.P., Mancera, J.M. (2009) Tertiary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) to osmotic challenge: implications for osmoregulation, energy metabolism and growth. *Aquaculture* **287**, 419–426.
- Brelin, D., Petterson, E., Winberg, S. (2005) Divergent stress coping styles in juvenile brown trout (*Salmo trutta*). *Ann.N. Y. Acad. Sci.* **1040**, 239–245.
- Brelin, D., Petersson, E., Dannewitz, J., Dahl, J., Winberg, S. (2008) Frequency distribution of coping strategies in four populations of brown trout (*Salmo trutta*). *Horm. Behav.* **53**, 546–556.
- Castanheira, M.F., Herrera, M., Costas, B., Conceição, L.E.C., Martins, C.I.M. (2013a) Linking cortisol responsiveness and aggressive behaviour in gilthead seabream

- Sparus aurata*: indication of divergent coping styles. *Applied Animal Behaviour Science* **143**, 75–81.
- Castanheira, M.F., Herrera, M., Costas, B., Conceição, L.E.C., Martins, C.I.M. (2013b) Can we predict personality in fish? Searching for consistency over time and across contexts. *PLoS ONE* **8**, e62037.
- Castanheira, M.F., Conceição, L.E.C., Millot, S., Rey, S., Bégout, M.L., Damsgård, B., Kristiansen, T., Höglund, E., Øverli, Ø., Martins, C.I.M. (2017) Coping styles in farmed fish: consequences for aquaculture. *Reviews in Aquaculture* **9**, 23-41.
- Conde-Sieira, M., Soengas, J.L., Valente, L.M.P. (2015) Potential capacity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) to use carbohydrates: Metabolic responses to hypo- and hyper-glycaemia. *Aquaculture* **438**, 59–67.
- Chang, J.C.H., Wu, S.M., Tseng, Y.C., Lee, Y.C., Baba, O., Hwang, P.P. (2007) Regulation of glycogen metabolism in gills and liver of the euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during acclimation to seawater. *The Journal of Experimental Biology* **210**, 3494-3504.
- Ferrari, S., Benhaim, D., Colchen, T., Chatain, B., Begout, M.L. (2014) First links between self-feeding behaviour and personality traits in European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Applied Animal Behaviour Science* **161**, 131–141.
- Finstad, A.G., Forseth, T., Ugendal, O., Naese, T.F. (2007) Metabolic rate, behaviour and winter performance in juvenile Atlantic salmon. *Functional Ecology* **21**, 905–912.
- Frost, A. J., Winrow-Giffen, A., Ashley, P. J., Sneddon, L. U. (2007) Plasticity in animal personality traits: does prior experience alter the degree of boldness?. *Proc. R. Soc. B* **274**, 333–339.
- Galhardo, L., Vitorino, A., Oliveira, R. F. (2012) Social familiarity modulates personality trait in a cichlid fish. *Biol. Lett.* **8**, 936–938.

- Herrera, M., Castanheira, M.F., Conceição, L.E.C. Martins, C.I.M. (2014) Linking risk taking and the behavioral and metabolic responses to confinement stress in gilthead seabream *Sparus aurata*. *Applied Animal Behaviour Science* **155**, 101-108.
- Herrera, M., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., De la Roca, E., Mancera, J.M. (2015) Metabolic enzyme activities in relation to crowding stress in the wedge sole (*Dicologlossa cuneata*). *Aquaculture Research* **46**, 2808-2818.
- Huntingford, F.A., Andrew, G., Mackenzie, S., Morera, D., Coyle, S.M., Pilarczyk, M. (2010) Coping strategies in a strongly schooling fish, the common carp *Cyprinus carpio*. *Journal of Fish Biology* **76**, 1576–1591.
- Killen, S.S., Marras, S., McKenzie, D.J. (2011) Fuel, fasting, fear: routine metabolic rate and feed deprivation exert synergistic effects on risk-taking in individual juvenile European sea bass. *Journal of Animal Ecology* **80**, 1024–1033.
- Kristiansen, T.S., Fernö, A. (2007) Individual behaviour and growth of halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) fed sinking and floating: evidence of different coping styles. *Applied Animal Behaviour Science* **104**, 236–250.
- Koolhaas, J.M., Korte, S.M., De Boer, S.F., Van Der Vegt, B.J., Van Reenen, C.G., Hopster, H., De Jong, I.C., Ruis, M.A.W., Blokhuis, H.J. (1999) Coping styles in animals: current status in behavior and stress physiology. *Neurosc. Biobehav. Rev.* **23**, 925-935.
- Laíz-Carrión, R., Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán, J.M., Martín del Río, M.P., Míguez, J. M., Soengas, J. L., Mancera, J. M. (2002) Energy metabolism in fish tissues related to osmoregulation and cortisol action. *Fish Physiology and Biochemistry* **27**, 179–188.
- Laíz-Carrión, R., Martín del Río, M.P., Míguez, J. M., Mancera, J. M., Soengas, J. L. (2003) Influence of cortisol on osmoregulation and energy metabolism in

- gilthead seabream *Sparus aurata*. *Journal of Experimental Zoology* **298A**, 105–118.
- Laíz-Carrión, R. (2004) Osmorregulación en Dorada *Sparus aurata* L. Control Hormonal e Implicaciones Metabólicas. Ph. D. Thesis. Universidad de Cádiz.
- Martins, C.I.M., Hillen, B., Schrama, J.W., Verreth, J.A.J. (2008) A brief note on the relationship between residual feed intake and aggression behaviour in juveniles of African catfish *Clarias gariepinus*. *Applied Animal Behaviour Science* **111**, 408–413.
- Martins, C.I.M., Castanheira, M.F., Engrola, S., Costas, B., Conceição, L.E.C. (2011a) Individual differences in metabolism predict coping styles in fish. *Applied Animal Behaviour Science* **130**, 135-143.
- Martins, C.I.M., Conceição, L.E.C., Schrama, J.W. (2011b) Feeding behavior and stress response explain individual differences in feed efficiency in juveniles of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* **312**, 192–197.
- Martins, C.I.M., Silva, P.I.M., Conceição, L.E.C., Costas, B., Höglund, E., Øverli, Ø., Schrama, J.W. (2011c) Linking fearfulness and coping styles in fish. *PLoS ONE* **6**, e28084.
- Moon, T.W., Busby, E.R., Cooper, G.A., Mommsen T.P. (1999) Fish hepatocyte glycogen phosphorylase - a sensitive indicator for hormonal modulation. *Fish Physiology and Biochemistry* **21**, 15–24.
- Oliveira, G.T., Rossi, I.C., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S. (2004). Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. *Comp. Biochem. Physiol.* **137A**, 383-390.
- Øverli, Ø., Sørensen, C., Nilsson, G.E. (2006a) Behavioral indicators of stress-coping style in rainbow trout: do males and females react differently to novelty? *Physiology y Behavior* **87**, 506–512.

- Øverli, Ø., Sørensen, C., Kiessling, A., Pottinger, T.G., Gjøen, H.M. (2006b) Selection for improved stress tolerance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leads to reduced feed waste. *Aquaculture* **261**, 776–781.
- Øverli, Ø., Sørensen, C., Pulman, K.G.T., Pottinger, T.G., Korzan, W., Summers, C.H. (2007) Evolutionary background for stress-coping styles: relationships between physiological, behavioral, and cognitive traits in non-mammalian vertebrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **31**, 396–412.
- Papoutsoglou, S.E., Karakatsouli, N., Pizzonia, G., Dalla, C., Polissidis, A., Papadopoulou-Daifoti, Z. (2006) Effects of rearing density on growth, brain neurotransmitters and liver fatty acid composition of juvenile white sea bream *Diplodus sargus* L. *Aquaculture Research* **37**, 87–95.
- Polakof, S., Arjona, F.J., Sangiao-Alvarellos, S., Martín del Río, M.P., Mancera, J.M., Soengas, J.L. (2006) Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus auratus*. *Journal of Comparative Physiology* **176B**, 441–452.
- Polakof, S. (2008) Mecanismos glucosensores en cerebro y cuerpos de Brockmann de la trucha arcoiris como modelo de pez teleósteo. P. D. Thesis. Universidad de Vigo.
- Rey, S., Rivas, L., Morera Capdevila, D., Callol, A., Huntingford, F.A., Pilarczyk, M., Kadri, S., Mackenzie, S. (2016) Differential responses to environmental challenge by common carp *Cyprinus carpio* highlight the importance of coping style in integrative physiology. *Journal of Fish Biology* **88**, 1056–1069.
- Rodiles, A., Herrera, M., Hachero-Cruzado, I., Ruiz-Jarabo, I., Mancera, J.M., Cordero, M.L., Lall, S.P., Alarcón, F.J. (2015) Tissue composition, blood biochemistry and histology of digestive organs in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles fed diets containing different plant protein ingredients. *Aquaculture Nutrition* **21**, 767–779.

- Sangiao-Alvarellos, S., Bouça, P., Míguez, J.M., Soengas, J.L. (2003a) Intracerebroventricular injections of noradrenaline affect brain energy metabolism of rainbow trout. *Physiological and Biochemical Zoology* **76**(5), 663–671.
- Sangiao-Alvarellos, S., Laiz-Carrión, R., Guzmán, J.M., Martín del Río, M.P., Míguez, J. M., Mancera, J. M., Soengas, J. L. (2003b) Acclimation of *S. aurata* to various salinities alters energy metabolism of osmoregulatory and nonosmoregulatory organs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**, R897–R907.
- Sangiao-Alvarellos, S., Lapido, M., Míguez, J. M., Soengas, J. L. (2004) Effects of central administration of arginine vasotocin on monoaminergic neurotransmitters and energy metabolism of rainbow trout brain. *Journal of Fish Biology* **64**, 1313–1329.
- Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán, J.M., Laiz-Carrión, R., Míguez, J.M., Martín del Río, M.P., Mancera, J.M., Soengas, J.L. (2005a) Actions of 17 $\beta$ -estradiol on carbohydrate metabolism in liver, gills, and brain of gilthead seabream *Sparus auratus* during acclimation to different salinities. *Marine Biology* **146**, 607–617.
- Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán, J.M., Laiz-Carrión, R., Míguez, J.M., Martín del Río, M.P., Mancera, J.M., Soengas, J.L. (2005b) Interactive effects of high stocking density and food deprivation on carbohydrate metabolism in several tissues of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Journal of Experimental Zoology* **303A**, 761-775.
- Silva, P.I.M., Martins, C.I.M., Engrola, S., Marino, G., Øverli, Ø., Conceição, L.E.C. (2010) Individual differences in cortisol levels and behaviour of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles: evidence for coping styles. *Applied Animal Behaviour Science* **124**, 75–81.
- Vargas-Chacoff, L., Arjona, F.J., Ruiz-Jarabo, I., Páscoa, I., Gonçalves, O., Martín del Río, M.P., Mancera, J.M. (2009) Seasonal variation in osmoregulatory and metabolic

parameters in earthen pond-cultured gilthead sea bream *Sparus auratus*. *Aquaculture Research* **40**, 1279–1290.

