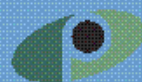


M^a Encarnación Vera Cruz Rubio Fernández

**Regulación de la ingesta de macronutrientes
en peces teleósteos. Influencia de factores
ambientales, nutricionales
y neuroendocrinos**

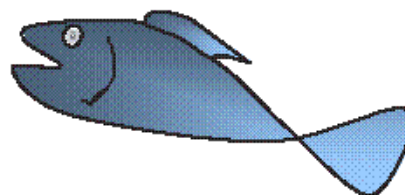


UNIVERSIDAD DE MURCIA



Plan de Ciencia y Tecnología
Región de Murcia
2003-2006

A mis padres



Sólo sé que no sé nada.

Sócrates

Sin vosotros este trabajo no habría sido posible. Gracias, "mis pececitos"

Con la presentación de esta memoria de Tesis Doctoral, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado en su realización y de forma particular:

A sus directores, Dr. Juan Antonio Madrid Pérez y Dr. Francisco Javier Sánchez Vázquez por la confianza depositada en mí, la entrega e interés constante mostrados a lo largo de estos casi ocho años.

Al Dr. Salvador Zamora Navarro por su gran apoyo, consejos, cariño y ayuda mostrados durante estos años. Sé que me reitero pero la verdad es atemporal y todos los consejos que me ha dado me han ayudado a crecer como persona y superarme. Para mí hace años que nació una estrecha relación basada en el respeto, la admiración y la amistad, relación sin la que probablemente hoy no estaría aquí. Espero poder seguir disfrutando de ella.

Al Dr. Francisco Javier Martínez López, gracias por ser esa mano amiga sin la cual no se puede avanzar. Gracias por tantos consejos, aunque algunos de ellos duelan. Hay personas que sin pretenderlo se convierten en piezas clave de tu vida.

Me gustaría agradecer tantas cosas a tantas personas que esta sección no acabaría nunca, por lo que tendréis que perdonarme que os lo agradezca de forma impersonal.

A todos los profesores del Departamento: Pilar, Jorge, Paquita, Marta, José Ángel, Marian, Juanfran, Elvira. Sin todos vosotros esta Tesis Doctoral no habría sido posible. Gracias por estar siempre ahí, por vuestra ayuda y vuestra gran calidad humana. Muchas veces no nos damos cuenta de lo que realmente es importante en esta vida. Todos juntos formáis un equipo de investigadores de primera línea, pero eso no vale nada al lado de vuestra enorme valía como personas. Gracias por tantos momentos.

A todos mis compañeros del grupo de Departamento de Fisiología, pasados y presentes, con los que he pasado muchos buenos y malos ratos.

A la Fundación Séneca, el Instituto de Fomento de la Región de Murcia, la Consejería de Trabajo y Política Social y al Fondo Social Europeo (Programa Operativo Integrado para la CARM 2000-2006) por la Beca de Investigación Aplicada/Beca Asociada a la Realización de Proyectos de Investigación concedida a Vera Cruz Rubio Fernández.

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología (proyecto AGL2001-0698 concedido a Juan Antonio Madrid) y a la Unión Europea (Acción Concertada Q5CA-2001-989 concedida a Francisco Javier Sánchez Vázquez) que han subvencionado la infraestructura necesaria para llevar a cabo la presente memoria.

A Culmarex S.A. por su colaboración en la concesión de la Beca que he disfrutado durante estos años y por la generosa cesión de los peces junto con el Centro de Recursos Marinos y Humedales del Litoral, C.A.R.M. de San Pedro del Pinatar. Muy especialmente quiero agradecer a M^{ra} Carmen Marín Jiménez de la empresa Culmarex S.A., su saber hacer y el cariño mostrado hacia mí. Gracias por ayudarme, incluso los domingos y siempre con una sonrisa. Me has enseñado mucho.

Quisiera agradecer su consideración conmigo a los expertos europeos que han compartido conmigo las prisas y agobios de los últimos momentos de la Tesis. Gracias por haber hecho el gran esfuerzo de revisar la Tesis en unos pocos días e incluso leyendo algún capítulo en castellano. Sólo me resta reiteraros el gran honor que ha supuesto para mí.

A todos mis amigos: Mariló, Andrés, Miguel, M^a Dolores, Juanjo, Lourdes, Rui, Carlos, Ana, Manolo, Paco Rueda, Mezian, Susana, Nacho, José Vicente, Juan Antonio, Pepa mi andaluza guapa ... vuestra amistad, ánimos y cariño, en muchos momentos me han dado alas. No sería nada sin vosotros.

A Paco, mi técnico de laboratorio maravilloso. Gracias por echarme un cable tantas veces y siempre con una sonrisa encantadora y la broma preparada.

Siempre los dejo para el final, pero es que ellos son los que merecen mi mayor reconocimiento. Mis padres y mi nana Eva. Gracias por aguantar mis agobios, frustraciones y mi mal humor, ¡que no es poco!. Gracias por compartir conmigo tantas alegrías e ilusiones. Gracias por darme la vida continuamente compartiendo vuestro amor, cariño y dedicación conmigo. Por ayudarme a levantarme cada vez que me he caído y no encontraba donde asirme para volver a renacer como el ave Fénix. Gracias por ser como sois.

ÍNDICE

Nombres comunes y científicos de las especies citadas.....	13
Glosario de términos científicos	17
Introducción	
1. Introducción.....	23
1.1. Mecanismos que controlan la selección de macronutrientes.....	23
1.1.1. Prerrequisito sensorial para la ingesta específica de macronutrientes:	
Señales externas del alimento	23
1.1.1.1. Características sensoriales inherentes a los macronutrientes.....	23
1.1.1.2. Confusión sensorial y nutricional.....	25
1.1.2. Control gastrointestinal de la ingesta y señales adiposas.....	25
1.1.2.1. Saciedad a corto plazo: señales del tracto gastrointestinal y el hígado.....	26
1.1.2.1.1. Factores gástricos: Mecano y quimiorreceptores.....	26
1.1.2.1.2. Factores intestinales: CCK, GLP-1, GRP y Grelina.....	26
1.1.2.1.3. Factores hepáticos	29
1.1.2.2. Saciedad a largo plazo: señales adiposas.....	29
1.1.2.2.1. Señales del páncreas: Insulina	29
1.1.2.2.2. Señales del tejido adiposo: Leptina	31
1.1.3. Control neural de la ingesta	33
1.1.3.1. Regiones cerebrales implicadas en la regulación de la ingesta de alimento	
en mamíferos	34
1.1.3.1.1. Tronco del encéfalo	34
1.1.3.1.2. Hipotálamo.....	34
1.1.3.1.3. Corteza cerebral.....	35
1.1.3.1.4. Amígdala.....	36
1.1.3.2. Regiones cerebrales implicadas en la regulación de la alimentación en peces	
1.1.3.3. Señales orexigénicas cerebrales.....	37
1.1.3.3.1. Neuropeptido Y (NPY).....	37
1.1.3.3.2. Hipocretinas/Orexinas (OX)	40
1.1.3.3.3. Galanina (GAL).....	42
1.1.3.3.4. Péptidos derivados del gen pro-opiomelanocortina (POMC)	44
1.1.3.3.5. Hormona concentradora de la melanina (MCH)	46
1.1.3.4. Señales anorexigénicas cerebrales	47
1.1.3.4.1. Colecistoquinina (CCK)	48
1.1.3.4.2. Bombesina (BBS).....	51
1.1.3.4.4. Péptido regulador de la transcripción de cocaína-anfetamina (CART)	52
1.1.3.4.4. Factor liberador de corticotropina (CRF).....	54

1.1.3.4.5. Serotonina (5-HT)	55
1.1.4. Control endocrino de la ingesta.....	59
1.1.4.1. Hormonas estimuladoras de la ingesta	59
1.1.4.1.1. Hormonas Tiroideas (TH)	59
1.1.4.1.2. Hormona del crecimiento (GH) y "Insulin-like growth factor I" (IGF-I)	61
1.1.4.1.3. Insulina (Efectos a corto plazo)	63
1.1.4.2. Hormonas inhibidoras de la ingesta	64
1.1.4.2.1. Melatonina	64
1.1.4.2.2. Insulina, glucagón y péptidos similares al glucagón (GLPs).....	67
1.1.4.2.3. Leptina	69
1.1.4.2.4. Cortisol	71
1.1.5. Control metabólico de la ingesta	72
1.1.5.1. Precargas de Macronutrientes.....	72
1.1.5.2. Ayuno selectivo.....	77
1.1.6. Influencia de los factores ambientales en la ingesta.....	80
1.1.6.1. Factores abióticos.....	81
1.1.6.1.1. Iluminación	81
1.1.6.1.2. Temperatura	84
1.1.6.1.3. Otros factores físicos.....	86
1.1.6.1.4. Factores químicos.....	87
1.1.6.2. Factores bióticos.....	89
1.1.6.2.1. Estructura social.....	89
1.1.6.2.2. Densidad de cultivo.....	90
1.1.6.2.3. Predadores	92
1.1.6.2.4. Perturbaciones humanas	92
1.2. Biología: Aspectos generales de las especies objeto de estudio.....	93
1.2.1. Lubina.....	93
1.2.1.1. Nomenclatura	93
1.2.1.2. Distribución geográfica, local y hábitat preferido.....	93
1.2.1.3. Comportamiento alimentario	94
1.2.2. Trucha arco iris.....	95
1.2.2.1. Nomenclatura	95
1.2.2.2. Distribución geográfica, local y hábitat preferido.....	95
1.2.2.3. Comportamiento alimentario	96
Objetivos	
2. Objetivos	99
2.1. Objetivo general	99
2.2. Objetivos específicos.....	99
Introduction and objectives	
3. General introduction and objectives.....	103
3.1. General introduction.....	103

3.2. Objectives.....	104
3.2.1. Specific objectives.....	104
3.2.1.1. Previous methodological development.....	104
3.2.1.2. Nutritional factors.....	104
3.2.1.3. Neuroendocrine factors.....	105
3.2.1.4. Endocrine factors influence.....	105
3.2.1.5. Environmental factors influence.....	105
3.2.2. Experimental design.....	105
Material y métodos	
4. Material y métodos generales.....	111
4.1. Instalaciones.....	111
4.1.1. Laboratorio de Crononutrición de la Universidad de Murcia.....	111
4.1.2. Laboratorio de Crononutrición de la Unidad Mixta INRA-IFREMER.....	112
4.2. Parámetros ambientales del laboratorio de Crononutrición de la Universidad de Murcia.....	112
4.3. Peces empleados.....	113
4.4. Elaboración de las dietas.....	113
4.5. Diseño experimental general.....	114
4.6. Parámetros biológicos.....	115
4.7. Tratamiento y análisis de datos.....	116
4.8. Videgrabación.....	117
Trabajo experimental	
5.1. Selección de macronutrientes a través de señales post-ingestivas en la lubina alimentada con cápsulas de gelatina.....	131
5.2. Incapacidad de la trucha arco iris para seleccionar macronutrientes encapsulados.....	139
5.3. Influencia de la precarga de un nutriente en la selección de macronutrientes encapsulados en la lubina.....	149
5.4. Selección de macronutrientes en los peces a través de señales post- ingestivas: efecto de la privación selectiva de macronutrientes.....	157
5.5. Papel de la colecistoquinina y su antagonista proglumide en la selección de macronutrientes en la lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i> , L.).....	165
5.6. La serotonina afecta la cantidad y la calidad de macronutrientes seleccionados en la lubina <i>Dicentrarchus labrax</i> L.....	171
5.7. La administración oral de melatonina reduce la ingesta de alimento y modifica la selección de macronutrientes en la lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i> , L.).....	179
5.8. Efecto de la administración oral de cortisol en la ingesta de alimento en la trucha arco iris.....	185
5.9 La salinidad influye en la ingesta de alimento y modifica la selección de macronutrientes en la lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i> , L.).....	193

Discusión general

6. Discusión general.....	197
6. General discussion.....	211
6.1. Aspectos metodológicos.....	197
6.1. Methodological aspects	211
6.2. Aprendizaje asociativo entre el color y el contenido de las cápsulas.....	199
6.2. Associative learning between the capsules color and their content	213
6.3. ¿Qué regulan los peces?.....	200
6.3. What do fish regulate?	213
6.4. ¿Cómo tiene lugar el aprendizaje?.....	202
6.4. How does learning take place?	215
6.4.1. Señales cefálicas	204
6.4.1. Cephalic signals	217
6.4.2. Señales generadas durante la digestión y absorción de nutrientes.....	205
6.4.2. Signals generated during the digestion and absorption of nutrients	218
6.4.3. Transducción neural.....	206
6.4.3. Neural transduction.....	219
6.5. Aplicaciones y perspectivas de los estudios de selección de macronutrientes encapsulados.....	208
6.5. Applications and perspectives of encapsulated macronutrient selection studies.....	221
6.5.1. Utilización de atractantes para la mejora de la ingesta de alimento.....	208
6.5.1. Use of attractants to improve food intake.....	221
6.5.2. Incorporación de nuevas fuentes de macronutrientes de origen vegetal	208
6.5.2. Incorporation of new macronutrient sources of plant origin	221
6.5.3. Diseño de dietas estacionales o adaptadas a cambios fisiológicos.....	209
6.5.3. Design of seasonal diets or diets adjusted to physiological changes.....	221
6.5.4. Selección genética de acuerdo con las preferencias por macronutrientes..	209
6.5.4. Genetic selection according to the preferences for macronutrients.....	222

Conclusiones

7. Conclusiones.....	225
7. Conclusions	227

Bibliografía.....	231

Anexos	301

Nombres comunes y científicos

Nombres comunes y científicos de las especies citadas

Castellano	Inglés	Nombre científico	
–	Atipa	<i>Hoplosternum littorale</i>	Hancock
–	Brown bullhead	<i>Ictalurus nebulosus</i>	Lesueur
–	Green bluegill	<i>Lepomis cyanellus</i>	Rafinesque
Anchova de banco	Bluefish	<i>Pomatomus saltatrix</i>	Linnaeus
Bacalao del Atlántico	Atlantic cod	<i>Gadus morhua</i>	Linnaeus
Bagre de canal	Channel catfish	<i>Ictalurus punctatus</i>	Rafinesque
Carpa común	Common carp	<i>Cyprinus carpio</i>	Linnaeus
Carpa de hierba	Grass carp	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Valenciennes
Carpín	Crucian carp	<i>Carassius carassius</i>	Linnaeus
Carpín dorado	Goldfish	<i>Carassius auratus</i>	Linnaeus
Chopa	Black bream	<i>Acanthopagrus butcheri</i>	Munro
Dorada	Gilthead seabream	<i>Sparus aurata</i>	Linnaeus
Fletán del Atlántico	Atlantic halibut	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Linnaeus
Fúndulo	Mummichog	<i>Fundulus heteroclitus</i>	Linnaeus
Gobio de arena	Sand goby	<i>Pomatoschistus minutus</i>	Pallas
Lamprea de río	River lamprey	<i>Lampræta fluviatilis</i>	Linneus
Lota	Burbot	<i>Lota lota</i>	Linnaeus
Lubina	European seabass	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Linnaeus
Lucioperca	Zander	<i>Stizostedion lucioperca</i>	Linnaeus
Pámpano amarillo	Florida pompano	<i>Trachinotus carolinus</i>	Linnaeus
Pargo	Red porgy	<i>Pagrus pagrus</i>	Linnaeus
Perca	Eurasian perch	<i>Perca fluviatilis</i>	Linnaeus
Perca dorada	Golden perch	<i>Macquaria ambigua</i>	Richardson
Perca plateada	Silver perch	<i>Bidyanus bidyanus</i>	Mitchell
Perro chico	Spotted wolffish	<i>Anarhichas minor</i>	Olafsen
Pez cebra	Zebrafish	<i>Brachydanio rerio</i>	Hamilton
Pez gato africano	African catfish	<i>Clarias gariepinus</i>	Burchell
Pez sol	Small bluegill	<i>Lepomis macrochirus</i>	Rafinesque
Platija Europea	European flounder	<i>Platichthys flesus</i>	Linnaeus
Rodaballo	Turbot	<i>Scophthalmus maximus</i>	Linnaeus
Salmón del Atlántico	Atlantic salmon	<i>Salmo salar</i>	Linnaeus
Salmón keta	Chum salmon	<i>Oncorhynchus keta</i>	Walbaum
Salmón plateado	Coho salmon	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Walbaum
Salmón real	Chinook salmon	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Walbaum
Tenca	Tench	<i>Tinca tinca</i>	Linnaeus

Castellano	Inglés	Nombre científico	
Tilapia del Mozambique	Mozambique tilapia	<i>Oreochromis sambicus</i>	Peters
Tilapia del Nilo	Nile tilapia	<i>Oreochromis niloticus</i>	Linnaeus
Trucha alpina	Arctic charr	<i>Salvelinus alpinus</i>	Linnaeus
Trucha arco iris	Rainbow trout	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Richardson
Trucha común	Brown trout	<i>Salmo trutta</i>	Linnaeus
Trucha común	Brown trout	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Mitchill
Trucha lacustre	Lake trout	<i>Salvelinus namaycush</i>	Walbaum

Glosario de términos científicos

Glosario de términos científicos

5-HIAA	Ácido 5-hidroxi-indolacético
5-HT	Serotonina (5-hidroxitriptamina)
5-HT1	Receptor de la serotonina tipo 1
5-HT2	Receptor de la serotonina tipo 2
α-MSH	Hormona estimulante de los melanocitos α
β-END	β -Endorfina
β-LPH	Hormona β -lipotropina
β-MSH	Hormona estimulante de los melanocitos β
γ-LPH	Hormona γ -lipotropina
γ-MSH	Hormona estimulante de los melanocitos γ
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
AD	Agua dulce
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AGRP	Péptido relacionado con el gen agouti Proteína relacionada con el gen agouti
AP	Área postrema
ARC	Núcleo arqueado
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AS	Agua salada
AV	Aferencias vagales
BB3	Receptor de la bombesina de tipo 3
BB4	Receptor de la bombesina de tipo 4
BBS	Bombesina
CART	Transcripto regulado por cocaína y anfetamina
CCK	Colecistoquinina
CCK-A	Receptor de la colecistoquinina de tipo A
CCK-AR	Antagonista de los receptores CCK-A
CCK-B	Receptor de la colecistoquinina de tipo B
CH	Carbohidratos
CRF	Factor liberador de corticotropina
CRF R1	Receptor del factor liberador de corticotropina de tipo 1
CRF R2	Receptor del factor liberador de corticotropina de tipo 2
DMN	Núcleo dorsomedial
DMV	Núcleo dorsomotor del vago
F	Grasa o Lípidos
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAL	Galanina
GAL-like	Péptido similar a la GAL
GALR1	Receptores de la galanina tipo 1
GALR2	Receptores de la galanina tipo 2

GALR3	Receptores de la galanina tipo 3
GH	Hormona del crecimiento
GHRH	Hormona liberadora de hormona del crecimiento
GIP	Polipéptido insulínotropo glucosa-dependiente
GLP	Péptido similar al glucagón
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
GRP	Polipéptido liberador de gastrina
HFA	Área hipotalámica de alimentación
HPA	Hipotalámico-pituitario-adrenocortical
HPI	Hipotalámico-pituitario-interrenal
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
IGF-I	Factor del crecimiento I similar a la insulina
IR	Inmunoreactivas
LH	Hipotálamo lateral
LHA	Área hipotalámica lateral
MC4-R	Receptor para la melanocortina de tipo 4
MCH	Hormona concentradora de la melanina Hormona concentradora de los melanocitos
NAL	Naloxona
NE	Norepinefrina
NMB	Neuromedina B
NPY	Neuropéptido Y
NTS	Núcleos del tracto solitario
OB-RL	Receptor de la leptina de tipo L
OB-Rb	Receptor de la leptina de tipo b
OX	Hipocretinas/orexinas
OX-A	Orexina-A
OX-B	Orexina-B
OX₁	Receptores de la orexina tipo 1
OX₂	Receptores de la orexina tipo 2
P	Proteína
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Área hipotalámica perifornical
POA	Área preóptica
POMC	Péptidos derivados del gen pro-opiomelanocortina
PP	Polipéptido pancreático
PRL	Prolactina
PVN	Núcleo paraventricular del hipotálamo
PY	Péptido pancreático Y de peces
PYY	Péptido tirosina-tirosina o Peptido YY
SNC	Sistema nervioso central
T₃	Triyodotironina

Introducción

1. Introducción

1.1. Mecanismos que controlan la selección de macronutrientes

En los últimos 30-40 años se ha avanzado exponencialmente en el conocimiento de los mecanismos que regulan la ingesta de alimento y la selección de macronutrientes en mamíferos. Sin embargo, los estudios que se han realizado hasta el momento para dilucidar estos mecanismos en peces son escasos, centrándose exclusivamente en el control de la ingesta de alimento, permaneciendo hasta este momento sin estudiar los mecanismos que regulan la selección de macronutrientes. Esta carencia de antecedentes bibliográficos obliga a los investigadores a utilizar como fuente de información lo publicado hasta ahora en otros vertebrados, especialmente en mamíferos. Por ello, la presente introducción estará referida fundamentalmente a lo que se conoce en mamíferos y, cuando sea posible, a los descubrimientos realizados en diferentes especies de peces teleósteos.

1.1.1. Prerrequisito sensorial para la ingesta específica de macronutrientes: Señales externas del alimento

Según Thibault y Booth (1999) la ingesta selectiva de un macronutriente sólo puede tener lugar si los alimentos poseen alguna propiedad química o física que pueda ser detectada al ingerirlos. Es decir, alguna característica sensorial distintiva de las moléculas de proteína, carbohidratos o grasa, ya que a no ser que exista una clave sensorial sobre la presencia de un macronutriente, no es posible un mecanismo por el cual se produzca una ingesta selectiva.

1.1.1.1. Características sensoriales inherentes a los macronutrientes

Los macronutrientes poseen pequeñas moléculas que actúan nutricionalmente como proteínas, carbohidratos y grasas, que son discriminadas por los sentidos. Los péptidos y aminoácidos libres son asociados con proteína, los azúcares y otros carbohidratos simples, como amino azúcares y alcohol azúcares, con carbohidratos y los ácidos grasos de cadena corta y alcoholes acilados de nitrógeno, como la fosfatidilcolina, con grasas (Thibault y Booth, 1999).

El comportamiento alimentario es complejo, compuesto por una serie consecutiva de fases y estadios que comienzan con la percepción de la señal de presencia de alimento y finalizan con la decisión por parte del individuo de aceptar o rechazar el alimento (Kasumyan, 1997; Lamb, 2001). En los peces, todos los sentidos participan en el comportamiento alimentario: visión, audición, olfacción, electrorrecepción y mecanorecepción (Kasumyan, 1997).

Visión. Las moléculas de macronutrientes carecen de un color distintivo, por lo que la coloración no sirve como clave para detectar la presencia de un macronutriente concreto en un alimento (Thibault y Booth, 1999). En el medio acuático la utilización de la visión

para reconocer las presas puede estar limitada por la turbidez del agua, por lo que son más utilizadas otras claves para localizar el alimento (Sorensen y Caprio, 1998).

Audición. Un objeto en movimiento y que produce un sonido (presumiblemente un animal) se corresponde con una fuente de energía que es mucho más rica en proteína que en carbohidratos, ya que el contenido en grasa de una planta o un animal puede ser similar. Por tanto, los animales carnívoros y herbívoros utilizan la visión y la audición como claves externas para seleccionar su presa (Thibault y Booth, 1999).

Olfacción. La mayoría de las moléculas de los macronutrientes son demasiado grandes para ser volátiles, por lo que no pueden ser olidas, pero poseen moléculas más pequeñas, como los aminoácidos en el caso de la proteína, que pueden vaporizarse y provocar el estímulo olfatorio (Thibault y Booth, 1999). Los aminoácidos son un estímulo gustatorio y olfatorio muy importante en peces. Los L-aminoácidos sirven como una señal para reconocer el alimento y son detectados por todas las especies de peces en las que se han probado (revisiones: Hara, 1994; Sorensen y Caprio, 1998; Lamb, 2001). Las claves químicas son las más utilizadas en el medio acuático, ya que su señal persiste a largas distancias, ayudando a los peces a localizar el alimento en el agua en el caso de los aminoácidos (Hara, 1994; Sorensen y Caprio, 1998; Kohbara et al., 2000). En los peces, la mayoría de los aminoácidos efectivos para la percepción intraoral (gusto), son también efectivos para la percepción extraoral (olfato) (Kasumyan, 1997). Los receptores olfatorios son generalmente más sensibles a los aminoácidos que los receptores gustatorios (Caprio, 1978; Kohbara et al., 2000) y generan una respuesta de búsqueda de alimento en presencia de aminoácidos. Así, por ejemplo, cuando se adicionan aminoácidos al agua, son detectados por los receptores olfativos y generan una búsqueda de alimento por los peces. Por el contrario, si se eliminan los órganos olfatorios no se produce la búsqueda de alimento inducida por aminoácidos (Kasumyan y Taufik, 1994).

Gustación. En los peces las papilas gustativas no sólo se localizan en la cavidad orofaríngea, también son bastante numerosas en el epitelio de la cabeza, apéndices como los barbillones y aletas y en la superficie del cuerpo (Hara, 1994; Lamb, 2001). Los aminoácidos y algunas de las sustancias gustatorias clásicas son estimulantes de la ingesta de alimento en peces, mientras que otras actúan como repelentes y otras son indiferentes (Hara, 1994; para revisiones: Kasumyan, 1997; Sorensen y Caprio, 1998; Lamb, 2001). Así por ejemplo, el ácido cítrico actúa como irritante o como estimulante dependiendo de la especie, el cloruro cálcico es una sustancia irritante, el cloruro sódico es estimulante y la sucrosa es indiferente en la mayoría de los peces y, por ejemplo, las sustancias amargas para la lengua humana son atractivas para algunas especies, probablemente por el gusto amargo de algunas especies de insectos (Kasumyan, 1997).

Mientras que los receptores olfatorios pueden detectar el alimento y son responsables de la identificación del alimento a distancia, los receptores gustatorios están involucrados en la discriminación de los alimentos durante la alimentación y son responsables de la introducción del alimento en la boca y de su ingestión (Sorensen y Caprio, 1998; Kohbara et al., 2000). Controlan la parte final del comportamiento alimentario, determinando la calidad del alimento capturado, si posee los requerimientos nutricionales necesarios o no, y tomar la decisión de ingerirlo o rechazarlo, lo que en muchos casos sucede cuando el alimento ya está en la boca (Schulte y Bakus, 1992; Kasumyan, 1997; Lamb, 2001).

Mecanocepción. La mecanocepción también forma parte del proceso de la ingesta de alimento, estando funcional y estructuralmente conectada con el sistema gustatorio (Kanwal y Carpio, 1988; Lamb y Carpio, 1992, 1993; Kiyohara et al., 1999). La estimulación mecánica, roce, golpe, etc., es también un estímulo efectivo para los nervios gustatorios de los peces, los cuales presentan una sensibilidad bimodal, gusto/tacto, de los nervios facial (Davenport y Carpio, 1982), glossofaríngeo y vago (Kanwal y Carpio, 1983). Los peces disminuyen la frecuencia de ingestión de aquellos organismos que presentan una forma alargada, así como los que poseen una gran dureza, prefiriendo ingerir gránulos de alimento blandos (Stradmeyer et al., 1988).

La textura es una de las características más probables para poder distinguir las macromoléculas de proteína, carbohidratos y grasa, ya que los tres macronutrientes tienden a generar sensaciones en la boca distintivas cuando se mezclan con el agua (Thibault y Booth, 1999).

Interocepción intraprandial. La selección de alimentos en función de su contenido en macronutrientes por estimulación de los sentidos internos (postprandial), sólo es posible en especies en las que el periodo de alimentación sea suficientemente largo, para que los macronutrientes estimulen los receptores específicos en la pared del tracto digestivo, o lleguen los productos de la digestión o las hormonas circulantes hasta los tejidos, a tiempo de permitir la decisión de ingerir o no una mayor cantidad del alimento consumido inicialmente (Thibault y Booth, 1999).