Zahl, I.H., Samuelsen, O., Kiessling, A. (2012) Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiol. Biochem.* **38**, 201–218.





## **IV. DISCUSIÓN GENERAL**



#### IV. DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo general de los diferentes estudios que conforman esta Tesis es profundizar en el conocimiento de parámetros de cultivo de la acedía tan importantes como la densidad y la alimentación y su fisiología del estrés, así como de las respuestas integradas de fisiología y comportamiento al estrés, debido a su importancia para la optimización del cultivo. Para ello, se han estudiado los efectos de distintas densidades en diferentes fases del cultivo con el fin de determinar por una parte si los altos niveles de cortisol descritos en juveniles de acedía están presentes desde las etapas tempranas de su desarrollo o se deben a las condiciones de cultivo y, por otra, mediante el estudio del metabolismo intermedio, establecer un indicador de estrés crónico para esta especie. Así mismo, se han determinado los ritmos diarios de alimentación y de actividad locomotora de la especie y la estrategia alimentaria más adecuada con relación a la fisiología del estrés. Por último, en base a las respuestas integradas (fisiología y comportamiento) se han identificado diferentes *coping styles* con respuestas comportamentales y fisiológicas específicas, y se han detectado diferencias en las actividades enzimáticas del metabolismo energético de cada uno de ellos.

Los resultados obtenidos en el estudio sobre desarrollo larvario mostraron que aunque la acedía en el momento de la eclosión no presentó altas concentraciones de cortisol total en el cuerpo en comparación con el resto de especies estudiadas (King y Berlinsky, 2006; Bolasina et al., 2006; Simontacchi et al., 2009; Peterson y Booth, 2010; Bertotto et al., 2011; Pavlidis et al., 2011; Zubair *et al.*, 2012), conforme iban pasando los días, estos valores de cortisol en situaciones supuestamente no estresantes iban incrementándose hasta situarse en uno de los más altos descritos en la literatura, tal y como se detalló para la fase juvenil (Herrera et al 2009a,b). Por tanto, los altos valores de cortisol de esta especie en cautividad parecen estar presentes de manera constitutiva desde la fase larvaria. Las larvas sometidas a diferentes densidades de cultivo (baja, media y alta) presentaron aumentos de los niveles de cortisol a los 30 DDE en todas las densidades ensayadas, aunque no se

observaron diferencias significativas entre estos valores. Sin embargo, al final del experimento (45 DDE), los niveles hormonales fueron significativamente más elevados en ADC (altas densidades de cultivo) que en BDC (bajas densidades de cultivo) por lo que se puede considerar la alta densidad de cultivo como un agente estresante a partir de ese momento.

A pesar de que, tal como se ha demostrado en nuestro estudio larvario, el cortisol es ampliamente aceptado como indicador de estrés en peces (Wendelaar Bonga, 1997), en la experiencia con juveniles de acedía sometidos a un estrés crónico por altas densidades de cultivo se observó que esta hormona no sufrió variaciones significativas para este estresor. Esto podría deberse a que determinadas situaciones de estrés crónico pueden causar una hiporregulación de la hormona adrenocorticotropa y/o los receptores del cortisol inhibiendo así la respuesta al estrés endocrino (Wendelaar Bonga, 1997; Santos et al., 2010). Por este motivo, como alternativa al cortisol se evaluó por primera vez en peces planos la actividad de ciertas enzimas del músculo e hígado relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y de aminoácidos (hexoquinasa HK, glutamato deshidrogenasa GDH, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa G3PDH y lactato deshidrogenasa LDH) bajo diferentes densidades de cultivo. Los resultados sugieren que las enzimas musculares HK y GDH podrían ser consideradas como indicadores fiables de estrés para esta especie, al menos en situaciones de estrés crónico relacionado con la densidad de cultivo.

Sin embargo, en los estudios en los que se sometió a larvas a diferentes densidades de cultivo y a juveniles a distintas estrategias alimentarias, el cortisol sí fue un buen indicador de estrés, observándose diferencias significativas entre las distintas situaciones estudiadas, encontrándose mayores niveles de cortisol en las larvas sometidas a altas densidades y en los juveniles alimentados bajo autodemanda. Así pues, en conjunto nuestros resultados muestran que en estudios de fisiología del estrés en esta especie podría ser adecuado analizar tanto el cortisol plasmático como la actividad de las enzimas musculares HK y GDH como indicadores de estrés, obteniéndose así resultados más concluyentes.

Cuando se analizaron las diferentes estrategias de alimentación en juveniles, los resultados indicaron que la estrategia más adecuada para la acedía fue la programada nocturna, presentando mayores tasas de crecimiento, supervivencia y eficiencia alimentaria y valores de cortisol muy bajos en comparación con las estrategias programada diurna y autodemanda. En las condiciones en las que se realizó el tratamiento de alimentación programada nocturna los peces conocían el momento en el que el alimento les iba a ser suministrado, evitando así el estrés que puede suponer una alimentación al azar o por autodemanda (Kulczykowska y Sánchez-Vázquez, 2010). Además se encontraban en condiciones de baja densidad de cultivo, ya que todo el estudio se realizó en estas condiciones para asegurar la supervivencia. Estos resultados sugieren que estas condiciones de cultivo (baja densidad y alimentación programada nocturna) supusieron niveles de estrés muy reducidos a los peces. Sin embargo, en el estudio realizado en larvas cultivadas bajo diferentes densidades de cultivo, las larvas a los 30 DDE presentaron en todos los tratamientos valores de cortisol muy superiores a los observados en larvas recién eclosionadas. Esto lleva a considerar que en las condiciones en las que se cultivaron las larvas podría existir algún agente estresante (momento de suministrar el alimento, tipo de alimentación, cantidad de alimento, etc.) que hizo aumentar los valores de cortisol. Por lo tanto, los altos valores de cortisol observados en los cultivos desde la fase larvaria en esta especie parecen estar relacionados con las propias condiciones de cautividad.

A la acedía se la ha considerado como una especie con una actividad natatoria continua a lo largo del día, a diferencia de otros pleuronectiformes como el lenguado senegalés o el rodaballo (Herrera et al., 2008, 2009). Sin embargo, no se ha determinado aún si este es un comportamiento intrínseco de la especie o si, por el contrario, también deriva de las condiciones de cautividad. Aunque para esta Tesis cuando se analizó el ritmo locomotor diario de la acedía en el capítulo experimental 3 sólo se mostraron los resultados que se obtuvieron con los peces sometidos a alimentación por autodemanda, paralelamente, con idea de recabar más información, también se analizó el comportamiento locomotor de los peces alimentados de manera

programada durante la noche. Los resultados mostraron que del mismo modo que sucedió en la estrategia de autodemanda, éstos presentaron cierta actividad natatoria durante el día. Si en base a las altas tasas de crecimiento, supervivencia y eficiencia alimentaria y a los bajos valores de cortisol plasmáticos obtenidos se considera que en la estrategia nocturna los peces no se vieron sometidos a ningún agente estresante determinante, y teniendo en cuenta que se observó una actividad natatoria durante el día de un 25% (en lenguado *Solea senegalensis* tan solo se ha observado un 15% de actividad locomotora durante la fase de luz, siendo considerado también una especie nocturna (Bayarri et al., 2004)) se podría concluir que, a pesar de tener un comportamiento locomotor nocturno, la destacable actividad natatoria durante el día aparece como una característica propia de la especie y no de las condiciones de cautividad.

En cuanto a los metabolitos plasmáticos (glucosa, lactato, proteínas y triglicéridos), a pesar de haber sido también empleados en varios trabajos sobre soleidos como indicadores de la respuesta secundaria al estrés (Arjona et al., 2009; Costas et al., 2008), en los estudios realizados durante esta Tesis y en otros anteriores sobre esta especie (Herrera et al., 2009b) no variaron significativamente entre los tratamientos. Se ha descrito que en situaciones de estrés crónico estos parámetros metabólicos no cambian debido a la aclimatación del eje hipotálamo-pituitaria-interrenal (HPI) (Montero et al., 1999; Procarione et al., 1999; Haukenes y Barton, 2004; Barton et al., 2005). Así pues, para el caso de una especie como la acedía, los metabolitos plasmáticos no se pueden considerar buenos marcadores en estudios sobre la fisiología del estrés.

Por lo tanto, considerando de manera conjunta las respuestas al estrés de la acedía en base a los resultados de esta Tesis, podemos concluir que en cuanto a la respuesta primaria se observó un aumento en los niveles de cortisol, aunque habría que puntualizar que este aumento no tuvo lugar en todos los estudios realizados. Con respecto a la respuesta secundaria al estrés, por la cual se producen cambios metabólicos en el organismo orientados a recuperar la homeostasis, se observó un aumento de la actividad enzimática, concretamente para el caso de las enzimas

musculares HK y GDH. Sin embargo, no se observó un aumento de las concentraciones de metabolitos plasmáticos tras tener lugar la respuesta primaria. Finalmente, la respuesta terciaria se caracterizó por un déficit en el crecimiento y una alta tasa de mortalidad, respaldándose así la idea apoyada por muchos autores de que tanto el aumento de la densidad de cultivo como una estrategia alimentaria inadecuada pueden activar el sistema de estrés y afectar negativamente al crecimiento y a la tasa de supervivencia de los peces. (Madrid et al., 2001; Ellis et al., 2002; Herrero et al., 2005; Sangiao-Alvarellos et al., 2005b; Björnsson y Ólafsdóttir, 2006; Navarro et al., 2009; Sammouth et al., 2009; Santos et al., 2010).