11.1.2. Confusión sensorial y nutricional

La selección de macronutrientes sólo tiene lugar cuando la ingesta está bajo el control inmediato de alguna característica sensorial o presensorial inherente a la dieta compuesta por ese macronutriente y que no aparezca en dietas compuestas por otros macronutrientes. Es decir, cuando la dieta está formada por un único macronutriente puro. Por el contrario, si las dietas están formuladas a partir de mezclas, por ejemplo alto contenido en grasa, alto contenido en carbohidratos o alto contenido en proteína, entonces la característica en relación con la proporción de macronutrientes tiene que ser asignada por el individuo que la ingiere. Los efectos que produce una determinada droga en la selección de una dieta rica en un macronutriente pueden no deberse en absoluto a los efectos metabólicos de tal macronutriente, sino a preferencias relacionadas con la textura, gusto y olor de esa dieta. Si todas las características sensoriales de la dieta, además de la palatabilidad, no son totalmente iguales o enmascaradas, el efecto de una droga sobre la selección de dietas puede ser debido a la acción de los sistemas motor o sensorial antes que al control de la selección de macronutrientes (Revisado en: Thibault y Booth, 1999).

11.2. Control gastrointestinal de la ingesta y señales adiposas

Existen evidencias de que el peso corporal y el contenido en grasa están bien regulados en mamíferos, tendiendo a mantener unos niveles basales de energía. Numerosas señales pueden contribuir al comportamiento alimentario y la regulación del peso corporal,

dando lugar a una regulación a corto plazo y una regulación a largo plazo de la ingesta de alimento y del balance energético. Ambas regulaciones son distintas pero sus mecanismos interactúan entre sí, funcionando de forma concertada para integrar la energía ingerida y la utilizada, asegurando de esta manera la preservación del balance energético (de Castro, 2000; Stricker, 2000; van Dijk *et al.*, 2000; Havel, 2001; Mercer y Speakman, 2001).

1.1.2.1. Saciedad a corto plazo: señales del tracto gastrointestinal y el hígado

En mamíferos la regulación a corto plazo (Figura 1) actúa en primer lugar determinando el nivel de saciedad para limitar el tamaño de la comida (Havel, 2001).

1.1.2.1.1. Factores gástricos: Mecano y quimiorreceptores

Mecanorrecepción. La ingesta de alimento produce una distensión gástrica que es detectada por mecanorreceptores de la pared del estómago y proporciona una señal vagal neural al cerebro (Figura 1), inhibiendo la posterior ingesta. Cuanto mayor es la distensión, mayor es la inhibición de la alimentación (Stricker, 2000). La colecistoquinina (CCK), contribuye a aumentar la señal de distensión (Schwartz *et al.*, 1991a). Esta señal vagal indica el volumen del contenido gástrico (Phillips y Powley, 1996).

Quimiorrecepción. El tracto gastrointestinal (TGI) posee quimiorreceptores que detectan la presencia de azúcares, ácidos grasos, aminoácidos y péptidos. La regulación a corto plazo actúa en primer lugar determinando el nivel de saciedad para limitar el tamaño de la comida (Figura 1). Las señales de dichos receptores son transmitidas a través de aferencias vagales al metencéfalo-mielencéfalo ("hindbrain") donde tiene lugar la integración de esas entradas viscerales, proporcionando una ruta en la cual las propiedades físicas y químicas, así como el contenido energético de los alimentos regulan la ingesta de alimento por limitación del tamaño de la comida (Stricker, 2000; Havel, 2001).

1.1.2.1.2. Factores intestinales: CCK, GLP-1, GRP y Grelina

Numerosas hormonas gastrointestinales están implicadas en la regulación de la ingesta de alimento. Con excepción de la grelina, todas las demás inhiben la ingesta de alimento en mamíferos (Inui, 2000; Moran, 2000; Stricker, 2000; Havel, 2001; Hillebrand *et al.*, 2002). Muchos de estos péptidos que inhiben la ingesta de alimento cuando se administran periféricamente, también la inhiben cuando se administran directamente en el cerebro (Blevins *et al.*, 2000; Inui, 2000; Näslund *et al.*, 2001; Hillebrand *et al.*, 2002; Reidelberger, 2003), por lo que a menudo se desconoce cuál es su principal diana, la periferia, el sistema nervioso central (SNC) o ambos (Havel, 2001).

Colecistoquinina. La CCK es liberada por las células endocrinas localizadas en la capa mucosa del intestino delgado proximal. Su liberación es inducida por la presencia de lípidos de la dieta y aminoácidos y péptidos resultantes de la digestión de proteínas (Figura 1). La CCK también se produce en neuronas del SNC durante la alimentación, donde se ha localizado en diferentes áreas cerebrales implicadas en la regulación de la ingesta

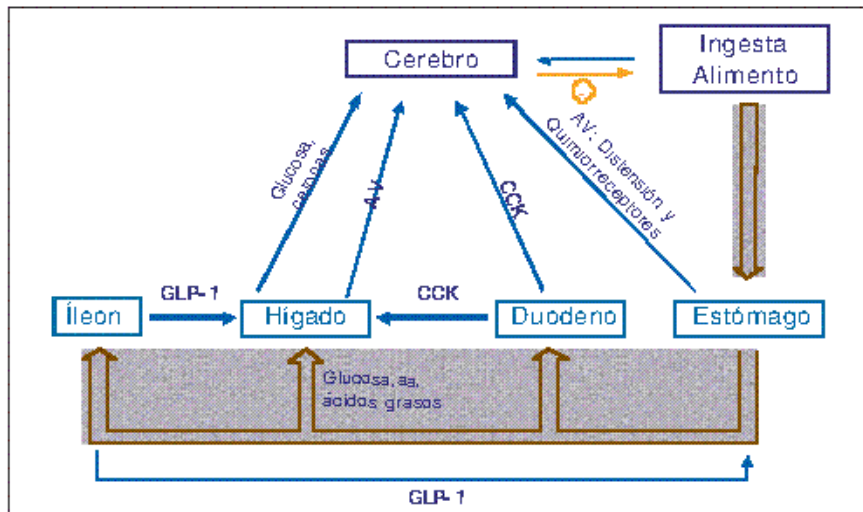


Figura 1. Regulación a corto plazo de la ingesta de alimento. Las señales aferentes vagales (AV) de los receptores de distensión y de los quimiorreceptores, activados por la presencia de nutrientes en el estómago y el duodeno, están implicadas en la terminación de la ingesta de alimento. El duodeno, estimulado por los nutrientes, secreta CCK que llega al hígado a través de la vena porta y al cerebro por la circulación sistémica. La CCK puede actuar sobre los receptores CCKA en ambos sitios e inhibir la ingesta de alimento. La glucosa, aminoácidos y ácidos grasos llegan al hígado a través de la vena porta. El íleon libera el péptido similar al glucagón (GLP-1), el cual inhibe la ingesta de alimento por su acción sobre el hígado o inhibiendo el vaciado gástrico. El hígado envía una señal al cerebro mediante AV, además de proporcionarle glucosa y cetonas, inhibiendo la ingesta de alimento (Modificada de Stricker, 2000; Havel, 2001).

de alimento. Esta hormona inhibe la ingesta de alimento mediante la inhibición del vaciamiento gástrico o actuando a nivel del SNC (Revisado en: Havel, 2001).

En peces la CCK se ha identificado con la regulación de la función gastrointestinal: secreción de ácido gástrico, enzimas pancreáticas, contracción de la vesícula biliar y motilidad gastrointestinal (Holstein, 1982; Aldman et al., 1992; Einarsson et al., 1997; Olsson et al., 1999). Se sabe que la CCK-8 reduce sustancialmente la ingesta de alimento cuando se inyecta intraperitonealmente (i.p.) al carpín dorado (*Carassius auratus*), por lo que se especuló con una posible acción de este neuropéptido, al menos de forma parcial, en la contractilidad del digestivo y/o en el vaciado gástrico (Himick y Peter, 1994a). Apoyando estas teorías se comprobó que la CCK-8 exógena retarda el vaciado gástrico en peces (Olsson et al., 1999). Se desconocía el sitio de acción de la CCK en el vaciado gástrico, proponiéndose la zona proximal del estómago, el esfínter pilórico y acciones mediadas centralmente. En trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), la CCK-8 disminuye la motilidad del cardias del estómago, tanto en amplitud como en frecuencia de contracción, y contrae el esfínter pilórico (Olsson et al., 1999). Así mismo, la CCK-8 aumenta la motilidad de la vesícula biliar en la trucha arco iris, promoviendo la liberación de bilis (Aldman et al., 1992) y origina la liberación pancreática de tripsina en salmón Atlántico (*Salmo salar*) (Einarsson et al., 1997). También se sabe que la CCK-8 disminuye la ingesta en peces tras su administración intracerebroventricular (i.c.v.), esto unido a la elevada

inmunorreactividad de péptidos similares a CCK/Gastrina en los lóbulos vagales (Himick y Peter, 1994a), apoyan la acción central mediada por CCK. Los efectos que la CCK produce en la ingesta de alimento parecen involucrar a mecanismos periféricos de saciación en algunas especies, mientras que en otras parece ser que el principal sitio de acción es el SNC (De Pedro y Björnsson, 2000 y apartado 1.1.3.4.1 de la presente Tesis).

Péptido similar al glucagón-1 (GLP-1). El GLP-1 es secretado por el SNC y las células endocrinas L de la mucosa del intestino delgado distal en respuesta a la entrada de nutrientes en el intestino delgado (Figuras 1 y 2) (Drucker, 1998). La GLP-1, retrasa el vaciado gástrico del TGI (Nauck, 1997; Näslund, 1999), inhibe la secreción gástrica y la motilidad a través del nervio vago (Imeryüz, 1997; Wettergren, 1997, 1998). La inyección i.c.v. de GLP-1 ejerce una acción directa sobre la ingesta de alimento, inhibiéndola (Turton, 1996; McMahon, 1998; Meeran *et al.*, 1999), incluso en ratas que se encontraban en ayuno, mientras que en ratas obesas Zucker induce hiperfagia (Tang-Christensen, 1996; Donahey, 1998). La administración i.c.v. reiterada de GLP-1 produce disminución del peso corporal (Meeran *et al.*, 1999). El principal papel metabólico del GLP-1 en mamíferos parece ser la regulación del metabolismo de los carbohidratos a través de sus efectos sobre la liberación, glucosa dependiente, de insulina, la inhibición de la secreción de glucagón y la estimulación de la glicogenogénesis en el hígado y músculo (Mojsov *et al.*, 1987; Orskov *et al.*, 1996; Holst, 1997; Drucker, 1998; Kieffer y Habener, 1999).

En peces se ha aislado el GLP-1, pero su función es bastante diferente a las encontradas en mamíferos. El principal efecto del glucagón en peces y mamíferos es su acción glucogenolítica sobre el hígado, produciendo hiperglucemia, acción antagonizada por GLP-1, que es insulíntrópica, además de suprimir la secreción de glucagón, en mamíferos (Mojsov *et al.*, 1987; Navarro y Moom, 1994; Le Bail y Bœuf, 1997). Por el contrario, en los peces el glucagón y el GLP-1 tienen el mismo efecto, es decir, ambos son glucogenolíticos. Existen evidencias que indican que, aunque ambas sustancias ejercen la misma función en peces, actúan a través de receptores hepáticos diferentes (Navarro y Moom, 1994).

Polipéptido liberador de gastrina (GRP). El GRP es el péptido análogo de la bombesina (BBS) en mamíferos (Walsh *et al.*, 1979). Es producido por las células endocrinas de la mucosa gástrica (McDonald *et al.*, 1979; Morley *et al.*, 1985). Durante la alimentación, la GRP es liberada al plasma (Kateb y Merali, 1992), actuando como una señal de saciedad a través de sus efectos tanto centrales como periféricos (Figura 2) (Gibbs y Smith, 1988; Figlewicz *et al.*, 1985; Gutzwiller *et al.*, 1994). El GRP retrasa el vaciado gástrico (Yegen *et al.*, 1996) y regula la secreción de gastrina (Figlewicz *et al.*, 1985).

El GRP se ha descrito en el TGI del bacalao (*Gadus morhua*) y de la trucha arco iris (Holmgren y Jönsson, 1988; Jensen y Conlon, 1992). En el bacalao estimula la motilidad del estómago, mientras que retrasa la motilidad intestinal (Holmgren y Jönsson, 1988). En general se ha observado que los péptidos similares a la BBS están implicados en la regulación de la motilidad gástrica y la actividad visceral de varias especies de peces (Holmgren y Jonson, 1988; Bjønning *et al.*, 1991). Los efectos que la BBS produce en la ingesta de alimento, tanto periférica como centralmente, serán tratados con posterioridad (apartado 1.1.3.4.2 de la presente Tesis).

Grelina. Es una hormona peptídica descubierta recientemente. Es secretada en el estómago y el hipotálamo de mamíferos (Kojima *et al.*, 1999; Date *et al.*, 2000). La administración central o periférica de grelina antagoniza la acción de la leptina, incrementando la ingesta de alimento y el peso corporal e inhibiendo la lipólisis en roedores (Tschöp *et al.*, 2000; Wren *et al.*, 2000; Shintani *et al.*, 2001). Los niveles plasmáticos de grelina aumentan durante el ayuno, se ven reducidos por la presencia de nutrientes en el estómago (Figura 2) y son menores en individuos obesos que en individuos delgados (Tschöp *et al.*, 2000, 2001). La grelina exógena ha mostrado elevar la secreción gástrica (Date *et al.*, 2001), aumenta los niveles plasmáticos de hormona del crecimiento (GH) en roedores y batracios (Kojima *et al.*, 1999; Kaiya *et al.*, 2001), regula la secreción de hormona luteinizante y testosterona en ratas (Furuta *et al.*, 2001; Tena-Sempere *et al.*, 2002) y aumenta la expresión hipotalámica de neuropéptido Y (Shintani *et al.*, 2001).

En peces ha sido recientemente descubierto un péptido similar a la grelina en el plasma de la lota (*Lota lota*), pero su posible función no ha sido estudiada en peces por el momento (Mustonen *et al.*, 2002).

11.2.1.3. Factores hepáticos

En el hígado hay detectores del nivel de nutrientes disponibles para la glucosa, aminoácidos y ácidos grasos. Cuando los niveles descienden estos receptores envían una señal de apetito, mediante una aferencia vagal, al cerebro y cuando los niveles de nutrientes son suficientes envían una señal de saciedad (Figura 1). El último paso en el proceso de la saciedad parece tener lugar en el hígado (Carlson, 1998; Havel, 2001).

11.2.2. Saciedad a largo plazo: señales adiposas

Las señales a largo plazo son activadas en respuesta a la proporción de reservas adiposas corporales y a la cantidad de energía consumida durante un periodo largo de tiempo. La insulina y la leptina son dos de las señales a largo plazo (Figura 2), que regulan la ingesta de alimento y el gasto energético, lo que contribuye a mantener la homeostasis energética, así como el peso corporal y la cantidad de tejido adiposo (Carlson, 1998; Havel, 2001).

11.2.2.1. Señales del páncreas: Insulina

La insulina es secretada por las células β de los islotes del Langerhans del páncreas endocrino en respuesta a la ingesta de alimento, concretamente en respuesta a la ingesta de carbohidratos y proteína en mamíferos (Havel *et al.*, 1999a), pero no a los lípidos contenidos en la dieta, aunque la presencia de algunos ácidos grasos es necesaria para la completa secreción de insulina en respuesta a la glucosa (Stein *et al.*, 1997). En resumen, la secreción de insulina y sus niveles plasmáticos son proporcionales a la ingesta reciente de carbohidratos y proteína y a la proporción total del contenido lipídico corporal (Havel *et al.*, 1999a), por ello, se le ha denominado, junto con la leptina, como señal

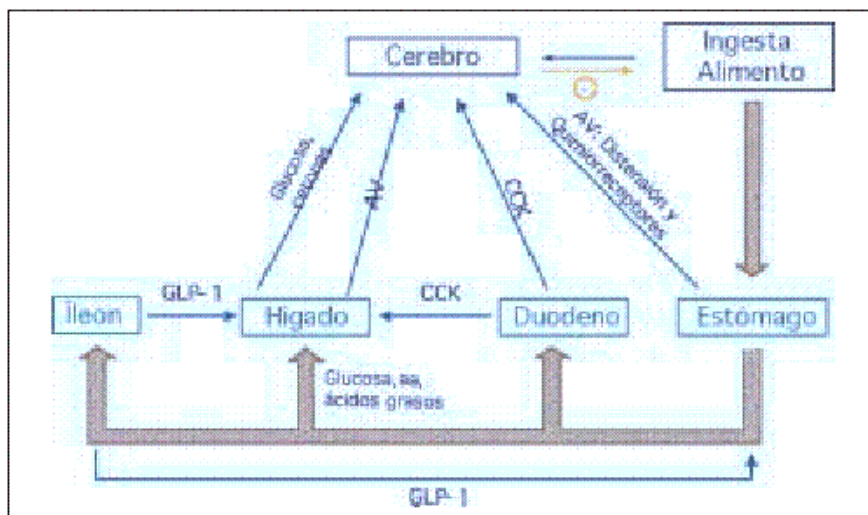


Figura 2. Regulación a largo plazo de la ingesta de alimento. La insulina es secretada en el páncreas endocrino en respuesta al estímulo producido por la glucosa, los aminoácidos y las hormonas incretinas, el polipéptido insulínico dependiente (GIP) y GLP-1, las cuales son secretadas durante la ingestión de alimento y la absorción. La grasa y la fructosa no estimulan la secreción de insulina (Ø). La insulina actúa directamente en el SNC inhibiendo la ingesta de alimento y aumentando el gasto energético o indirectamente estimulando la producción de leptina en el tejido adiposo. La leptina puede inhibir directamente la ingesta de alimento por su acción en el SNC y, así mismo, puede inhibir la secreción de insulina por el páncreas, regulando la ingesta a largo plazo. (Modificada de Stricker, 2000; Havel, 2001).

adiposa. Hormonas incretinas, como el polipéptido insulínico dependiente (GIP) y el GLP-1, incrementan la síntesis de insulina (D'Alessio et al., 2001).

Se han identificado receptores para la insulina en numerosas regiones cerebrales, entre las que se encuentran incluidas regiones implicadas en la regulación de la ingesta, como el núcleo arqueado (ARC) del hipotálamo (Baskin et al., 1999a). Las neuronas cerebrales no sintetizan insulina, ésta es transportada hasta el cerebro por un mecanismo mediado por receptores que se satura con elevados niveles de insulina. Dicho transporte no es inmediato, desde que se produce el incremento plasmático de insulina hasta que es transportada al SNC transcurren varias horas, desempeñando un papel en la regulación a medio y largo plazo del tejido adiposo más que como una señal de saciedad a corto plazo (Schwartz et al., 1991b).

Son numerosos los estudios que sustentan el efecto anorexigénico, incluyendo la reducción de la ingesta de alimento, producido por la insulina en el cerebro (Revisiones: Schwartz et al., 1992a; Porte et al., 1998; Woods et al., 1998). Además, se ha demostrado que la insulina inhibe la expresión de los niveles de ARNm de neuropéptido Y (NPY), que normalmente están incrementados en el ARC durante el ayuno (Baskin et al., 1999a). También se ha descrito que la insulina, como una señal a largo plazo, puede interactuar con la CCK, que es una señal de saciedad a corto plazo, potenciando sus efectos saciantes en el cerebro (Figlewicz et al., 1995). Pero los mecanismos de acción se desconocen, habiéndose propuesto un paralelismo entre la actuación de la leptina y la insulina en el

cerebro (Figura 3), dado que el efecto que producen es similar y existen receptores para ambas sustancias en el ARC. No obstante, los mismos autores resaltan que son necesarios estudios posteriores para determinar cuál es mecanismo real por el que la insulina produce su efecto anorexigénico (Baskin *et al.*, 1999a).

Numerosos estudios indican que la insulina y la glucosa pueden modular la secreción de leptina, aumentándola (Boden *et al.*, 1996; Havel, 1997; Havel *et al.*, 1998; Saad *et al.*, 1998; Revisión: Havel, 2000). La insulina podría estar implicada en la regulación de la expresión del ARNm de la leptina, aunque sus efectos dependen de la glucosa plasmática (Cohen *et al.*, 1996; Wabitsch *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1997), ya que se ha demostrado que bloqueando el transporte de glucosa o la glicólisis, la activación de la expresión génica de la leptina por acción de la insulina, así como la secreción de leptina, son inhibidas (Mueller *et al.*, 1998). Se ha observado que la adición de insulina a cultivos de adipocitos provoca un aumento dosis-dependiente de la concentración de leptina (Wabitsch *et al.*, 1996; Russel *et al.*, 1998). Algunos trabajos, dedicados al estudio de los mecanismos por los cuales la insulina y la glucosa regulan la producción de leptina por el tejido adiposo, sugieren que la insulina *per se* no estimula la secreción de leptina, sino que es consecuencia del metabolismo oxidativo de la glucosa mediado por insulina (Mueller *et al.*, 1998; Havel *et al.*, 1999b; Revisión: Havel 2001).

El efecto de la insulina y la leptina en la ingesta de alimento en peces se detallará en los apartados 1.1.4.1.3; 1.1.4.2.2 y 1.1.4.2.3 de la presente introducción.

1.1.2.2. Señales del tejido adiposo: Leptina

La leptina es un péptido de 167 aminoácidos, que circula como un péptido de 16 kDa. Fue descubierta en 1994, cuando fue clonado el gen responsable de la obesidad en los ratones ob/ob (Zhang *et al.*, 1994), gen que se expresa principalmente en el tejido adiposo (Laharrague *et al.*, 1998), aunque también se expresa en pequeñas cantidades en la placenta (Hoggard *et al.*, 1997); habiéndose descrito, así mismo, la presencia de leptina en el estómago (Sobhani *et al.*, 2000). La leptina ha sido encontrada en varias especies de mamíferos (Trudeau, 1998), y recientemente se ha descrito su existencia en el plasma, cerebro, corazón e hígado, de varias especies de peces (Johson *et al.*, 2000). La tasa de secreción de leptina y su concentración plasmática están correlacionadas con el tamaño de los depósitos grasos en mamíferos (Frederich *et al.*, 1995; Klein *et al.*, 1996). En peces la correlación aparece entre los niveles cerebrales de leptina y el tamaño del tejido adiposo (Johson *et al.*, 2000).

La leptina es una hormona con múltiples acciones reguladoras, regula la adiposidad, el apetito y el metabolismo, los roedores que no pueden sintetizarla son obesos mórbidos (Campfield *et al.*, 1995; Ogawa *et al.*, 1995; Pelleymounter *et al.*, 1995; Halaas *et al.*, 1997). La leptina es secretada a la circulación, donde puede actuar principalmente como un factor de saciedad que disminuye la ingesta de alimento y aumenta el gasto energético, causando una reducción significativa del peso corporal (Campfield *et al.*, 1995; Pelleymounter *et al.*, 1995; Halaas *et al.*, 1997). Cruza la barrera hematoencefálica, probablemente por medio de un transportador soluble (Halaas *et al.*, 1995; Banks *et al.*, 1996), y

se une a su receptor OB-R_L en el hipotálamo, el cual media las acciones biológicas de la leptina (Tartaglia *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997a), dando lugar a una reducción de la ingesta de alimento. Cuando los depósitos de tejido adiposo comienzan a disminuir, los niveles circulantes de leptina disminuyen y retorna el apetito a sus valores normales (Wang *et al.*, 1997a). Por todo ello, se ha propuesto que la leptina llevaría a cabo una acción lipostática.

La leptina, así mismo, puede desempeñar un papel importante en la regulación del metabolismo de los carbohidratos en mamíferos. La administración central de leptina aumenta la movilización y asimilación de la glucosa y disminuye el almacenamiento de glucógeno hepático, sugiriendo que la acción de la leptina en el metabolismo de la glucosa tiene lugar a través de mecanismos centrales (Cusin *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998). Así mismo, se ha observado, en estudios *in vitro*, que la leptina puede modular la acción de la insulina en los adipocitos, miocitos y hepatocitos (Muoio *et al.*, 1997; Shimabukuro *et al.*, 1997; Aiston y Aglus, 1999), afectando, además, a la secreción pancreática de dicha hormona (Emilsson *et al.*, 1997).

La mayoría de los estudios relacionados con el efecto de la leptina en la ingesta de alimento se han centrado en su acción en el hipotálamo (Figura 3) (Revisión: Baskin, 1999a). El ARC presenta sitios de unión para la leptina (Baskin *et al.*, 1999b), concretamente los receptores OB-Rb, que son expresados por las neuronas del ARC (Baskin *et al.*, 1998, 1999c; Schwartz *et al.*, 1996). Cuando la leptina se une a sus receptores en el ARC estimula la expresión de péptidos derivados del gen pro-opiomelanocortina (POMC), que es el precursor de la hormona estimuladora de los α -melanocitos (α -MSH), y del transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART), ambas sustancias anorexigénicas (Cheung *et al.*, 1997; Elias *et al.*, 1998a; Kristensen *et al.*, 1998; Schwartz *et al.*, 1997), y, por el contrario, inhibe la expresión del NPY y de la proteína relacionada con el gen agouti (AGRP), dos neuropéptidos con una fuerte acción estimuladora de la ingesta de alimento (Baskin *et al.*, 1999c; Schwartz *et al.*, 1996, 1997, 1999a).

Los efectos centrales anorexigénicos de la insulina también están mediados por el ARC (Schwartz *et al.*, 1993, 1994), donde la insulina inhibe la expresión del NPY (Schwartz *et al.*, 1992b; Sipols *et al.*, 1995).

El núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) recibe una profusa inervación de neuronas NPY desde el ARC, y la liberación de NPY durante el ayuno y otras situaciones de balance energético negativo, se ha hipotetizado que estimula la realimentación (Davies y Marks, 1994; Yoshihara *et al.*, 1996; Kalra *et al.*, 1999; Yamanaka *et al.*, 2000); las proyecciones de las neuronas POMC, que llegan hasta el PVN desde el ARC, liberan α -MSH (Elias *et al.*, 1998a), hipotetizándose que ejercen un efecto anoréxico (Brown *et al.*, 1998; Kalra *et al.*, 1999). Numerosas proyecciones de neuronas NPY/AGRP y POMC/CART se prolongan desde el ARC hasta las áreas hipotálamica lateral (LHA) y perifornical (PFA) (Jhanwar-Uniyal *et al.*, 1993; Broberger *et al.*, 1998; Elias *et al.*, 1998b; Tritos *et al.*, 1998), donde existen neuronas que expresan hipocretinas/orexinas y la hormona concentradora de los melanocitos (MCH), todos ellos péptidos orexigénicos (Ou *et al.*, 1996; Sakurai *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 1999; Sahu, 2002) y cuya expresión es inhibida por la leptina (Sahu, 1998; Zhu *et al.*, 2002).

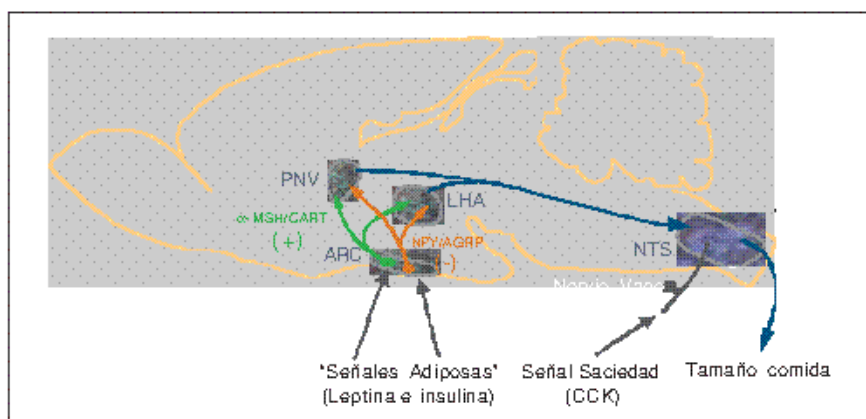


Figura 3. Esquema mostrando unas hipotéticas rutas del control cerebral de la ingesta de alimento mediante señales adiposas. Las señales adiposas estimulan (+) e inhiben (-) las neuronas del ARC, desencadenando los efectos representados (Redibujado de Baskin et al., 1999a).