Con respecto a la identificación de *coping style* en acedía, en esta Tesis se muestra por primera vez la existencia de dos grupos bien diferenciados con respuestas comportamentales y fisiológicas específicas en esta especie. En la literatura ha quedado ampliamente justificado el creciente interés por estudiar estas respuestas integradas ante el estrés por su importante relación con la productividad de la especie, la salud y la vulnerabilidad a enfermedades y el bienestar (Martins et al., 2011b; Castanheira et al., 2013b). Descubrir que la acedía tiene diferentes comportamientos frente a una misma situación es de gran interés para profundizar en su conocimiento.

Para la identificación de *coping style* en acedías, se realizaron cuatro tests individuales frecuentemente citados en la bibliografía (Brelín et al., 2005; Silva et al., 2010; Martins et al., 2011c; Castanheira et al., 2013b). En base a ellos se identificaron dos grupos, el CS1 definido como reactivos, que tardaron más tiempo en recuperar el apetito en un nuevo ambiente, con un carácter luchador frente a un estresor (exposición al aire) y altos niveles de cortisol plasmático tras el estresor, y el CS2 compuesto por individuos proactivos, que recuperaron más rápidamente la ingesta de alimento, lucharon menos en la red y presentaron niveles de cortisol plasmático inferiores. La consecuencia que tiene la diferenciación de *coping styles* en acuicultura está muy relacionada con el bienestar animal, ya que gracias a ella se puede conocer cómo responden bajo condiciones de estrés cada una de estas personalidades y así adaptar en la medida de lo posible las condiciones de cultivo a sus necesidades con el fin de disminuir el estrés en los peces y obtener una mejor producción (Castanheira et

al., 2017). De esta manera, aplicando esto al cultivo de la acedía se podría tener en cuenta, por ejemplo, que los individuos reactivos con la característica de adaptarse mejor a un nuevo ambiente sufrirían menos estrés al ser trasladados a nuevas zonas de cultivo (tanques con mayor superficie, otras zonas de las instalaciones, etc.). Por otra parte, estos individuos sufrirían mayor estrés en los procesos de manipulación (muestreo, marcaje, estabulación, etc.) ya que presentan mayores niveles de cortisol plasmático tras un estrés agudo. Toda esta información permitiría tomar medidas preventivas en el manejo del cultivo mejorando así el bienestar en los peces.

La caracterización de *coping style* en peces es un trabajo costoso en el que se emplea mucho tiempo. Para ello se realizan tanto test individuales como grupales. En estos últimos se pueden caracterizar un gran número de peces a la vez, por lo que se consideran tests más rápidos. En esta Tesis tan sólo se realizaron test individuales por tratarse de una primera aproximación a los *coping styles* en esta especie. No obstante, para poder definir con mayor exactitud los perfiles de los individuos reactivos y proactivos en la acedía sería necesario, además, la realización de tests grupales, ya que los rasgos de personalidad pueden variar con el contexto social (Galhardo et al., 2012) y, posteriormente, valorar conjuntamente las respuestas. Trabajos futuros deberían estar enfocados a determinar qué tipos de tests grupales son efectivos para esta especie.

Resulta especialmente interesante que en nuestro estudio sobre las estrategias de alimentación en juveniles pudo observarse que los peces sometidos a una alimentación por autodemanda presentaron altos niveles de cortisol plasmático, posiblemente por el hecho de que debían mantener un estado de alerta constante para conseguir el alimento (Kulczykowska y Sánchez-Vázquez, 2010), lo que indica que los peces bajo estas condiciones de cultivo se encuentran bajo una situación de estrés. Como consecuencia de esta situación, a lo largo del desarrollo del estudio los peces perdieron peso y presentaron una alta tasa de mortalidad. Sin embargo, los niveles de demandas permanecieron constantes hasta el final del experimento. Como ya se había observado antes en otras especies (Alanärä et al., 1993; Brännäs et al., 1993; Covès et

al., 2006) esto podría deberse a la existencia de una jerarquía social en el tanque, donde podrían concurrir dos grupos de peces con diferentes comportamientos, siendo uno de ellos el que realizó las demandas. Además, cabe suponer que los peces de este grupo permanecieron vivos hasta la finalización del ensayo, lo que explicaría que las demandas se produjeran hasta ese momento. Esta diferencia en el comportamiento frente a una situación de estrés (alimentación por autodemanda) refuerza la idea de la existencia de *coping styles* en *Dicologlossa cuneata*, y apuntaría a que un *coping style* determinado fuera el responsable de activar los comederos. Para ello, habría que definir los representantes de cada grupo y concluir si también existen diferencias fisiológicas entre ellos, aspectos que no pudieron determinarse por no estar los peces diferenciados individualmente. Futuros trabajos con comederos de autodemanda en los que los peces estuvieran marcados con PIT-tag y agrupados en base a sus respuestas comportamentales y fisiológicas serían muy interesantes para completar toda la información que hasta el momento se ha obtenido en este estudio.

En resumen, los estudios que se han llevado a cabo a lo largo de esta Tesis doctoral han proporcionado una información muy valiosa para mejorar la metodología de cultivo de la acedía, especialmente en lo referente a las respuestas fisiológicas y de comportamiento al estrés y su relación con las condiciones de cultivo. Todo ello supondrá una mejora en el bienestar animal que repercutirá de manera positiva en la productividad acuícola y en el mantenimiento en cautividad de especies amenazadas por la sobreexplotación pesquera.





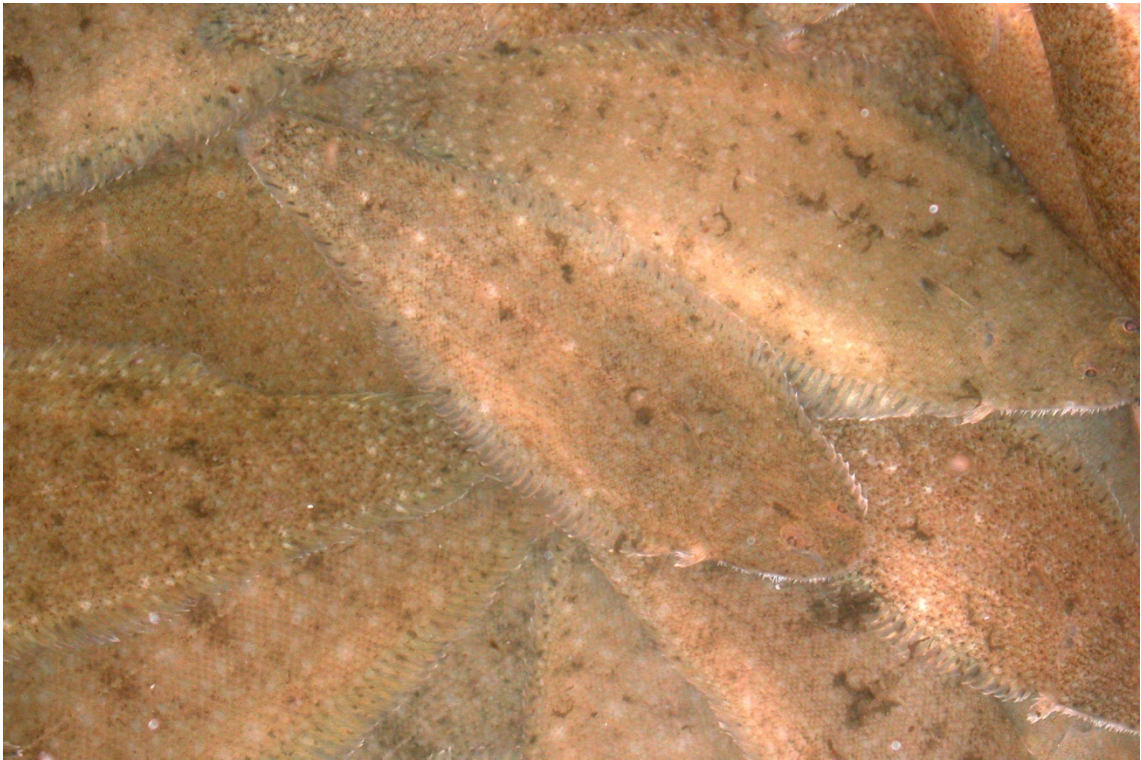
## V. CONCLUSIONES



## V. CONCLUSIONES

1. Los altos valores de cortisol detectados desde la fase larvaria de *D. cuneata* (después de los 30 DDE) parecen estar relacionados con las propias condiciones de cautividad.
2. La alta densidad de cultivo puede ser un agente estresante a partir de los 45 DDE, ya que desde ese momento se detectan respuestas al estrés por dicho estresor.
3. En la fase juvenil, el cortisol es un buen indicador de estrés por densidades de cultivo en estudios a corto plazo, no siendo así cuando se trata de un estrés crónico. En ese caso lo son las enzimas musculares HK y GDH.
4. En estudios sobre la fisiología de estrés de la acedía, los metabolitos plasmáticos (glucosa, lactato, triglicéridos, proteínas) no pueden ser considerados buenos marcadores de estrés.
5. En condiciones de cultivo, los ritmos diarios de la acedía (alimentario y locomotor) están caracterizados por una actividad nocturna.
6. *D. cuneata* presenta cierta actividad natatoria durante el día, pareciendo ser un comportamiento propio de la especie y no derivado de las condiciones de cautividad.
7. La alimentación programada nocturna se considera como la estrategia de alimentación más adecuada para la acedía, asociándose con los mayores niveles de eficiencia de crecimiento y los niveles más bajos de estrés.