En los núcleos del tracto solitario (NTS) y dorsomotor del vago (DMV), localizados en el tronco encefálico, convergen señales relacionadas con el tamaño de la comida, principalmente señales mediadas por CCK, que se transmiten a través del nervio vago (Corp et al., 1993; Wang et al., 1998) y producen la terminación de la alimentación (Baile y Della-Fera, 1985; Baile et al., 1996). También se ha sugerido una posible acción de la leptina en la determinación del tamaño de la comida a este nivel, ya que se ha descrito la presencia de ARNm de receptores OB-Rb en el NTS (Mercer et al., 1998), lo que, unido al hecho de que la inyección de leptina en el cuarto ventrículo retarda el vaciado gástrico (Smedh et al., 1998), parece apoyar esta posibilidad.

En el apartado 1.1.3, dedicado al control neural de la ingesta de alimento, se detallarán numerosos resultados que avalan la teoría anteriormente descrita de actuación de la leptina, así como otros resultados que podrían cuestionarla en algunos de sus aspectos.

1.1.3. Control neural de la ingesta

Las señales de apetito y saciedad que se originan en el sistema digestivo y en los tejidos de reserva de nutrientes, tienen por órgano diana el cerebro. Así, la información sobre el gusto originada en la cavidad oral y gran variedad de información sensorial originada en órganos internos, como por ejemplo las señales de hambre generadas en el hígado, son enviadas al área postrema (AP) y al NTS (Carlson, 1998). En mamíferos, está ampliamente descrita la existencia de sistemas neuronales orexigénicos y anorexigénicos morfológica y funcionalmente conectados, sistemas que forman una red interconectada en el hipotálamo que gobiernan la ingesta de alimento y el peso corporal (Lin et al., 2000). Por el contrario, en peces hay relativamente pocos estudios sobre el control cerebral del comportamiento alimentario. Estudios recientes indican la implicación de moléculas cerebrales que actúan como señales orexigénicas y anorexigénicas tanto en mamíferos como en peces (Lin et al., 2000).

1.1.3.1. Regiones cerebrales implicadas en la regulación de la ingesta de alimento en mamíferos

1.1.3.1.1. Tronco del encéfalo

En mamíferos se ha sugerido que ciertas áreas del tronco encefálico, junto con otras áreas del diencefalo, pueden ser consideradas como una unidad de procesamiento central para el control de la ingesta de alimento. En el tronco encefálico las áreas centrales incluyen el NTS y el complejo parabraquial. En el diencefalo se pueden incluir varios núcleos hipotalámicos (Berthoud, 2000).

1.1.3.1.2. Hipotálamo

Se han indicado diferentes núcleos hipotalámicos: núcleo ventromedial (VMN), dorsomedial (DMN), paraventricular (PVN) y el hipotálamo lateral (LH), como centros neurales involucrados en el control del comportamiento alimentario. La participación de estos sitios hipotalámicos, en la regulación de la ingesta de alimento, ha sido ampliamente estudiada empleando tanto lesiones discretas como transección quirúrgica de las vías neurales (Kalra et al., 1999). En las décadas de los 40s-50s, se describió un modelo de dos centros para la regulación de la alimentación, el cual hipotetizó que el LH sirve como "centro de la alimentación", también conocido como el "centro del hambre", y el VMN como un "centro de saciedad" (Anand y Brobeck, 1951). Posteriormente se ha comprobado que, si bien el LH y VMN están implicadas en el control de la ingesta de alimento, ambas regiones desempeñan de forma simultánea un papel excitatorio e inhibitorio de la alimentación (Carlson, 1998). Así, inyecciones directas de aminoácidos en el LH desencadenan la ingesta de alimento (Stanley et al., 1993a), mientras que inyecciones de un antagonista del glutamato en la misma región disminuyen la ingesta de alimento (Stanley et al., 1996). En los últimos años, la identificación de numerosas moléculas orexigénicas y anorexigénicas y sus receptores en el hipotálamo, así como los sitios neuronales de su producción y liberación, han redefinido las vías hipotalámicas envueltas en la regulación de la alimentación y el peso corporal (Lin et al., 2000).

En el LH, se localizaron dos neuropéptidos, la MCH y las orexinas o hipocretinas (Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998), ambas señales orexigénicas (Tritos et al., 1998; Sakurai et al., 1998). Estos péptidos neurotransmisores son producidos exclusivamente por neuronas del LH, una población de neuronas contiene ARNm para MCH, mientras que otra población diferente de neuronas contiene orexina-A (Skofitsch et al., 1985; Sakurai et al., 1998). Las neuronas que las producen representan los componentes anatómicos del "centro de la alimentación" en el LH (Qu et al., 1996; Sakurai et al., 1998). El área LH proporciona la mayor señal de entrada al cortex cerebral, de origen no talámico, junto con las originadas por los núcleos DMN y mamilar, apoyando la teoría de que algunas áreas corticales pueden estar involucradas en el control de la ingesta de alimento. Muchas de esas proyecciones surgen de las neuronas productoras de MCH (Berthoud, 2000). Además, dentro del LH existen conexiones recíprocas con el ARC, algunas de las cuales contienen orexina, y el PVN, y conexiones eferentes con el DMN, VMN y el núcleo

hipotalámico anterior (Berthoud, 2000). En el área LH, se expresan otros neuropéptidos como el CART y el factor liberador de la corticotropina (CRF), que disminuyen la ingesta de alimento y el peso corporal, desempeñando un papel de contrarregulación, oponiéndose a los sistemas que aumentan la ingesta de alimento (Lin *et al.*, 2000).

El ARC parece ser el sitio integrador de las señales metabólicas circulantes, como esteroides gonadales y adrenales, la leptina e insulina (Kalra *et al.*, 1999), siendo estas dos últimas señales hormonales aferentes las más importantes en este núcleo, señales que actúan vía receptores específicos en muchas neuronas (Elmqvist *et al.*, 1998a; Håkansson *et al.*, 1998). Además, es el núcleo asociado con la integración hipotalámica del balance energético, recibiendo aferencias de neuronas que producen péptidos orexigénicos como el NPY, opioides, galanina (GAL), AGRP, dinorfina y la b-endorfina (b-END), que es un péptido derivado del POMC, así como péptidos anorexigénicos tales como CART, a-MSH, que es un péptido derivado del POMC, y los aminoácidos: glutamato y g-aminobutírico (Kalra *et al.*, 1999). Las proyecciones de esas neuronas productoras de señales orexigénicas y anorexigénicas en el ARC se extienden dentro de varios sitios hipotalámicos incluyendo el VMN, DMN, PVN, área preóptica (POA) y el hipotálamo perifornical (Lin *et al.*, 2000) y sitios extrahipotalámicos como la amígdala y porciones del tronco encefálico (Berthoud, 2000).

El PVN recibe aferencias de grupos de células noradrenérgicas de la médula ventrolateral, núcleo solitario y del locus coeruleus, de grupos de células portadoras de adrenalina del tronco encefálico, del núcleo preóptico mediano y del órgano subfornical, así como de otros núcleos hipotalámicos como el anteroventral periventricular (péptido natriurético), ARC (NPY/AGRP), DMN (galanina) y el LH (Berthoud, 2000). Las eferencias del PVN se dirigen al diencefalo, así como al telencefalo, a regiones como el núcleo paraventricular talámico, y los núcleos amigdaloides central y medial, así como a otras áreas hipotalámicas como DMN, VMN, ARC, hipotálamo anterior y el área perifornical en el LH (Berthoud, 2000).

En el VMN no hay pruebas sobre la producción de señales orexigénicas y anorexigénicas, no obstante se sugiere como un sector de recepción de numerosas moléculas reguladoras de la alimentación y de transmisión de la información del DMN-PVN para la liberación de señales orexigénicas (Kalra *et al.*, 1999). Las aferencias que llegan a este núcleo proceden de varias zonas de la amígdala, LH, de muchos núcleos del hipotálamo medial, y de los núcleos parabraquial y solitario del tronco encefálico (Berthoud, 2000). Algunas neuronas del VMN, contienen receptores para la leptina y algunas de ellas se proyectan al área ventral del PVN (Elmqvist *et al.*, 1998b).

El DMN, al igual que el LH y el PVN, recibe aferencias del tronco encefálico; del diencefalo y amígdala, aunque la mayoría de las aferencias que recibe proceden del VMN y PVN (Thompson y Swanson, 1998). Las eferencias del DMN tienen como destinos principales el VMN, hipotálamo anterior y el PVN (Berthoud, 2000).

11.3.1.3. Corteza cerebral

En ella tiene lugar la activación neural diferencial de grandes áreas afectadas por estímulos como el hambre, saciedad y gusto (Figura 4), incluyendo las áreas prefrontal y

orbitofrontal (Gauthier *et al.*, 1998; Tataranni *et al.*, 1998). Además, utilizando dietas imbalances en aminoácidos en ratas, se ha observado la presencia de sensores para los aminoácidos esenciales en el cortex anterior piriforme y cortex orbitofrontal (Berthoud, 2000).

1.1.3.14. Amígdala

Recibe información de numerosas áreas cerebrales, como es la información sensorial procesada procedente de diferentes áreas de la corteza cerebral, información visceral sensorial procedente de los núcleos solitario y parabraquial del tronco encefálico y aferencias del PVN y LH, por lo que se la considera como una parte integradora de la unidad central procesadora (Berthoud, 2000).

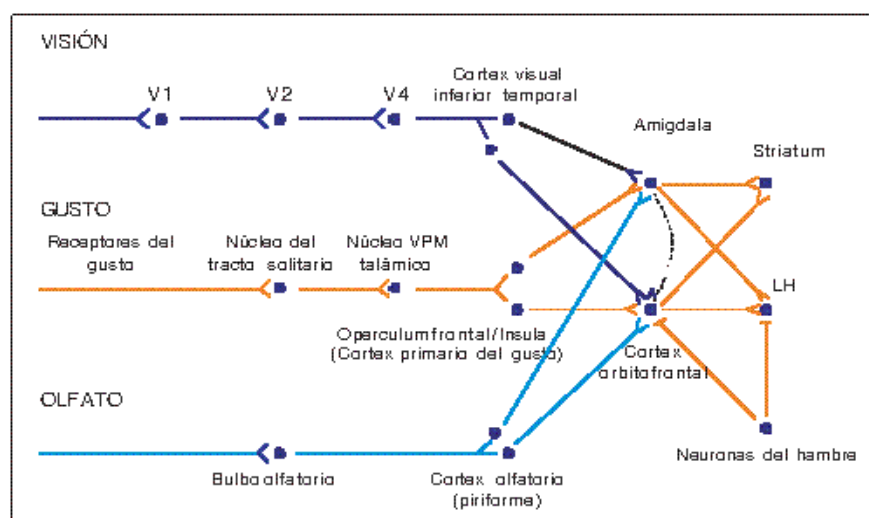


Figura 4. Esquema de las vías olfatorias y del gusto en primates, mostrando su convergencia entre sí y con las vías visuales. VPM = Núcleo ventral posteromedial talámico; V1, V2, V4 = Áreas visuales corticales. (Redibujado de Rolls, 2000).

1.1.3.2. Regiones cerebrales implicadas en la regulación de la alimentación en peces

En peces, son muy pocos los estudios relacionados con las rutas neurales implicadas en la regulación de la alimentación. Se ha descrito un área hipotalámica de alimentación (HFA) mediante la realización de estudios anatómicos (Henrick, 1905; Fringer, 1978, ambos en Himick y Peter, 1994a) y estimulación eléctrica (Demski y Knigge, 1971, en Himick y Peter, 1994a), ubicándose dicha área en los lóbulos hipotalámicos inferiores. Dentro del HFA se han descrito núcleos concretos, mediante estimulación eléctrica, como los implicados en el control de la ingesta de alimento. Dichos núcleos son el núcleo lateral recessus, el núcleo preglomeruloso lateral y el núcleo difuso del lóbulo inferior (Demski y Knigge, 1971; Savage y Roberts, 1975). En 1994, Himick y colaboradores identificaron fibras inmunoreactivas (IR) de CCK/gastrina en la región más ventrocaudal del hipotálamo,

pudiendo asociar este hallazgo a otra zona hipotalámica implicada en el control de la alimentación, tras comprobar su implicación mediante la inyección de CCK en esta región. Tanto el hipotálamo ventromedial-posterior, como los lóbulos inferiores han sido asociados con la organización y control del comportamiento alimentario en peces (Peter, 1979), donde aparecen neuronas IR de NPY (Pontet *et al.*, 1989; Peng *et al.*, 1994) y péptidos similares a BBS/GRP (Himick y Peter, 1995a).

Estudios recientes sobre la expresión génica postprandial de NPY y CCK, han mostrado que otras zonas fuera del hipotálamo pueden desempeñar un papel importante en la regulación de la alimentación (Peyon *et al.*, 1999; Narnaware *et al.*, 2000). Este tipo de estudios basados en la expresión génica de sustancias, junto con estudios realizados mediante estimulación eléctrica, han mostrado que el telencéfalo, el área preóptica telencefálica, el tectum óptico del tálamo, los lóbulos ópticos, los bulbos olfatorios y la pituitaria están implicados en el control de la ingesta de alimento (Demski y Knigge, 1971; Peter, 1979; Himick y Peter, 1995a; Himick *et al.*, 1995; Silverstein *et al.*, 1998; Hui *et al.*, 1999; Peyon *et al.*, 1999; Narnaware *et al.*, 2000; Cerdá-Reverter *et al.*, 2000; Volkoff y Peter, 2001a).

11.33. Señales orexigénicas cerebrales

Las sustancias implicadas son muchas (Tabla 1), pero sólo se describirán aquellas que han mostrado tener un efecto en la ingesta de alimento en peces o de las que se sospecha esta acción.

Ácido γ -aminobutírico (GABA)	Hormona concentradora de melanocitos (MSH)
Aldosterona	Neuropéptido Y (NPY)
β -Casomorfina	Norepinefrina (NE, receptor α_2)
Corticosterona	Opioides
Dinorfina	Orexina
Galenina	Péptido YY (PYY)
Grelina	Proteína relacionada con el gen Agouti
Hormona liberadora de hormona del crecimiento (GHGR)	

Modificado de Inui, 2000; Näslund *et al.*, 2001

Tabla 1. Hormonas, neurotransmisores y neuropéptidos que estimulan la ingesta de alimento.