8. Aunque la acedía es capaz de activar y usar comederos de autodemanda, este tipo de alimentación no parece ser lo suficientemente adecuada en términos de crecimiento y bienestar.
9. La acedía presenta diferentes *coping styles* o personalidades. Los tests de adaptación a un nuevo ambiente y de exposición al aire son los más efectivos a la hora de discriminar entre los diferentes tipos de *coping styles*.
10. Se han identificado dos *coping styles*, el CS1, definido como peces reactivos, que tardan más tiempo en recuperar el apetito en un nuevo ambiente, con un carácter luchador frente a un estresor (exposición al aire) y altos niveles de cortisol plasmático tras el estresor, y el CS2, compuesto por individuos proactivos, que recuperan más rápido la ingesta de alimento, luchan menos en la red y presentan niveles de cortisol plasmático inferiores tras la exposición al agente estresante.
11. Los *coping styles* manifiestan diferencias entre los niveles de algunas actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo energético como la glucógeno fosforilasa (GPasa), que inicia la glucógenolisis.



## **VI. BIBLIOGRAFÍA**



## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Alanärä, A., Brännäs, E. (1993) A test of the individual feeding activity and food size preference in rainbow trout using demand feeders. *Aquaculture International* **1**, 47-54.
- Arjona, F.J., Vargas-Chacoff, L., Ruiz-Jarabo, I., Martín del Río, M.P., Mancera, J.M. (2007) Osmoregulatory response of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) to changes in environmental salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology* **148A**, 413-421.
- Arjona, F.J., Vargas-Chacoff, L., Ruiz-Jarabo, I., Gonçalves, O., Páscoa, I., Martín del Río, M.P., Mancera J.M. (2009) Tertiary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) to osmotic challenge: Implications for osmoregulation, energy metabolism and growth. *Aquaculture* **287**, 419–426.
- Arrebola Molina, F.A., Astudillo Navarro, F., Yruela Morillo, M.C., González Redondo, P., Elías Ordoñez, I., Berbel Vecino, C., Pelayo Perera, A., Manchado Campaña, M., Conde Ramos, P. (2013) *Manual de Bienestar Animal en el Transporte*. Sevilla. Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera.
- Azzaydi, M., Madrid, J.A., Zamora, S., Sánchez-Vázquez, F.J., Martínez, F.J. (1998) Effect of three feeding strategies (automatic, ad libitum demand-feeding and time-restricted demand-feeding) on feeding rhythms and growth in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* **163**, 285–296.
- Barandica, L. (2010) Efectos de las dietas experimentales en las respuestas inmunes de los peces. Ph. D. Thesis. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Barnett, C.W., Pankhurst, N.W. (1998) The effects of common laboratory and husbandry practices on the stress response of greenback flounder *Rhombosolea tapirina* (Günther, 1862). *Aquaculture* **162**, 313-329.

- Barton, B.A., Ribas, L., Acerete, L., Tort, L. (2005) Effects of chronic confinement on physiological responses of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., to acute handling. *Aquaculture Research* **36**, 172–179.
- Basic, D., Winberg, S., Schjolden, J., Krogdahl, A., Höglund, E. (2012) Context-dependent responses to novelty in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), selected for high and low post-stress cortisol responsiveness. *Physiology & Behavior* **105**, 1175-1181.
- Bauchot, M.L. (1987) Poissons osseux. In: Fischer, W., Bauchot, M.L. and Schneider, M., Eds., Fiches FAO d'identification pour les besoins de la pêche (rev.1). Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37, Commission des Communautés Européennes and FAO, Rome, 2, 891-1421.
- Bayarri, M.J., Muñoz-Cueto, J.A., López-Olmeda, J.F., Vera, L.M., Rol de Lama, M.A., Madrid, J.A., Sánchez-Vázquez, F.J. (2004) Daily locomotor activity and melatonin rhythms in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Physiology & Behavior* **81**, 577–83.
- Bertotto, D., Poltronieri, C., Negrato, E., Richard, J., Pascoli, F., Simontacchi, C., Radaelli, G. (2011) Whole body cortisol and expression of HSP70, IGF-I and MSTN in early development of sea bass subjected to heat shock. *General and Comparative Endocrinology* **174**, 44–50.
- Björnsson, B., Ólafsdóttir, S.R. (2006) Effects of water quality and stocking density on growth performance of juvenile cod (*Gadus morhua* L.). *ICES Journal of Marine Sciences* **63**, 326-334.
- Blache, J., Cadenat, J., Stauch, A. (1970) Clés de détermination des poissons de mer signalés dans l'Atlantique oriental, entre le 20 parallèle Nord et le 15 parallèle Sud. *Faune Trop. ORSTOM* **18**, 1-479.

- Brambell Committee (1965). Report of the Technical Committee to Enquire into the Welfare of Animals Kept under Intensive Livestock Husbandry Systems. Command Report 2836, The Stationery office, London.
- Brännäs, E., Alanärä, A. (1993) Monitoring the feeding activity of individual fish with a demand feeding system. *Journal of Fish Biology* **42**, 209-215.
- Branson, E.J. Fish welfare. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, 2008.
- Brelín, D., Petersson, E., Winberg, S. (2005) Divergent stress coping styles in juvenile brown trout (*Salmo trutta*). *Annals of the New York Academy of Sciences* **1040**, 239–245.
- Bolasina, S., Tagawa, M., Yamashita, Y., Tanaka, M. (2006) Effect of stocking density on growth, digestive enzyme activity and cortisol level in larvae and juveniles of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* **259**, 432-443.
- Boujard, T., Jourdan, M., Kentouri, M., Divanach, P. (1996) Diel feeding activity and the effect of time-restricted self-feeding on growth and feed conversion in European sea bass. *Aquaculture* **139**, 117-127.
- Cannon, W. B. (1929) Bodily changes in pain, hunger, fear and rage. *Brandford, Boston*.
- Castanheira, M.F., Herrera, M., Costas, B., Conceição, L.E.C., Martins, C.I.M. (2013a) Linking cortisol responsiveness and aggressive behaviour in gilthead seabream *Sparus aurata*: indication of divergent coping styles. *Applied Animal Behaviour Science* **143**, 75–81.
- Castanheira, M.F., Herrera, M., Costas, B., Conceição, L.E.C., Martins, C.I.M. (2013b) Can we predict personality in fish? Searching for consistency over time and across contexts. *PLoS ONE* **8**, e62037.
- Castanheira, M.F., Conceição, L.E.C., Millot, S., Rey, S., Bégout, M.L., Damsgård, B., Kristiansen, T., Höglund, E., Øverli, Ø., Martins, C.I.M. (2017) Coping styles in farmed fish: consequences for aquaculture. *Reviews in Aquaculture* **9**, 23-41.

- Collignon, J.C. (1971) Les poissons benthiques du plateau continental marocain 2<sup>ème</sup> note: le peuplement des sables cotiers. *Bull. Inst. Pêch. Marit. Maroc.* **18**, 37-69.
- Consejo para el Bienestar de los Animales de Granja de Reino Unido (Farm Animal Welfare Council, FAWC) (1992), basado en las cinco libertades. *Verterinary Records* 131-357.
- Costas, B., Aragão, C., Mancera, J.M., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C. (2008) High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) juveniles. *Aquaculture Research* **39**, 1-9.
- Covès, D., Beauchaud, M., Attia, J., Dutto, G., Bouchut, C., Bégout, M.L. (2006) Long-term monitoring of individual fish triggering activity on a self-feeding system: an example using European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* **253**, 385–392.
- Datos de la Producción de Acuicultura 2015. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA).
- Durand, J.R. (1967) Étude des poissons benthiques du plateau continental congolais; 3<sup>ème</sup> partie: étude de la repartition, de l'abundance et des variations saisonnières. *Cah. Sèr. Océanogr. ORSTOM* **5(2)**, 3-68.
- Ebbesson, L.O., Braithwaite, V.A. (2012) Environmental effects on fish neural plasticity and cognition. *Journal of Fish Biology* **81**, 2151-2174.
- Ellis, T., North, B., Scott, A.P., Bromage, N.R., Porter, M., Gadd, D. (2002) The relationship between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *Journal of Fish Biology* **61**, 493-531.
- Estrategia Andaluza para el Desarrollo de la Acuicultura Marina 2014-2020. Dirección General de Pesca y Acuicultura Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural.

- Flik, G., Klaren, P.H.M., Van den Burg, E.H., Metz, J.R., Huising, M.O. (2006) CRF and stress in fish. *General and Comparative Endocrinology* **146**, 36-44.
- Frost, A.J., Winrow-Giffen, A., Ashley, P.J., Sneddon, L.U. (2007) Plasticity in animal personality traits: does prior experience alter the degree of boldness? *Proc. R. Soc. B* **274**, 333–339.
- Galhardo, L., Vitorino, A., Oliveira, R.F. (2012) Social familiarity modulates personality trait in a cichlid fish. *Biol. Lett.* **8**, 936–938.
- Hachero, I. (2008) Reproducción y cultivo larvario del parracho *Scophthalmus rhombus* (Linneo, 1758). Ph. D. Thesis. Universidad de Cádiz.
- Haralson, J. V., Bitterman, M.E. (1950) A lever-depression apparatus for the study of learning in fish. *Am. J. Physiol.* **63**, 250-256.
- Haukenes, A.H., Barton, B.A. (2004) Characterization of the cortisol response following an acute challenge with lipopolysaccharide in the yellow perch and the influence of rearing density. *Journal of Fish Biology* **64**, 851–862.
- Heemstra, P.C., Gon, O. (1986) Family no. 262: Soleidae. In: Smith, M.M., Heemstra, P.C. (eds.). *Smith's sea fishes*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 868-874.
- Herrera, M., Hachero, I., Ferrer J.F., Rosano, M., Márquez, J.M. y Navas, J.I. (2005) Primeros datos sobre el cultivo de acedía (*Dicologlossa cuneata* Moreau, 1881). *Libro de Resúmenes del X Congreso Nacional de Acuicultura* (Gandía, Octubre 2005); pp. 352-353.
- Herrera, M. (2006) Estado actual y perspectivas de las investigaciones sobre el cultivo de acedía. En: *Actas de las III Jornadas de Acuicultura en el Litoral Suratlántico*, Cartaya, Huelva, pp: 73 – 80.
- Herrera, M. (2008) Biología y cultivo de la acedía (*Dicologlossa cuneata* Moreau, 1881). Ph. D. Thesis. Universidad de Cádiz.

- Herrera, M., Hachero, I., Rosano, M., Ferrer, J.F., Márquez, J.M., Navas, J.I. (2008) First results on spawning, larval rearing and growth of the wedge sole (*Dicologlossa cuneata*) in captivity, a candidate species for aquaculture. *Aquaculture International* **16**, 69-84.
- Herrera, M., Vargas-Chacoff, L., Hachero, I., Ruiz-Jarabo, I., Rodiles, A., Navas, J.I., Mancera, J.M. (2009a) Osmoregulatory changes in wedge sole (*Dicologlossa cuneata* Moreau, 1881) after acclimation to different environmental salinities. *Aquaculture Research* **40**, 762-771.
- Herrera, M., Vargas-Chacoff, L., Hachero, I., Ruiz-Jarabo, I., Rodiles, A., Navas, J.I., Mancera, J.M. (2009b) Physiological responses of juvenile wedge sole *Dicologlossa cuneata* (Moreau) to high stocking density. *Aquaculture Research* **40**, 790-797.
- Herrera, M., Ruiz-Jarabo, I., Hachero, I., Vargas-Chacoff, L., Amo, A., Mancera, J.M. (2012b) Stocking density affects growth and metabolic parameters in the brill (*Scophthalmus rhombus*). *Aquaculture International* **20(6)**, 1041-1052.
- Herrera, M., Castanheira, M.F., Conceição, L.E.C., Martins, C.I.M. (2014) Linking risk taking and the behavioral and metabolic responses to confinement stress in gilthead seabream *Sparus aurata*. *Applied Animal Behaviour Science* **155**, 101-108.
- Herrera, M., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., De La Roca, E., Mancera, J.M. (2015) Metabolic enzyme activities in relation to crowding stress in the wedge sole (*Dicologlossa cuneata*). *Aquaculture Research* **46**, 2808–2818.
- Herrera, M., Rodiles, A., Sánchez, B., López, J.M., De La Roca, E. (2016) Physiological stress responses to captivity in early developmental stages of the wedge sole *Dicologlossa cuneata* (Moreau). *Aquaculture Research* **47**, 732–740.

- Herrera, M., López, J., Herves, A. (2016) A preliminary approach on the stress assessment through harmless procedures in farmed seabream (*Sparus aurata* L.). *Animal Welfare* **25(4)**, 423-427.
- Herrero, M.J, Pascual, M., Madrid, J.A., Sánchez-Vázquez, F.J. (2005) Demand-feeding rhythms and feeding-entrainment of locomotor activity rhythms in tench (*Tinca tinca*). *Physiology y Behavior* **84**, 595–605.
- Herrero Ramón, M.J. (2007) Ritmos de actividad motora, comportamiento alimentario e influencia de la melatonina exógena en peces teleósteos. Ph. D. Thesis. Universidad de Murcia.
- Hughes B.O. (1976). Behaviour as an index of welfare. Proc. V. Europ. Poultry Conference Malta, pp. 1005-1018.
- IDAPES 2016. Sistema de información andaluz sobre datos de comercialización y producción pesquera de la Dirección General de Pesca y Acuicultura de la Junta de Andalucía Consultas Estadísticas Pesqueras 2016. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural.
- Iwama, G.K., Afonso, L.O.B., Vijayan, M.M. (2006) Stress in fishes. In: *The Physiology of Fishes* (ed. by D.H. Evans & J.B. Clairbone), pp. 319–342. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Jiménez, M.P., Sobrino, I., Ramos, F. (1998) Distribution pattern, reproductive biology and fishery of the wedge sole *Dicologoglossa cuneata* in the Gulf of Cádiz, southwest Spain. *Mar. Biol.* **131**, 173-187.
- Johansen, I.B., Sørensen, C., Sandvik, G.K., Nilsson, G.E., Höglund, E., Bakken, M. (2012) Neural plasticity is affected by stress and heritable variation in stress coping style. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* **7**, 161–171.

- King, V.W., Berlinsky, D.L. (2006) Whole-body corticosteroid and plasma cortisol concentrations in larval and juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* L. following acute stress. *Aquaculture Research* **37**, 1282-1289.
- Kitagawa, A.T., Santos Costa, L., Rosa Paulino, R., Kennedy Luz, R., Vieira Rosa, P., Guerra-Santos, B., Fortes-Silva, R. (2015) Feeding behavior and the effect of photoperiod on the performance and hematological parameters of the pacamã catfish (*Lophiosilurus alexandri*). *Applied Animal Behaviour Science* **171**, 211–218.
- Kittilsen, S., Ellis, T., Schjolden, J., Braastad, B.O., Øverli, Ø. (2009) Determining stress-responsiveness in family groups of Atlantic salmon (*Salmo salar*) using non-invasive measures. *Aquaculture* **298**, 146-152.
- Koolhaas, J.M., Korte, S.M., De Boer, S.F., Van Der Vegt, B.J., Van Reenen, C.G., Hopster, H., De Jong, I.C., Ruis, M.A.W., Blokhuis, H.J. (1999) Coping styles in animals: current status in behavior and stress physiology. *Neurosc. Biobehav. Rev.* **23**, 925-935.
- Kulczykowska, E., Sánchez-Vázquez, F.J. (2010) Neurohormonal regulation of feed intake and response to nutrients in fish: aspects of feeding rhythm and stress. *Aquaculture Research* **41**, 654-667.
- Kulkarni, R.S., Pruthviraj, C.B. (2017) Plasma catecholamines levels in two types of fresh water carp fishes, *Labeo rohita* and *Cirrhinus mrigala* collected in wild from an aquatic body near Kalaburagi situated in the Deccan plateau of India. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies* **5(1)**, 10-12.
- Laursen, D.C., Olsén, H.L., Ruiz-Gomez, M.D.L., Winberg, S., Höglund, E. (2011) Behavioural responses to hypoxia provide a non-invasive method for distinguishing between stress coping styles in fish. *Applied Animal Behaviour Science* **132**, 211–216.

- Lloris, D. (1986) Ictiofauna demersal y aspectos biogeográficos de la costa sudoccidental de África (SWA/NAMIBIA). *Monografías Zool. Mar.* **1**, 9-432.
- Lupica, S.J., Turner, J.W. (2010) Noninvasive assessment of nitrate-induced stress in koi *Cyprinus carpio* L. by faecal cortisol measurement. *Aquacult. Res.* **41**, 1622–1629.
- Madrid, J.A., Boujard, T., Sánchez-Vázquez, F.J. (2001) Feeding rhythms, in: D.F. Houlihan, T. Boujard, M. Jobling (Eds.) Food Intake in Fish, Blackwell Science Ltd., Oxford pp. 189-215.
- Mancera, J.M., Martín, M.P. (2002) El sistema de estrés en peces teleósteos. *Encuentros en la Biología*. Vol. **78**.
- Manteca, X., Mainau, E., Temple, D. (2012) Ficha técnica sobre bienestar de animales de granja. Nº 1. *Farm Animal Welfare*.
- Marinaro, J.Y., Allain, J.Y., Lencioni, R., Rousset, J. (1979) La pêche à Mostaganem. *Trav. COP.*, 58 pp.
- Martins, C.I.M., Castanheira, M.F., Engrola, S., Costas, B., Conceição, L.E.C. (2011a) Individual differences in metabolism predict coping styles in fish. *Applied Animal Behaviour Science* **130**, 135-143.
- Martins, C.I.M., Conceição, L.E.C., Schrama, J.W. (2011b) Feeding behavior and stress response explain individual differences in feed efficiency in juveniles of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* **312**, 192–197.
- Martins, C.I.M., Castanheira, M.F., Engrola, S., Costas, B., Conceição, L.E.C. (2011c) Individual differences in metabolism predict coping styles in fish. *Applied Animal Behaviour Science* **130**, 135–143.
- Martins, C.I.M., Galhardo, L., Noble, C., Damsgård, B., Spedicato, M.T., Zupa, W., Beauchaud, M., Kulczykowska, E., Massabuau, J.C., Toby Carter, T., Rey

- Planellas, S., Kristiansen, T. (2012) Behavioural indicators of welfare in farmed fish. *Fish Physiol Biochem* **38**, 17–41.
- Mather, J. A. (2011) Philosophical background of attitudes toward and treatment of invertebrates. *ILAR Journal* **52**, 205-212.
- Maule, A.G., Tripp, R.A., Kaattari, S.L., Schreck, C.B. (1989) Stress alters immune function and disease resistance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Endocrinol.* **120**, 135-142.
- Milano, E.G., Basari, F., Chimenti, C. (1997) Adrenocortical and adrenomedullary homologs in eight species of adult and developing teleosts: morphology, histology, and immunohistochemistry. *Gen. Comp. Endocrinol.* **108**, 483-496.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W. (1999) Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **9**, 211-268.
- Montero, D., Izquierdo, M.S., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J.M. (1999) High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry* **20**, 53-60.
- Navarro, D.B., Rubio, V.C., Luz, R.K., Madrid, F.J., Sánchez-Vázquez, J.A. (2009) Daily feeding rhythms of Senegalese sole under laboratory and farming conditions using self-feeding systems. *Aquaculture* **291**, 30-135.
- Oishi, T. (1991) Fishes. En Y. Chiba; K. Takahashi, eds. *Handbook of Chronobiology*. Tokio. Asakura Shoten: 69-78.
- Øverli, Ø., Pottinger, T.G., Carrick, T.R., Øverli, E., Winsberg, S. (2001) Brain monoaminergic activity in rainbow trout selected for high and low stress responsiveness. *Brain Behav. Evol.* **57(4)**, 214-24.