11.33.1. Neuropéptido Y (NPY)

Fue originalmente aislado de cerebro porcino por Tatemoto en 1982. Es un péptido de 36 aminoácidos perteneciente a la familia de los polipéptidos pancreáticos (Tatemoto, 1982), polipéptidos endocrinos que incluyen al polipéptido pancreático (PP), al péptido tirosina-tirosina (PYY) y al péptido pancreático Y de peces (PY) (Larhammar, 1996). Hay seis subtipos de receptores, cinco de ellos clonados, en mamíferos para el NPY, designados como Y_1 , Y_2 , Y_4 , Y_5 e Y_6 (Michel *et al.*, 1998; Wraith *et al.*, 2000), existiendo también

el receptor Y_3 (Michel *et al.*, 1998). Varios estudios sugieren que los receptores implicados en la regulación de la alimentación son los receptores Y_1 e Y_3 (Balasubramaniam, 1997; Haynes *et al.*, 1998; Kanatani *et al.*, 1998; Inui, 1999a; Duhault *et al.*, 2000). La biodisponibilidad digestiva de los receptores Y_1 e Y_3 , es muy baja, como así lo indica el hecho de que la actividad para dichos receptores sólo se observa cuando se administra subcutánea o intraperitonealmente mediante inyección, nunca tras su administración oral (Duhault *et al.*, 2000). Por ello, se puede especular sobre una posible baja disponibilidad digestiva del NPY.

Mamíferos. El NPY es un potente estimulador de la ingesta de alimento en mamíferos (Woldbye y Larsen, 1998), así su inyección en el hipotálamo medial aumenta la ingesta de alimento en ratas saciadas (Stanley y Leibowitz, 1984; Tempel y Leibowitz, 1990b; Kalra *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1996). Es el péptido más abundante descubierto en el cerebro de mamíferos y está ampliamente expresado en los sistemas nerviosos central y periférico (White, 1993). Se han encontrado al menos dos sitios de acción en el hipotálamo: en el hipotálamo mediolateral, donde su infusión desencadena la ingesta de alimento (Stanley *et al.*, 1993b) y en el PVN, donde produce la secreción de insulina y glucocorticoides (Currie y Coscina, 1996).

Las neuronas que producen NPY están localizadas en el tronco encefálico y en los núcleos ARC y DMN (Sahu *et al.*, 1988; Davies y Mark, 1994; Yoshihara *et al.*, 1996), se proyectan hasta varios sitios hipotalámicos entre los que se incluyen el ARC, VMN, DMN, PVN y regiones circundantes, facilitando la interacción del NPY con otras señales orexigénicas y anorécticas en el hipotálamo (Sahu *et al.*, 1988). Las principales neuronas productoras de NPY están ubicadas en el ARC, proyectándose al PVN (Jhanwar-Uniyal *et al.*, 1993). El ayuno aumenta la actividad de las proyecciones NPYérgicas entre el ARC y el PVN e incrementa la expresión génica del NPY en el ARC y el NPY en el ARC y PVN (Davies y Marks, 1994; Yoshihara *et al.*, 1996), sugiriendo un papel crucial del NPY en la regulación del metabolismo y balance energético (Yamanaka *et al.*, 2000).

Varias líneas de trabajo sustentan el papel del NPY como un péptido implicado en el control fisiológico de la ingesta de alimento: (a) su expresión y liberación aumenta durante el ayuno; (b) su liberación aumenta antes del inicio de la alimentación; (c) antagonistas específicos del NPY reducen la ingesta de alimento (Jensen, 2001); (d) los nervios que contienen NPY interactúan con muchas de las sustancias reguladoras de la alimentación en el sistema central nervioso, recibiendo también aferencias de señales periféricas, por ejemplo de insulina y leptina, que reducen la expresión y liberación de NPY (Schwartz y Seeley, 1997; Inui, 1999b; Kalra *et al.*, 1999).

Además, la inhibición del NPY media los efectos anorécticos de la proteína del gen de la obesidad, la leptina (Stephens *et al.*, 1995). Inyecciones crónicas de NPY inducen una rápida ganancia de peso y están asociadas con un aumento de la deposición de grasa en el cuerpo (Stanley *et al.*, 1986; 1989). Disminuye la actividad nerviosa simpática del tejido adiposo marrón (Billington *et al.*, 1991; Egawa *et al.*, 1991), activa el páncreas endocrino alterando la secreción de insulina (Moltz y MacDonald, 1985) y estimula el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal, induciendo la secreción de adrenocorticotropina (ACTH) (Hanson y Dallman, 1995). Se ha sugerido que el NPY podría modular varios mecanismos integrados que

controlan la alimentación, termogénesis y metabolismo energético (Currie y Coscina, 1998). Estudios recientes indican que podría interactuar con la serotonina hipotalámica tanto en la alimentación como en la modulación energética, antagonizando sus efectos (Currie y Coscina, 1998). Se ha sugerido que está implicado en el comportamiento alimentario inducido por orexina-A (Yamanaka *et al.*, 2000). Además, el NPY está implicado en los ritmos circadianos (Ribelayga *et al.*, 1998), en la reproducción, termorregulación, agresividad, funciones cardiovasculares y gastrointestinales (Grundemar, 1997) y en procesos patológicos entre los que se incluyen desórdenes alimentarios, memoria retentiva, ansiedad, depresión, hipertensión, fallos cardíacos y secreción intestinal (Balasubramaniam, 1997).

En relación con el papel del NPY en la selección de macronutrientes se ha observado que el NPY exógeno aumenta la ingesta de carbohidratos (Stanley *et al.*, 1985). Así mismo se ha observado que los niveles de NPY son elevados en el PVN durante el momento del día en el cual la ingesta de carbohidratos es alta (Tempel y Leibowitz, 1990b; Akabayashi *et al.*, 1994a). Bajo diferentes condiciones y estados fisiológicos, el NPY está unido a los procesos de ingesta y utilización de carbohidratos (Leibowitz, 2000). El efecto del NPY en la selección de macronutrientes por la rata depende de la dieta basal seleccionada por el animal, esto es, está directamente influida por las preferencias individuales de los animales por un nutriente concreto (Welch *et al.*, 1994), así, en ratas que prefieren grasa, el NPY potencia la preferencia por la grasa, aunque también aumenta la ingesta de carbohidratos en menor medida (Stanley *et al.*, 1989). La composición de la dieta ingerida va a influenciar la cantidad de NPY hipotalámico en la rata: con dietas bien balanceadas en aminoácidos, pero con niveles de proteína justo por debajo de los requerimientos proteicos, los animales se vuelven hiperfágicos y muestran niveles elevados de NPY en el hipotálamo basomedial (White *et al.*, 1994); la concentración de NPY disminuye en el PVN conforme aumenta la cantidad de carbohidratos de la dieta, no alterándose el contenido de NPY en el ARC (Beck *et al.*, 1990), sin embargo, cuando se suministran estas dietas durante 14 semanas, los niveles disminuyen tanto en el PVN como en el ARC (Beck *et al.*, 1994); y con dietas ricas en grasa, suministradas durante 14 semanas, la cantidad de NPY en el PVN y ARC es menor (Beck *et al.*, 1994), sugiriendo todo ello que el NPY es necesario para limitar la ingesta energética en función del contenido calórico de la dieta (Beck, 2001).

Peces. En peces la estructura primaria está bien conservada, apareciendo algunas substituciones respecto al NPY humano, pero mantiene idéntico el dodecapéptido C-terminal (Larhammar, 1996). La primera especie de pez en la que se describió la presencia de NPY fue el carpín dorado (Kah *et al.*, 1989), donde aparecen neuronas IR en el hipotálamo ventromedial-posterior y los lóbulos hipotalámicos inferiores (Pontet *et al.*, 1989; Peng *et al.*, 1994), áreas asociadas con la organización y control del comportamiento alimentario en peces (Peter, 1979). Así mismo, se ha determinado la expresión de ARNm para el NPY en el telencéfalo preóptico, en el tectum óptico-tálamo y en el hipotálamo de carpín dorado (Peng *et al.*, 1994; Narnaware *et al.*, 2000), salmón plateado (*Oncorhynchus kisutch*) (Silverstein *et al.*, 1998), lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Cerdá-Reverter *et al.*, 2000), pez cebra (*Brachydanio rerio*) (Soderberg *et al.*, 2000) y lamprea de río (*Lampreta fluviatilis*) (Soderberg *et al.*, 1994).

En relación con la ingesta de alimento se ha observado que inyecciones i.c.v. de NPY producen un aumento significativo de la ingesta de alimento en el bagre de canal, *Ictalurus punctatus*, (Silverstein y Plisetskaya, 2000) y el carpín dorado (López-Patiño et al., 1999; De Pedro et al., 2000; Narnaware et al., 2000). En el carpín dorado el aumento de la ingesta se produjo 2 h después de su administración i.c.v., si bien no se observaron efectos en la ingesta de alimento después de su administración periférica, lo que apunta una acción orexigénica central (López-Patiño et al., 1999). La administración de uno de sus antagonistas, el [D-Tyr^{27,36}, D-Thr³²]-NPY(27-36), revierte el efecto del NPY, si bien el antagonista por sí mismo no tiene efecto en la ingesta basal de alimento (López-Patiño et al., 1999). El efecto estimulante del NPY en la ingesta de alimento en carpín dorado por inyección i.c.v. puede ser bloqueado por inyección del antagonista del receptor Y₁, el BIBP-3226 (Narnaware et al., 2000). También se ha demostrado que carpines entrenados a comer cada día a la misma hora, muestran una expresión génica del NPY aumentada en el telencéfalo preóptico, tectum óptico-tálamo y en el hipotálamo, en el momento prefijado de alimentación y niveles disminuidos después del momento de la alimentación (Narnaware et al., 2000), así mismo aumenta la expresión génica del NPY en los mismos sitios cerebrales en animales ayunados durante 24-72 h y después de una semana de restricción alimentaria, revirtiendo estos efectos 1-3 h después de la realimentación (Narnaware y Peter, 2001a). Estas pruebas parecen sugerir que el NPY es un factor orexigénico que regula la ingesta diaria de alimento en el carpín dorado, al menos en parte, a través de receptores Y₁ (Narnaware y Peter, 2001b). El aumento en la ingesta de alimento observado tras 24 h de ayuno es atenuado por el antagonista del receptor del NPY, sugiriendo que la liberación hipotalámica del NPY ocurre en respuesta al ayuno (López-Patiño et al., 1999). Otra prueba de la implicación del NPY en la regulación del apetito en los peces es que la expresión génica del NPY en el área preóptica del hipotálamo (equivalente al PVN en mamíferos) aumenta significativamente en salmón plateado (*O. kisutch*) y salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*), ayunados durante 24 o 72 h, en comparación con animales alimentados (Silverstein et al., 1998). El efecto de incremento de la alimentación por NPY está mediado, al menos, por los receptores Y₁ e Y₅, pero no por el Y₂ (Narnaware y Peter, 2001b).

La administración central de naloxona disminuye el apetito inducido por NPY 2 h después de su administración en carpín dorado (De Pedro et al., 2000), lo que indica una interacción entre el sistema opioide y el NPY en la regulación de la ingesta en peces, donde el NPY puede ser el inductor de la alimentación y el sistema opioide el encargado de mantener la alimentación (De Pedro y Björnsson, 2001).

Hasta la fecha no se ha determinado el posible papel del NPY en la selección de macronutrientes en peces, siendo necesarios estudios para esclarecer su actuación.

1.13.3.2. Hipocretinas/Orexinas (OX)

Las OX, también llamadas hipocretinas, son una familia de péptidos recientemente descubiertos y caracterizados en humanos y ratas (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998), no habiéndose publicado información sobre su presencia en otros vertebrados no mamíferos (Lin et al., 2000). La orexina-A (OX-A) es un péptido de 33 aminoácidos, mientras que la

orexina-B (OX-B) tiene sólo 28 aminoácidos, sintetizándose ambas a partir de una única proteína, la prepro-orexina de 130 aminoácidos (de Lecea *et al.*, 1998; Sakurai *et al.*, 1998). Las neuronas de orexina se distribuyen en el ARC, PVN, DMH, VMH (de Lecea *et al.*, 1998; Peyron *et al.*, 1998; Nambu *et al.*, 1999), regiones que, como se ha indicado con anterioridad, están implicadas en la regulación del comportamiento alimentario y la homeostasis del peso corporal, sugiriendo que las orexinas están relacionadas con la generación del apetito (Yamanaka *et al.*, 2000). Las fibras nerviosas de estas neuronas se proyectan a través del hipotálamo posterior hasta múltiples áreas cerebrales, incluyendo la corteza cerebral, sistema límbico, tronco encefálico y tálamo (de Lecea *et al.*, 1998; Nambu *et al.*, 1999), sugiriendo que las orexinas pueden no estar sólo implicadas en la regulación de la homeostasis energética, sino también en aspectos cognitivos y motivacionales del comportamiento alimentario (Yamanaka *et al.*, 1999).

En ratas se han identificado dos tipos de receptores para las orexinas, los receptores tipo 1 (OX₁), más abundantes en el VMN y LHA, y los tipo 2 (OX₂), más abundantes en el PVN (Trivedi *et al.*, 1998). Ambos receptores están exclusivamente localizados en el cerebro (Sakurai *et al.*, 1998).

Mamíferos. La inyección i.c.v. de ambas orexinas ha demostrado estimular la alimentación en la rata (Sakurai *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 1999), pero mientras que la orexina-A siempre estimula la ingesta, la orexina-B sólo la estimula en ocasiones (Edwards *et al.*, 1999). La estimulación de la ingesta que producen ambos péptidos es menor que la producida por el NPY (Sakurai *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 1999) pero aproximadamente de la misma magnitud que la producida por la MCH y la galanina (Edwards *et al.*, 1999). En la rata los efectos producidos por la OX-A son más duraderos que los producidos por la OX-B, quizás debido a que la estructura de OX-A sea más resistente a la inactivación o al hecho de que la OX-A se une a los dos tipos de receptores (OX₁ y OX₂), mientras que la OX-B sólo lo hace a los receptores OX₂ (Lin *et al.*, 2000).