- Øverli, Ø., Korzan, W.J., Höglund, E., Winberg, S., Bollig, H., Watt, M. (2004a) Stress coping style predicts aggression and social dominance in rainbow trout. *Hormones and Behavior* **45**, 235–241.
- Øverli, Ø., Winberg, S., Pottinger, T.G. (2005) Behavioral and neuroendocrine correlates of selection for stress responsiveness in rainbow trout – a review. *Integrative and Comparative Biology* **45**, 463–474.
- Øverli, Ø., Sørensen, C., Nilsson, G.E. (2006a) Behavioral indicators of stress-coping style in rainbow trout: do males and females react differently to novelty? *Physiology & Behavior* **87**, 506– 512.
- Øverli, Ø., Sørensen, C., Kiessling, A., Pottinger, T.G., Gjøen, H.M. (2006b) Selection for improved stress tolerance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leads to reduced feed waste. *Aquaculture* **261**, 776–781.
- Paspatis, M., Boujard, T. (1996) A comparative study of automatic feeding and self-feeding in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets of different energy levels. *Aquaculture* **145**, 245-257.
- Pavlidis, M., Karantzali, E., Fanouraki, E., Barsakis, C., Kollias, S., Papandroulakis, N. (2011) Onset of the primary stress in European sea bass *Dicentrarchus labrax*, as indicated by whole body cortisol in relation to glucocorticoid receptor during early development. *Aquaculture* **315**, 125-130.
- Peterson, B.C., Booth, N.J. (2010) Validation of a whole-body cortisol extraction procedure for channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fry. *Fish Physiology and Biochemistry* **36**, 661–665.
- Plan Estratégico Plurianual de la Acuicultura Española 2014-2020. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado. NIPO: 280-13-249-7.

- Procarione, L.S., Barry, T.P., Malison, J.A. (1999) Effects of high rearing densities and loading rates on the growth and stress responses of juvenile rainbow trout. *North America Journal of Aquaculture* **61**, 91–96.
- Quéro, J.C., Desoutter, M., Lagardère, F. (1986) Soleidae. In: Whitehead, P.J.P., Bauchot, M.L., Hureau, J.C, Nielsen, J., Tortonese, E. (Eds.), *Fishes of the North-Eastern Atlantic and Mediterranean*, vol. III. UNESCO, U.K., pp. 1309-1324.
- Recomendación del Consejo Europeo sobre el bienestar de peces cultivados. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from European Commission on Food Safety considerations of animal welfare aspects and husbandry systems for farmed fish (2008). *The EFSA Journal* **867**, 1-24.
- Reebs, S.G. (2002) Plasticity of diel and circadian rhythms in fishes. *Rev. Fish Biol. Fisher.* **12**, 349-371.
- Reid, S.G., Perry, S.F. (1996) Cholinergic release of catecholamines from chromaffin cells in the American eel (*Anguilla rostrata*) is mediated exclusively through the nicotinic receptor. *J Comp Physiol* **165(6)**, 464–70.
- Reid, S.G., Bernier, N.J., Perry, S.F. (1998) The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comp. Biochem. Physiol.* **120**, 1-27.
- Rey, S., Rivas, L., Morera Capdevila, D., Callol, A., Huntingford, F.A., Pilarczyk, M., Kadri, S., Mackenzie, S. (2016) Differential responses to environmental challenge by common carp *Cyprinus carpio* highlight the importance of coping style in integrative physiology. *Journal of Fish Biology* **88**, 1056–1069.
- Ribas, L. Flos, R., Reig, L., MacKenzie, S., Barton, B.A., Tort, L. (2007) Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: Stress responses and final product quality. *Aquaculture* **269**, 250-258.
- Roberts Ronald, J. (1981) Patología de los Peces. *Mundi-prensa* 1981.

- Salas-Leiton, E., Anguis, V., Manchado, M., Cañavate, J.P. (2008) Growth, feeding and oxygen consumption of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles stocked at different densities. *Aquaculture* **285**, 84–89.
- Sammouth, S., Roque d'Orbcastel, E., Gasset, E., Lemarié, G., Breuil, G., Marino, G., Coeurdacier, J.L., Fivelstad, S., Blancheton, J.P. (2009) The effect of density on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) performance in a tank-based recirculating system. *Aquacultural Engineering* **40**, 72–78.
- Sánchez, J.G. (1966) Peixes de Angola (Teleosteos). Notas Mimeogr. *Cent. Biol. Pisc.* **46**, 1-227.
- Sánchez-Vázquez, F.J., Madrid, J.A., Zamora, S., Ligo, M., Tabata, M. (1996) Demand feeding and locomotor circadian rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*: dual and independent phasing. *Physiol Behav* **60**, 665–674.
- Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán, J.M., Laiz-Carrión, R., Míguez, J.M., Martín del Río, M.P., Mancera, J.M., Soengas, J.L. (2005b) Interactive effects of high stocking density and food deprivation on carbohydrate metabolism in several tissues of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Journal of Experimental Zoology* **303A**, 761-775.
- Santos, G.A., Schrama, J.W., Mamauag, R.E.P., Rombout, J.H.W.M., Verreth, J.A.J. (2010) Chronic stress impairs performance, energy metabolism and welfare indicators in European seabass (*Dicentrarchus labrax*): The combined effects of fish crowding and water quality deterioration. *Aquaculture* **299**, 73-80.
- Selye H. (1950) *Stress. Acta, Montreal*.
- Silva, P.I.M., Martins, C.I.M., Engrola, S., Marino, G., Øverli, Ø., Conceição, L.E.C. (2010) Individual differences in cortisol levels and behaviour of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles: evidence for coping styles. *Applied Animal Behaviour Science* **124**, 75–81.

- Simontacchi, C., Negrato, E., Pazzaglia, M., Bertotto, D., Poltronieri, C., Radaelli, G. (2009) Whole-body concentrations of cortisol and sex steroids in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*, Richardson 1836) during early development and stress response. *Aquaculture International* **17**, 7–14.
- Smith, J.L.B., 1961. The sea fishes of Southern Africa. 4<sup>th</sup> edition. Central News Agency Ltd. Johannesburg.
- Sneddon, L.U., Elwood, R.W., Adamo, S.A., Leach, M.C. (2014) Defining and assessing animal pain. *Animal Behaviour* **97**, 201-212.
- Sobrino, I., Jiménez, M.P., Ramos, F., Baro, J. (1994) Descripción de las pesquerías demersales de la región suratlántica española. *Informes Técnicos del Instituto Español de Oceanografía* **151**, 1–79.
- Tort, L. (1998) Stress and immunosuppression in fish. *Trends in Comparative Biochem. & Physiol.* **5**, 17-29.
- Tort, L., Balasch, J.C, MacKenzie, S. (2005) Fish health challenge after stress. Indicators of immunocompetence. *Contributions to Science* **2-4**, 443-454.
- Tort, L. (2011) Stress and immune modulation in fish. *Developmental Comparative Immunology* **35(12)**, 1366-1375.
- Valente, L.M.P., Fauconneau, B., Gomes, E.F.S., Boujard, T. (2001) Feed intake and growth of fast and slow growing strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed by automatic feeders or by self-feeders. *Aquaculture* **195**, 121-131.
- Vargas-Chacoff, L., Calvo, A., Ruiz-Jarabo, I., Villarroel, F., Muñoz, J.L., Tinoco, A.B., Cárdenas, S., Mancera, J.M. (2011) Growth performance, osmoregulatory and metabolic modifications in red porgy fry, *Pagrus pagrus*, under different environmental salinities and stocking densities. *Aquaculture Research* **42**, 1269-1278.

- Vargas-Chacoff, L., Martínez, D., Oyarzún, R., Nualart, D., Olavarria, V., Yáñez, A., Bertrán, C., Ruiz-Jarabo, I., Mancera, J.M. (2014a) Combined effects of high stocking density and *Piscirickettsia salmonis* treatment on the immune system, metabolism and osmoregulatory responses of the Sub-Antarctic Notothenioid fish *Eleginops maclovinus*. *Fish Shellfish Immunol.* **40(2)**, 424-34.
- Vargas-Chacoff, L., Ortiz, E., Oyarzún, R., Martínez, D., Saavedra, E., Sá, R., Olavarria, V., Nualart, D., Yáñez, A., Bertrán, C., Mancera, J.M. (2014b) Stocking density and *Piscirickettsia salmonis* infection effect on Patagonian blennie (*Eleginops maclovinus*, Cuvier 1830) skeletal muscle intermediate metabolism. *Fish Physiol Biochem.* **40(6)**, 1683-91.
- Velázquez, M., Zamora, S., Martínez, F.J. (2006) Effect of different feeding strategies on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) demand-feeding behaviour and nutritional utilization of the diet. *Aquaculture Nutrition* **12**, 403-409.
- Vera, L.M., Madrid, J.A., Sánchez-Vázquez, F.J. (2006) Locomotor, feeding and melatonin daily rhythms in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Physiology & Behavior* **88**, 167-172.
- Vila, Y., Jiménez, M.P., Sobrino, I. (2002) Reproductive biology of *Dicologlossa cuneata* (Moreau, 1881) in three zones of Atlantic Iberian coast. *Thalassas* **18(1)**, 19-29.
- Wendelaar Bonga, S.E. (1997) The stress response in fish. *Physiological Reviews* **7**, 591–625.
- Weyts, F.A.A., Cohen, N., Flik, G., Verburg-van Kemenade, B.M.L. (1999) Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish. *Fish & Shellfish Immunology* **9 (1)**, 1-20.
- Zubair, S.N., Peake, S.F., Hare, J.F., Anderson, W.G. (2012) The effect of temperature and substrate on the development of the cortisol stress response in the lake

sturgeon, *Acipenser fulvescens*, Rafinesque (1817). *Environmental Biology of Fish* **93**, 577–587.



## VII. ANEXOS



## VII. ANEXOS

### ABREVIATURAS

|                  |                                                                      |
|------------------|----------------------------------------------------------------------|
| A                | Autodemanda                                                          |
| ACTH             | Hormona Adrenocorticotropa                                           |
| ADAPT            | Adaptación a Nuevo Ambiente                                          |
| ADC              | Alta Densidad de Cultivo                                             |
| ADN              | Ácido Desoxirribonucleico                                            |
| ADP              | Adenosina Difosfato                                                  |
| AMP              | Adenosina Monofosfato                                                |
| ARN <sub>t</sub> | Ácido Ribonucleico Transferente                                      |
| ATP              | Adenosina Trifosfato                                                 |
| BDC              | Baja Densidad de Cultivo                                             |
| CORT             | Cortisol Plasmático                                                  |
| CRF              | Factor Liberador de Corticotropina                                   |
| CV               | Coeficiente de Variación                                             |
| D                | Alimentación Programada Diurna                                       |
| DADP             | Desoxiadenosina Difosfato                                            |
| DC               | Densidad de Cultivo                                                  |
| DDE              | Días Después de la Eclosión                                          |
| EDTA             | Ácido Etilen Diamino Tetraacético (Ethylenediamine Tetraacetic Acid) |

|         |                                                                                       |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| EGTA    | Ácido Etilen Glicol Tetraacético (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid)                   |
| ELISA   | Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)       |
| FBPasa  | Fructosa-1,6-Bifosfatasa (EC 3.1.3.11)                                                |
| FER     | Tasa de Eficiencia Alimenticia (Feed Efficiency Ratio)                                |
| GAS     | Síndrome de Adaptación General                                                        |
| GDH     | Glutamato Deshidrogenasa (EC 1.4.1.2)                                                 |
| GlycPDH | Glucógeno Fosfato Deshidrogenasa                                                      |
| G3PDH   | Gliceraldehido 3-Fosfato Deshidrogenasa (EC 1.1.1.8)                                  |
| G6PDH   | Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa (EC 1.1.1.49)                                        |
| HK      | Hexoquinasa (EC 2.7.1.11)                                                             |
| HPA     | Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal                                                         |
| HPI     | Hipotálamo- Pituitaria -Interrenal                                                    |
| HSC     | Hipotálamo-Simpático-Cromafín                                                         |
| IDAPES  | Sistema de Información Andaluza sobre datos de Comercialización y Producción Pesquera |
| IFAPA   | Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera                             |
| IHS     | Índice Hepatosomático                                                                 |
| K       | Factor de Condición                                                                   |
| LATAT   | Latencia de ataque al “intruso”                                                       |
| LATESC  | Latencia de Escape de la red                                                          |
| LDH     | Lactato Deshidrogenasa (EC 1.1.1.27)                                                  |
| MAPAMA  | Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente                      |

|                   |                                                                   |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------|
| MDC               | Media Densidad de Cultivo                                         |
| MLE               | Estimación de Máxima Probabilidad (Maximum Likelihood Estimation) |
| N                 | Alimentación Programada Nocturna                                  |
| NADH              | Nicotinamida Adenina Dinucleótido (forma reducida)                |
| NADP <sup>+</sup> | Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato                         |
| NAD(P)H           | Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (forma reducida)        |
| NAT               | Número de ataques al “intruso”                                    |
| NENT              | Número de entradas al círculo con el objeto novedoso              |
| NESC              | Número de Intentos de Escape                                      |
| OIE               | Organización Mundial para la Salud Animal                         |
| P                 | Nivel de Significancia                                            |
| PBS               | Tampón fosfato salino                                             |
| PGM               | Fosfoglucomutasa                                                  |
| SD                | Desviación Típica                                                 |
| SEM               | Error Estándar de la Media (Standard Error of the Mean)           |
| SGR               | Tasa de Crecimiento Específico (Specific Growth Rate)             |
| TESC              | Tiempo Total Empleado Escapando                                   |
| UV                | Ultravioleta                                                      |
| VB                | Variación de la Biomasa                                           |
| TS                | Tasa de Supervivencia                                             |



### PALABRAS CLAVE

- Actividad enzimática;
- Alta densidad de cultivo;
- *Coping style*;
- Cortisol;
- Ritmos diarios;



## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Evolución de la producción y del precio de la Acedía en Andalucía desde el año 2000 hasta el año 2016. Fuente: IDAPES, 2016, Junta de Andalucía.

**Figura 2. A.** Distribución de *D. cuneata*. **B.** Ejemplar de la especie.

**Figura 3.** Sistema de Estrés en peces teleósteos. Eje Hipotálamo-Pituitaria-Interrenal (HPI) y Eje Hipotálamo-Simpático-Cromafín (HSC). CRF: factor liberador de corticotropina; ACTH: hormona adrenocorticotropa; A: adrenalina; NA: noradrenalina.

**Figura 4.** Esquema de anatomía interna de pez teleósteo con los principales órganos de los ejes de estrés (HPI y HSC). Adaptación de Barandica 2010.

**Figura 5.** Método para el estudio de la actividad alimentaria en peces a través del uso de comederos de autodemanda y fotocélula infrarroja. Las activaciones de la fotocélula por parte de los peces son recogidas en un ordenador.

**Figura 6.** Tests grupales de Hipoxia y de Riesgo utilizados para la evaluación de *coping styles* en peces.

**Figura 1.1.** Tanque cilíndrico de cultivo larvario con “aguas verdes”.

**Figura 1.2.** Esquema de alimentación para el experimento. Adaptado de Herrera (2008).

**Figura 2.1.** Extracción de hígado de juvenil de acedía.

**Figura 2.2.** Lector de microplacas Tecan Sunrise.

**Figura 3.1.** Comedero Arvo-Tec T Drum 2000 feeder (Finlandia). Detalle del sensor de infrarrojos (Innovaqua IR 020-1) incluido en el cilindro de plástico.

**Figura 4.1.** Acedías marcadas con pinturas al agua mediante inyección subcutánea. Muestreo biométrico.

**Figura 4.2.** Tanques de poliéster (250 L y 0.5 m<sup>2</sup>), utilizados en los ensayos de identificación de coping style. Cada tanque está dividido en dos habitáculos.

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

**Gráfica 1.** Distribución por especies de la producción de piscicultura marina andaluza.  
Fuente: MAPAMA 2015.

**Gráfica 1.1.** Contenido de cortisol total en el cuerpo en larvas de acedía. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n=8$ ) para las diferentes densidades de cultivo: baja (BDC), media (MDC) y alta (ADC) densidad de cultivo. Las barras blancas, grises y negras son para 0, 30 y 45 DDE, respectivamente. Las letras minúsculas indican diferencias entre edades para cada densidad de cultivo. Las letras mayúsculas indican diferencias entre densidades de cultivo para cada edad.

**Gráfica 1.2.** Contenido de glucosa en larvas de acedía. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n=8$ ) para las diferentes densidades de cultivo: baja (BDC), media (MDC) y alta (ADC) densidad de cultivo. Las barras blancas, grises y negras son para 0, 30 y 45 DDE, respectivamente. Las letras minúsculas indican diferencias entre edades para cada densidad de cultivo.

**Gráfica 1.3.** Contenido de lactato en larvas de acedía. Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n=8$ ) para las diferentes densidades de cultivo: baja (BDC), media (MDC) y alta (ADC) densidad de cultivo. Las barras blancas, grises y negras son para 0, 30 y 45 DDE, respectivamente. Las letras minúsculas indican diferencias entre edades para cada densidad de cultivo.

**Gráfica 2.1.** Crecimiento (media  $\pm$  SEM;  $n=20$ ) de especímenes de *D. cuneata* mantenidos bajo diferentes densidades de cultivo (BDC: baja densidad de cultivo; MDC: media densidad de cultivo; ADC: alta densidad de cultivo) durante 197 días. Cada línea fue ajustada a una ecuación cúbica (método MLE).

**Gráfica 2.2.** Distribución de la supervivencia registrada para especímenes de *D. cuneata* mantenidos bajo diferentes densidades de cultivo (BDC: baja densidad de

cultivo; MDC: media densidad de cultivo; ADC: alta densidad de cultivo) durante 197 días.

**Gráfica 2.3.** Actividad de enzimas hepáticos (media  $\pm$  SEM; n=10) en especímenes de *D. cuneata* mantenidos bajo diferentes densidades de cultivo (BDC: baja densidad de cultivo; MDC: media densidad de cultivo; ADC: alta densidad de cultivo) durante 197 días. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

**Gráfica 2.4.** Actividad de enzimas en músculo (media  $\pm$  SEM; n=10) en especímenes de *D. cuneata* mantenidos bajo diferentes densidades de cultivo (BDC: baja densidad de cultivo; MDC: media densidad de cultivo; ADC: alta densidad de cultivo) durante 197 días. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

**Gráfica 3.1.** Evolución del comportamiento alimentario diario de la acedía sujeta a alimentación por autodemanda durante el período experimental (total de las demandas diarias en los tres tanques). Los valores son las medias  $\pm$  SEM de las tres réplicas.

**Gráfica 3.2.** Promedio diario de la actividad alimentaria de las acedias sometidas a alimentación por autodemanda (A). Cada punto representa el % del total de las demandas diarias por hora, por día. Las barras blancas y negras en la parte superior de las gráficas representan las fases de luz y oscuridad (12:12 LD), respectivamente. Los valores son la media  $\pm$  SEM de las tres réplicas.

**Gráfica 3.3.** Promedio diario de la actividad locomotora de la acedía sujeta a autodemanda (A). Las barras blancas y negras en la parte superior de las gráficas representan las fases de luz y oscuridad (12:12 LD), respectivamente. Cada punto representa el % de interrupciones del haz de luz del sensor por períodos de 1 h durante un ciclo de 24 h (% de actividad) y es representado como la media  $\pm$  SEM.

**Gráfica 3.4.** Variación de la Biomasa y Alimento Total Consumido en las tres estrategias alimentarias: autodemanda (A), programada nocturna (N) y programada diurna (D). Diferentes letras indican diferencias significativas entre estrategias ( $P < 0.05$ ; n=30; media  $\pm$  SEM).

**Gráfica 3.5.** Cortisol plasmático en acedias sometidas a diferentes estrategias alimentarias: Autodemanda (A), programada nocturna (N) y programada diurna (D). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ;  $n = 30$ ; mean  $\pm$  SEM).

**Gráfica 3.6.** Metabolitos plasmáticos en acedias sometidas a diferentes estrategias alimentarias: Autodemanda (A), programada nocturna (N) y programada diurna (D). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ;  $n = 30$ ; mean  $\pm$  SEM).

**Gráfica 4.1.** Gráficas de correlación entre variables comportamentales LATESC (s): latencia de escape de la red; TESC (s): tiempo total empleado escapando; NESC: nº intentos de escape; ( $n = 39$ ). P: nivel de significancia,  $r_s$ : Coeficiente de correlación de Pearson.

**Gráfica 4.2.** Gráficas de correlación entre variable fisiológica (CORT ( $\text{ng mL}^{-1}$ ): cortisol plasmático) y comportamentales (ADAPT: nº pellets consumidos a las 2 h y NESC: nº intentos de escape. ( $n = 39$ )). P: nivel de significancia,  $r_s$ : Coeficiente de correlación de Pearson.