La administración de forma continua de OX-A en ratas muestra que podría no intervenir en la regulación de energía y del peso corporal, no estando implicada en la regulación a largo plazo del comportamiento alimentario, aunque sí parece desempeñar un papel en la regulación a corto plazo (Yamanaka *et al.*, 1999).

En relación con los mecanismos de actuación de las orexinas se han demostrado interacciones morfológicas y funcionales entre las rutas orexigénicas, habiéndose expuesto en roedores una interacción entre NPY y orexinas (Jain *et al.*, 2000; Yamanaka *et al.*, 2000; Sahu, 2002), así como entre NPY y galanina (Horvath *et al.*, 1996; Kalra *et al.*, 1999). El aumento de la ingesta de alimento inducida por las orexinas sólo es parcialmente inhibida por la leptina, lo que implica que este efecto está regulado tanto por rutas sensibles como por rutas no sensibles a la leptina (Zhu *et al.*, 2002).

Peces. Estudios recientes han mostrado un efecto estimulador de la ingesta en el carpín dorado por ambas orexinas. La inyección i.c.v. de OX-A y OX-B humanas aumenta su ingesta de alimento (Volkoff *et al.*, 1999; Volkoff y Peter, 2000; Volkoff y Peter, 2001b; Volkoff *et al.*, 2003), lo que sugiere un papel de las orexinas en la regulación del comportamiento alimentario en los peces, sugiriendo, a su vez, la presencia de un péptido similar a las orexinas en el cerebro de los peces (Volkoff *et al.*, 1999).

También en peces la actuación de la OX-A es más potente que la de la OX-B. La OX-A estimula la ingesta a concentraciones más bajas que la OX-B, además de presentar un efecto estimulador mayor a la misma concentración. También aparecen diferencias entre ambos tipos de orexinas en relación con su momento de actuación, ambas actúan incrementando la ingesta dentro de los primeros 15 minutos después de su inyección i.c.v., descendiendo la ingesta a continuación. Sin embargo, la dosis más elevada de OX-B provoca una disminución pronunciada de la ingesta de alimento en el periodo comprendido entre 30 y 45 minutos después de su inyección i.c.v., mientras que los peces tratados con una dosis similar de OX-A continúan teniendo una ingesta similar a los controles tratados con salino (Volkoff *et al.*, 1999).

La administración conjunta de OX-A y NPY o de OX-A y galanina aumentan de forma sinérgica la ingesta de alimento. Cuando, mediante una dosis elevada de OX-A, se bloquean los receptores para la OX-A, se reduce la ingesta inducida por NPY o por galanina en el carpín dorado. Todo ello, apoyado por el aumento de la expresión del ARNm del NPY en el telencéfalo y el hipotálamo tras la inyección de OX-A, indica que tanto la acción del NPY como de la galanina dependen, al menos parcialmente, de la acción simultánea de la OX-A para estimular la ingesta de alimento en los peces (Volkoff y Peter, 2001b). Los mismos autores también han observado que la administración conjunta de CART (55-102) y OX-A inhibe en una forma dosis dependiente la alimentación inducida por la OX-A sola, indicando que los péptidos CART están implicados en las rutas reguladoras de la alimentación por OX-A en el carpín dorado (Volkoff y Peter, 2000). Así mismo, la administración de leptina a carpines dorados con la alimentación inducida por OX-A produce una inhibición dosis dependiente, llegando a suprimir totalmente el efecto orexigénico de la OX-A con una dosis de 1 ng/g de leptina, lo que sugiere que la OX-A debe formar parte de una retroalimentación negativa regulando la acción de la leptina (Volkoff *et al.*, 2003).

1.1.3.3.3. Galanina (GAL)

La GAL es un péptido formado por 29 aminoácidos, que fue aislado originalmente en el intestino delgado de cerdo (Tatemoto *et al.*, 1983). Está ampliamente distribuido en el TGI y el SNC de mamíferos (Merchenthaler *et al.*, 1993). En peces fue aislada y secuenciada en trucha arco iris, mostrando un 79% de homología (péptido similar a la GAL, "GAL-like") con la GAL porcina (Anglade *et al.*, 1994). En el salmón Atlántico se han descrito sitios de unión para el "GAL-like", apareciendo la mayor densidad de sitios de unión en el hipotálamo posterior (Holmqvist y Carlberg, 1992).

La GAL, junto con el NPY, es el péptido más abundante del hipotálamo. Ambos son sintetizados en el ARC y son liberados en el PVN donde estimulan el apetito (Crawley *et al.*, 1990; Kyrkouli *et al.*, 1990a; Dryden *et al.*, 1996).

Las múltiples acciones de la galanina son mediadas por tres tipos de receptores: GALR1, GALR2 y GALR3, los cuales presentan homología pero diferentes patrones de distribución. GALR1 se expresa abundantemente en el sistema nervioso central, mientras que GALR2 y GALR3 se expresan también en la periferia (Burgevin *et al.*, 1995; Howard *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997b).

Mamíferos. Las funciones fisiológicas de la GAL hipotalámica aún no han sido perfectamente establecidas. Produce efectos miotrópicos en el músculo liso vascular y gastrointestinal (Crawley, 1995); se ha sugerido un mecanismo de acción endocrino, ya que su inyección central altera los niveles circulantes de diversas hormonas, elevando los niveles de GH y prolactina, y reduciendo insulina, ACTH y corticosterona (Tempel y Leibowitz, 1990a; Koenig *et al.*, 1991) e induce hiperglucemia periférica (McDonald *et al.*, 1985). Así mismo, la información existente en relación con su acción en el comportamiento de los animales también es limitada, asociándosele únicamente acciones relacionadas con el comportamiento alimentario.

La GAL estimula el apetito mediante su acción en el cerebro de mamíferos (Kalra *et al.*, 1999), se ha observado que su inyección en el PVN, LH, VHM y el núcleo central de la amígdala estimula la alimentación en ratas saciadas (Kyrkouli *et al.*, 1990a; Schick *et al.*, 1993; Dube *et al.*, 1994). Como se ha señalado anteriormente se desconoce su mecanismo exacto de actuación. Se ha comprobado que la GAL puede mediar, al menos de forma parcial, la alimentación producida por el NPY (Kalra *et al.*, 1997), puesto que las neuronas productoras de NPY están directamente comunicadas con las neuronas productoras de GAL en el PVN y ARC del cerebro de la rata (Horvart *et al.*, 1996). Las terminales nerviosas GAL-inmunopositivas establecen uniones sinápticas con las dendritas y el soma de las neuronas portadoras de POMC en el ARC, posiblemente estimulando la liberación de b-END, las cuales también estimulan la ingesta de alimento (Horvart *et al.*, 1995). Pruebas inmunohistológicas han sugerido que la norepinefrina (NE) y la b-END, están también implicadas en la alimentación inducida por GAL (Kyrkouli *et al.*, 1990b; Dube *et al.*, 1994). La expresión de GAL en el ARC y PVN está indirectamente influida por leptina e insulina (Bradbury *et al.*, 2000). Todas estas pruebas muestran sin lugar a dudas que el aumento de la ingesta producido por la GAL implica varias señales orexigénicas, mediante la existencia de líneas de comunicación entre NPYÆGALÆb-END y GALÆENE (Kalra *et al.*, 1999).

En relación con la ingesta de macronutrientes, la administración de GAL aumenta selectivamente la ingesta de grasa (Tempel *et al.*, 1988; Kyrkouli *et al.*, 1990a; Akabayashi *et al.*, 1994b), no apareciendo relación entre el nivel de GAL en el PVN y la ingesta de proteína (P) o carbohidratos (CH) (Akabayashi *et al.*, 1994b; Leibowitz *et al.*, 1998a,b). Los niveles endógenos de GAL son elevados en el PVN de animales que de forma natural consumen grandes cantidades de grasa (F) (Akabayashi *et al.*, 1994b), lo que refuerza la marcada relación entre los niveles de GAL en el PVN y el consumo de F. La F de la dieta es el principal responsable del aumento del peso corporal y del desarrollo de la obesidad, produciendo una saciedad menor, una ingesta total mayor, acumulación de F, y un balance energético positivo respecto a los otros macronutrientes (Flatt, 1987). Por todo lo anterior se ha considerado a la GAL en el PVN como un marcador de la ingesta de F y, por lo tanto, de la ganancia de peso (Akabayashi *et al.*, 1994b; Leibowitz *et al.*, 1998).

Se ha observado que el efecto orexigénico de la GAL es mayor al principio del periodo de oscuridad, periodo que coincide con el de alimentación de la rata, y sólo es un efecto a corto plazo (Kyrkouli *et al.*, 1990a). Los dos estudios originales de selección de macronutrientes en ratas, demostraron que la GAL potencia la ingesta tanto de F como de CH

(Tempel *et al.*, 1988; Tempel y Leibowitz, 1990b), pero esta potenciación depende del momento del periodo de alimentación: durante el periodo temprano de oscuridad, cuando está potenciada la ingesta natural de CH (Leibowitz, 1990; Leibowitz, 2000), la GAL aumenta la ingesta de CH y de F, mientras que durante el periodo tardío de oscuridad, cuando está potenciada de forma natural la ingesta de F (Shor-Posner *et al.*, 1991; Leibowitz, 2000), sólo estimula la ingesta de F, reflejando una función diferencial de los neurotransmisores hipotalámicos en el control de la ingestión de macronutrientes en diferentes periodos del ciclo circadiano (Tempel y Leibowitz, 1990b). Todo ello es sustentado por la existencia de un ritmo circadiano de GAL endógena en el PVN, apareciendo un único pico alrededor de la mitad del ciclo nocturno de alimentación en la rata (Akabayashi *et al.*, 1994c).

Peces. Mediante estudios inmunohistoquímicos y autorradiográficos se ha demostrado la presencia de GAL en el cerebro de peces teleósteos (Holmqvist y Carlberg, 1992; Merchenthaler *et al.*, 1993; Anglade *et al.*, 1994) y eslamobranquios (Vallarino *et al.*, 1991), en el TGI de esturiones (Wang *et al.*, 1999a), y en fibras nerviosas del TGI, corazón y pulmones de teleósteos (Killian *et al.*, 1993; Holmgren *et al.*, 1994). La GAL en el cerebro de los peces se encuentra distribuida en neuronas del área preóptica rostral, hipotálamo ventral; en fibras y cuerpos celulares de las regiones preóptica ventricular, preóptica y el núcleo tuberal lateral. Los receptores para la GAL se han localizado en el telencéfalo, hipotálamo tuberal y posterior, tálamo, bulbo raquídeo, tectum óptico y pituitaria (De Pedro y Björnsson, 2001).

El papel fisiológico de la GAL es desconocido, pero estudios recientes han demostrado efectos cardiovasculares (Le Mével *et al.*, 1998) y en el comportamiento alimentario, aumentando la ingesta de alimento en peces (de Pedro *et al.*, 1995a; Guijarro *et al.*, 1999; Volkoff y Peter, 2001b). La inyección i.c.v. de GAL en el carpín dorado estimula significativamente la ingesta de alimento durante las dos primeras horas después de su administración, no teniendo efecto durante el resto del periodo de alimentación (De Pedro *et al.*, 1995a), mientras que en la tenca (*Tinca tinca*) el efecto tiene lugar en el periodo comprendido entre 2-8h después de su administración (Guijarro *et al.*, 1999). Por el contrario, la inyección i.p. no produce estimulación de la ingesta de alimento (De Pedro *et al.*, 1995a; Guijarro *et al.*, 1999). El efecto estimulador de la GAL en la ingesta de alimento en el carpín dorado puede ser bloqueado por antagonistas de los receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos, mientras que no lo es por antagonistas de los receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos, indicando que, en peces, la GAL regula la ingesta de alimento a través de receptores específicos y que estos receptores son los $\alpha 2$ -adrenérgicos (De Pedro *et al.*, 1995a).

1.1.3.3.4. Péptidos derivados del gen pro-opiomelanocortina (POMC)

Los péptidos opioides se dividen en tres grandes categorías: endorfinas, encefalinas y dinorfinas, cada una de ellas formadas a partir de proteínas precursoras diferentes, la POMC, la proencefalina y la prodinorfina, respectivamente (Eipper y Mains, 1980; Smith y Funder, 1988). Los ARNm del POMC codifican para una gran proteína precursora de 222 aminoácidos, la cual da lugar a la hormona estimulante de los g-melanocitos (g-MSH), la

ACTH y la hormona b-lipotropina (b-LPH) (Nakanishi *et al.*, 1979). A su vez, la ACTH y la b-LPH contienen pequeños componentes peptídicos con actividad biológica, la ACTH da lugar a la a-MSH y al péptido similar a la corticotropina del lóbulo intermedio, mientras que la b-LPH da lugar a la g-LPH, b-MSH, b-END y metioninencefalina (Smith y Funder, 1988). En el hipotálamo de mamíferos, las neuronas portadoras de POMC están localizadas exclusivamente en el ARC, desde donde emiten proyecciones al VMN, PVN, DMN, y otras áreas hipotalámicas (Khachaturian *et al.*, 1985). La b-END es un péptido opioide de 29 a 31 aminoácidos presente en diferentes grupos de vertebrados, entre los que se encuentran los peces. Las neuronas portadoras de b-END, y sus proyecciones, están localizadas en el hipotálamo (Dores *et al.*, 1990). Los receptores para los péptidos opioides se clasifican en varios subtipos, los m (m_1 y m_2), los d (d_1 y d_2) y los k (k_1 , k_2 y k_3) (Fowler y Fraser, 1994). Las b-END, dinorfina A y encefalinas estimulan la ingesta de alimento en mamíferos por activación de los receptores m-, d- k-opiáceos, respectivamente (Kalra *et al.*, 1999). La a-MSH es un péptido no opiáceo codificado por el POMC, distribuido en el hipotálamo de la rata (Jacobowitz y O'Donohue, 1978), que inhibe la ingesta de alimento, probablemente a través del receptor para la melanocortina de tipo 4 (MC4-R), uno de los cinco tipos de receptores para la melanocortina (Kalra *et al.*, 1999). El ARNm para MC4-R se distribuye en el cerebro, incluyendo el PVN, VMN, DMN y núcleos que ocupan la zona media del hipotálamo (Tatro, 1990; Mountjoy *et al.*, 1994). Las neuronas a-MSH se localizan en el ARC (Figura 3), desde donde se ha hipotetizado que conducen las señales adiposas (leptina e insulina) hasta el PVN y LHA, cuyas neuronas conectan con el NTS y el DMV e interaccionan con las señales de saciedad (CCK), mediando la terminación de la ingesta, regulando el control del tamaño de la comida y la ingesta acumulada de alimento (Baskin *et al.*, 1999a).