**Gráfica 4.3.** Resultados de la actividad enzimática hepática ( $\text{U mg prot}^{-1}$ ) de cada grupo. Las enzimas son: Alanina aminotransferasa (AlaT), Fructosa 6-bifosfatasa (FBPasa), Glucógeno fosforilasa (GPasa) y Fosfofructoquinasa (PKF). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los grupos CS1 y CS2 ( $p < 0.05$ ). Los valores son media  $\pm$  SE ( $n = 19$ ).

**Gráfica 4.4.** Gráficas de correlación entre las distintas enzimas hepáticas ( $\text{U mg prot}^{-1}$ ). Las enzimas son: Alanina aminotransferasa (AlaT), Fructosa 6-bifosfatasa (FBPasa), Glucógeno fosforilasa (GPasa) y Fosfofructoquinasa (PKF). P: nivel de significancia,  $r_s$ : Coeficiente de correlación de Pearson.



## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Síndrome de Adaptación General (GAS) o Ley de Selye. Adaptado de Barandica (2010).

**Tabla 1.1.** Datos biométricos y tasa de supervivencia al final del experimento; media  $\pm$  SEM (n=3 para supervivencia, y n=45-60 para el resto). Diferentes letras en superíndices indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ).

**Tabla 1.2.** Contenido de cortisol total en el cuerpo de algunas larvas de peces descrito en la literatura.

**Tabla 2.1.** Condiciones específicas para el ensayo de las enzimas utilizadas en este estudio.

**Tabla 2.2.** Supervivencia y datos biométricos (media  $\pm$  SEM) para cada densidad de cultivo (BDC: baja densidad de cultivo; MDC: media densidad de cultivo; ADC: alta densidad de cultivo). LT: longitud total; SGR: tasa de crecimiento específico; K: factor de condición; IHS: índice hepatosomático. Diferentes letras en superíndices indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ).

**Tabla 2.3.** Cortisol y metabolitos plasmáticos (glucosa, lactato, triglicéridos y proteínas) registradas para cada densidad de cultivo (BDC: baja densidad de cultivo; MDC: media densidad de cultivo; ADC: alta densidad de cultivo). Los valores son media  $\pm$  SEM. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $p<0.05$ ).

**Tabla 3.1.** Parámetros biológicos y de alimentación: tasa de crecimiento específico (SGR), tasa de eficiencia alimentaria (FER), tasa de supervivencia (TS), medidos al final del ensayo. Diferentes letras en superíndices indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ; n=30; media  $\pm$  SEM).

**Tabla 4.1.** Condiciones específicas para el ensayo de las enzimas utilizadas en este estudio.

**Tabla 4.2.** Media, desviación típica, error estándar, coeficiente de variación (%), valores máximos y mínimos de las variables consideradas en este estudio (n = 39): ADAPT: nº pellets consumidos a las 2h; NENT: nº de entradas al círculo con “objeto novedoso”; LATAT (s): latencia de ataque al “intruso”; NAT: número de ataques al “intruso”; LATESC (s): latencia de escape de la red; TESC (s): tiempo total empleado escapando; NESC: nº intentos de escape; CORT (ng mL<sup>-1</sup>): cortisol plasmático.

**Tabla 4.3.** Resultados de los tests de comportamiento y fisiología de los diferentes grupos. Los valores son la media ± SEM (n=39). ADAPT: nº pellets consumidos a las 2h; LATESC (s): latencia de escape de la red; TESC (s): tiempo total empleado escapando; NESC: nº intentos de escape; CORT (ng mL<sup>-1</sup>): cortisol plasmático. Diferentes letras en superíndices indican diferencias significativas (p<0.05).

## **ASPECTOS ÉTICOS**

Los animales que se han utilizado para el desarrollo de esta Tesis han sido acedías producidas en su totalidad en el Centro IFAPA “Agua del Pino”, cultivadas bajo condiciones normales de mantenimiento. En ningún momento se ha utilizado animales modificados genéticamente ni se han aplicado modificaciones genéticas en el desarrollo de los ensayos. Durante el trascurso de los experimento se han aplicado las Directrices del Consejo de la Unión Europea (2010/63 / EU) y del Gobierno español (RD1201 / 2005, RD53 / 2013 y 32/2007) para el uso de animales de laboratorio.



## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Durante la elaboración de esta Tesis Doctoral se ha obtenido la siguiente producción científica:

### PUBLICACIONES

- **De la Roca, E.**, Sánchez, B., López, J.M., Herves, M.A., Canalejo A., Herrera, M. (2017) Daily activity rhythms and the stress-related response in the wedge sole (*Dicologoglossa cuneata* Moreau, 1881). *Physiology and Behavior* **173**, 272–278.
- Herrera, M., Rodiles, A., Sánchez, B., López, Juan M., **De La Roca, E.** (2016) Physiological stress responses to captivity in early developmental stages of the wedge sole *Dicologoglossa cuneata* (Moreau). *Aquaculture Research* **47**, 732–740. doi:10.1111/are.12531
- Herrera, M., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff L., **De La Roca, E.**, Mancera, J.M. (2015). Metabolic enzyme activities in relation to crowding stress in the wedge sole (*Dicologoglossa cuneata*). *Aquaculture Research*, **46**, 2808–2818. doi: 10.1111/are.12440.

### COMUNICACIONES A CONGRESOS

- **De la Roca, E.**, Sánchez, B., López, J.M., López, J., Herrera, M. Actividades enzimáticas del metabolismo energético asociadas a diferentes patrones de comportamiento y respuestas fisiológicas en acedías (*Dicologoglossa cuneata*). Libro de Resúmenes del XV Congreso Nacional de Acuicultura (octubre 2015), Huelva, pp. 260-261.
- **De la Roca, E.**, M. Herrera, J.M. López, B. Sánchez, M.L. Cordero. 2013. Relaciones entre fisiología y comportamiento en la acedía (*Dicologoglossa cuneata*): primera

aproximación a la identificación de *coping styles*. XIV. Libro de Resúmenes del XIV Congreso Nacional del Acuicultura (septiembre 2013), Gijón (Asturias), pp. 182-183.

- Herrera, M., Rodiles, A., Sánchez, B., Aguilar, J.M., **De la Roca, E.** Parámetros fisiológicos y biométricos de la larva de acedía (*Dicologoglossa cuneata*) en función de la densidad de cultivo. Libro de Resúmenes del V FIRMA (noviembre 2012), Cádiz, pp. 101.

- **De La Roca, E.**, Herrera, M., Cordero, M.L., 2011. Influencia de distintas estrategias alimentarias sobre parámetros biométricos y fisiológicos en la acedía (*Dicologoglossa cuneata* Moreau, 1881). Libro de Resúmenes del XIII Congreso Nacional del Acuicultura (noviembre 2011), Castelldefels (Barcelona), pp. P-029.

- **De la Roca, E.**, Herrera, M., 2012. Estudio de los ritmos alimenticio y locomotor de la acedía (*Dicologoglossa cuneata*). Libro de resúmenes de las VI Jornadas de Acuicultura del Litoral Suratlántico (mayo 2012), Cartaya (Huelva), en prensa.

- **De la Roca, E.**, Herrera, M., Hachero-Cruzado, I., Cordero, M.L. 2010. Effects on growth of *Dicologoglossa cuneata* using two feeding strategies: feeding Schedule and self-feeding. Actas del Congreso Europeo de Acuicultura (octubre 2010) Oporto, (Portugal). Comunicación Oral.

- **De La Roca, E.**, Herrera, M., Hachero, I., Navas, J.I., Cordero, M.L. 2009. Influencia de distintas condiciones de cultivo sobre el crecimiento y la supervivencia de la acedía (*Dicologoglossa cuneata*). Libro de Resúmenes del XII Congreso Nacional De Acuicultura (noviembre 2009), Madrid, pp. 544-545.

- Herrera, M., Hachero, I., **de la Roca, E.**, Navas, J.I., 2009. Influencia de la temperatura sobre el crecimiento y la supervivencia de la acedía en cautividad (*Dicologoglossa cuneata* Moreau, 1881). Resúmenes II Simposio Internacional de Ciencias del Mar (abril 2009), Vigo, pp. 110-111

### ASISTENCIAS A JORNADAS Y REUNIONES CIENTÍFICAS

- **Jornada técnica final del proyecto “PROMAR: Cooperación Algarve-Andalucía para la promoción de recursos acuícolas marinos en el litoral Suratlántico”** celebrada en Cartaya el 22 de septiembre de 2008.
- **Jornadas de Puertas Abiertas** en el Centro IFAPA Agua del Pino (Semana de La Ciencia). Desde 2009 hasta 2013, un día al año.
- **XII Congreso Nacional de Acuicultura**, celebrado en Madrid del 24 al 26 de noviembre de 2009.
- **V Jornadas de “Acuicultura en el Litoral Suratlántico”** organizadas por el Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), celebradas en el centro cultural de la Villa, Cartaya, los días 15 y 16 de abril de 2010.
- **Jornadas de Puertas Abiertas 2010**. Centro IFAPA Agua del Pino, Huelva. Día 11 de Noviembre de 2010.
- **Jornada técnica final del proyecto “ECOQUA: Establecimiento de una red de cooperación transfronteriza para la utilización de sistemas de producción ecológicamente sostenibles en acuicultura”** celebrada en Cartaya el 20 de junio de 2011.
- **VI Jornadas de “Acuicultura en el Litoral Suratlántico”** organizadas por el Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), celebradas en el centro cultural de la Villa, Cartaya, los días 9 y 10 de mayo de 2012.
- **Jornada técnica final del proyecto “BONAQUA: Cooperación transfronteriza para el desarrollo de buenas prácticas sanitarias en acuicultura marina”** celebrada en Cartaya el 3 de diciembre de 2013.
- **XV Congreso Nacional de Acuicultura**, celebrado en Huelva del 13 al 16 de octubre de 2015.
- **V Foro Iberoamericano de los Recursos Marinos y de la Acuicultura**, celebrado en Cádiz del 26 al 29 de noviembre del 2012.