El gen POMC codifica en peces un precursor que puede ser procesado en a-MSH, b-END y ACTH, pero que no puede codificar para g-MSH (Salbert *et al.*, 1992; Okuta *et al.*, 1996; Arends *et al.*, 1998; Hui *et al.*, 1999). Las endorfinas han sido aisladas en salmón (Kawauchi *et al.*, 1980), y el péptido similar a la endorfina y sus sitios de unión IR han sido localizados en el cerebro y la pituitaria de varias especies de peces (Vallarino, 1985; Rosenblum y Callard, 1988; Dores *et al.*, 1990, 1993). El ARNm para POMC se expresa en el hipotálamo y otras regiones del cerebro de peces (Arends *et al.*, 1998; Hui *et al.*, 1999). Neuronas portadoras de b-END, y sus proyecciones, se localizan en el hipotálamo, concretamente en los núcleos preópticos y tuberal lateral (Dores *et al.*, 1990). En el cerebro del carpín dorado se han encontrado receptores m y k3, pero no d ó k1 (Brooks *et al.*, 1994), detectándose el ARNm de receptores m-opioides en el hipotálamo, bulbos olfatorios y cerebelo del carpín dorado (Hui *et al.*, 1999).

Mamíferos. Como ya se ha indicado, las b-END y las dinorfinas estimulan la ingesta de alimento en mamíferos, tras su administración central (Baile *et al.*, 1986; Morley, 1987; Inui *et al.*, 1991; Lambert *et al.*, 1993; Kalra, 1997; Kalra *et al.*, 1999), por activación de los receptores m y d-opiáceos, respectivamente (Kalra *et al.*, 1999). En general, los péptidos opioides pueden potenciar tanto la ingesta de F como la de P (Evans y Vaccarino, 1990; Leibowitz, 1992; para una revisión Thibault y Booth, 1999). Comparada con la alimentación inducida por NPY, la que producen los opioides es generalmente menor y tiene

una vida media más corta (Levine y Billington, 1989), por ello se ha sugerido que la b-END actuaría como una señal anorexigénica de interconexión (Kalra *et al.*, 1999). Estudios anatómicos muestran uniones morfológicas entre neuronas productoras de b-END, GAL y NPY, y entre las rutas de b-END y GABA en el hipotálamo, fundamentando un papel de las b-END en la interconexión de la red orexigénica (Horvart *et al.*, 1992, 1995, 1997). El NPY estimula la liberación de b-END en el hipotálamo (Kalra *et al.*, 1995), mientras que por otro lado disminuye los niveles de ARNm de POMC en el ARC (Lambert *et al.*, 1994a; García de Yébenes *et al.*, 1995). El pretratamiento con naloxona (NAL), un antagonista de los receptores opiáceos, atenúa la alimentación inducida por NPY (Levine y Billington, 1989) y aumenta los niveles de ARNm de NPY en el ARC y los niveles de NPY en el DMH (Lambert *et al.*, 1994a; García de Yébenes *et al.*, 1995). Los antagonistas de los receptores opioides, especialmente los m y k-antagonistas, disminuyen la ingesta de alimento en mamíferos (Morley, 1987; Cole *et al.*, 1995). Así se ha comprobado que antagonistas como la naloxona y la naltrexona disminuyen el peso corporal y la ingesta de alimento tras su administración crónica (Baile *et al.*, 1986). Una hipótesis que se baraja es la posibilidad de que los péptidos opioides puedan estar implicados en aspectos relacionados con la palatabilidad y la recompensa, aspectos hedónicos de la alimentación, más que con las necesidades energéticas del animal (Inui, 1999b; para una revisión Vaccarino y Kastin, 2000).

Peces. En el carpín dorado, los péptidos opioides están implicados en la regulación de varias respuestas fisiológicas y comportamentales entre las que se encuentra el comportamiento alimentario (De Pedro *et al.*, 1995b). La inyección i.c.v. de b-END produce un aumento de la ingesta de alimento en las 2-8 h siguientes a su administración (De Pedro *et al.*, 1995b; Guijarro *et al.*, 1999). Por el contrario la inyección i.p. no afecta la ingesta de alimento. La inyección i.c.v. de NAL reduce la ingesta de alimento y revierte parcialmente los efectos estimuladores de la b-END, indicando que la estimulación de la ingesta de alimento por b-END tiene lugar en el cerebro de los peces por medio de receptores opioides (De Pedro *et al.*, 1995b), concretamente es mediada por receptores m (De Pedro *et al.*, 1996). Se ha observado que la administración central de agonistas de los receptores opioides estimula la ingesta, mientras que la de antagonistas reduce la ingesta de alimento en el carpín dorado (De Pedro *et al.*, 1996).

El papel de la a-MSH ha sido intensamente estudiado en relación con la regulación del color de la piel (Baker, 1993). Recientemente se ha descrito la presencia de NDP-a-MSH en los centros cerebrales implicados en el control de la ingesta de alimento en peces. Así mismo, se ha descrito que la inyección central de NDP-a-MSH, causa una inhibición dosis dependiente de la ingesta de alimento, durante las dos primeras horas, pero no en las 6 horas siguientes a su administración, en peces (Cerdá-Reverter *et al.*, 2003).

1.1.3.3.5. *Hormona concentradora de la melanina (MCH)*

La MCH fue descubierta por primera vez en la pituitaria de salmón keta (Kawauchi *et al.*, 1983), en el cual regula el color de la piel por inducción de la agregación de la melanina en los melanocitos (Baker, 1993). En mamíferos se ha descrito su presencia,

es un péptido cíclico de 19 aminoácidos, altamente conservado (Vaughan *et al.*, 1989; Presse *et al.*, 1990), localizado en la zona incerta y LH, con numerosas proyecciones neuronales a través del sistema nervioso central (Bittencourt *et al.*, 1992).

Mamíferos. La inyección i.c.v. de MCH estimula la alimentación en ratas en diferentes momentos de la fase de oscuridad (Ou *et al.*, 1996). Paradójicamente se ha encontrado un efecto anorexigénico de su i.c.v. en machos de ratas durante el principio de la fase de oscuridad a dosis muy bajas (Presse *et al.*, 1996). En 1997, Rossi y colaboradores, clarificaron esta discrepancia encontrando que la i.c.v. de MCH en ratas macho aumentaba la ingesta de alimento durante todo el ciclo de luz-oscuridad durante los 5 primeros días de su administración, no estimulando la ingesta de alimento en los días posteriores, lo que apoya un papel de la MCH en la regulación de la ingesta de alimento a corto plazo, pero no a largo plazo por lo que no participaría en el control del peso corporal.

La administración central de leptina disminuye la expresión hipotalámica de MCH y evita el aumento de la ingesta de alimento producido por MCH (Sahu, 1998), sugiriendo una acción mediadora de la leptina en la acción orexigénica de la MCH. También se ha propuesto una acción mediadora de la MCH en la acción inductora de reducción del peso corporal de la leptina vía SNC (Håkansson *et al.*, 1998). Continuando con el posible papel de la MCH en la regulación de la ingesta de alimento y del peso corporal se han descrito conexiones morfológicas entre las neuronas productoras de NPY, MCH y OX, especulándose que estas señales orexigénicas puedan actuar y/o regular la actividad de otras señales orexigénicas y anorexigénicas en el hipotálamo (Tritos *et al.*, 1998). Esta afirmación es contradicha por resultados que muestran una acción sinérgica entre NPY y OX-A; falta de interacción entre OX-A y MCH y una interacción muy leve o inexistente entre NPY y MCH en la inducción de la ingesta de alimento, sugiriendo que la acción de la MCH puede ser independiente de la acción del NPY y la OX-A (Sahu, 2002), si bien se ha encontrado que la inyección i.c.v. del GLP-1 evita el efecto orexigénico de MCH y NPY, la administración i.c.v. de α -MSH o de neurotensina evitan la acción de la MCH pero no del NPY, sugiriendo una interacción entre sustancias orexigénicas y anoréticas en el control de la ingesta normal de alimento (Tritos *et al.*, 1998).

Peces. Pese a que la MCH fue descubierta por primera vez en la pituitaria de salmón (Kawauchi *et al.*, 1983) el único efecto que se ha estudiado en peces hasta el momento es su acción sobre el color de la piel (Baker, 1993), permaneciendo su posible papel en la ingesta de alimento sin estudiar.

11.34. Señales anorexigénicas cerebrales

Al igual que sucedía con las señales orexigénicas, el abanico de sustancias que disminuyen la ingesta de alimento por su acción en el cerebro es muy amplio (Tabla 2), por lo que vamos a ceñirnos, una vez más, a las que producen un efecto en la ingesta de alimento en peces, o de las que se sospecha este efecto.

Amilina	Interleukina 1b (IL-1b)
Anorectina	Leptina
Bombesina	Neurotensina
Calcitonina	Norepinefrina (NE, receptor b)
Ciclo-histidil-prolina diketopiperazina	Oxitocina
Colecistoquina (CCK)	Péptido liberador de la gastrina (GRP)
Dopamina (DGRP)	Péptido relacionado con el gen de calcitonina
Enterostatina	Péptido 1 similar al glucagón (GLP-1)
Factor ácido del crecimiento del fibroblasto	Péptido 2 similar al glucagón (GLP-2)
Factor liberador de la corticotropina (CRF) (PACAP)	Polipépt. activador de adenilato-ciclasa pituitaria
Glucagón	Polipéptido pancreático (PP)
Histamina	Serotonina (5-HT)
Hormona estimuladora de α-melanocitos (α-MSH)	Transcripto regulado por cocaína y amfetamina (CART)
Hormona liberadora de Tirotropina (TRH)	Urocortina
Insulina	Vasopresina

Modificado de Inui, 2000; Näslund *et al.*, 2001.

Tabla 2. Hormonas, neurotransmisores y neuropeptidos que inhiben la ingesta de alimento.

1.1.3.4.1. Colecistoquinina (CCK)

La CCK es una hormona de naturaleza peptídica secretada por las células endocrinas del digestivo y que actúa como un neurotransmisor en los sistemas nerviosos central y periférico, pudiendo actuar como una señal de saciación, reduciendo la ingesta de alimento tanto a nivel del digestivo como centralmente (McLaughlin y Baile, 1981; Baile *et al.*, 1986; Crawley y Corwin, 1994; Schick *et al.*, 1994). Tanto en el cerebro como en la circulación periférica, la CCK existe en múltiples formas moleculares, de 4, 8, 22, 33 y de 39 a 58 aminoácidos de longitud. Las dos formas principales son: la forma primaria gastrointestinal que contiene 33 ó 39 aminoácidos, y el octapéptido que se encuentra distribuido tanto en el digestivo como en el SNC (Baile *et al.*, 1986). El octapéptido (CCK-8), es la forma más pequeña que mantiene su actividad biológica y está bien conservada entre especies (Inui *et al.*, 1989; Hirose *et al.*, 1993). En mamíferos la CCK estimula receptores en el esfínter pilórico y en la rama aferente del nervio vago abdominal, el cual vuelve a enviar un mensaje al PVN y al tronco encefálico, donde también está presente el ARNm de la CCK (Ingram *et al.*, 1989). La CCK también es liberada en sitios hipotalámicos (PVN) después de la acción intragástrica de los nutrientes y produce una influencia neuronal en la ingesta de alimento a nivel del cerebro (Baile y Della-Fera, 1985; Schick *et al.*, 1986, 1987).

En peces, se han encontrado fibras y somas IR para CCK/gastrina ampliamente distribuidas en el TGI, cerebro y pituitaria (Himick y Peter, 1994a). En el cerebro se encuentran ampliamente distribuidas en el telencéfalo, diencefalo, mesencefalo y tronco encefálico (Himick y Peter, 1994a), concretamente en el hipotálamo ventromedial y ventrolateral

posterior, en los lóbulos hipotalámicos inferiores, tegumentum y tectum óptico del tálamo, región preóptica telencefálica, lóbulo facial y vagal del metencéfalo-mielencéfalo y bulbos olfatorios (Notenboom *et al.*, 1981; Peyon *et al.*, 1998; Himick y Peter, 1994a; Himick *et al.*, 1996; Peyon *et al.*, 1999; Farrell *et al.*, 2002). Se han encontrado sitios de unión específicos de CCK en varias regiones cerebrales, entre las que se incluye el hipotálamo y la pituitaria (Moons *et al.*, 1992; Himick *et al.*, 1996; Peyon *et al.*, 1998). Todo ello indica que los péptidos de CCK/gastrina desempeñan uno o múltiples papeles en la regulación central del comportamiento alimentario, actuando como un factor saciante (Himick y Peter, 1994a; Peyon *et al.*, 1998; Peyon *et al.*, 1999), y en la secreción de hormonas en la hipófisis, como la GH y gonadotropina-II en peces (Himick y Peter, 1994a; Peyon *et al.*, 1998).

Mamíferos. Han sido identificados dos subtipos de receptores, los CCK-A (o CCK-1) y los CCK-B (o CCK-2). Los receptores CCK-A predominan en los tejidos periféricos como en el páncreas, aferencias vagales, neuronas entéricas y varios sitios cerebrales, mediando la saciedad periférica, mientras que los receptores CCK-B son más abundantes en el sistema nervioso central, nervio vago aferente y estómago, mediando la saciedad a nivel cerebral (Gardner y Jensen, 1984; Moran *et al.*, 1986; Hill y Wooddruff, 1990; Kopin *et al.*, 1992; Wank *et al.*, 1992a,b).

Numerosos hechos sugieren que el papel de la CCK como señal de saciedad tiene lugar mediante mecanismos periféricos, como, por ejemplo: (a) las señales de saciedad inducidas por CCK son mediadas por los receptores periféricos CCK-A y no por los CCK-B, como muestra el aumento de la ingesta de alimento y el retraso de la saciedad por antagonistas de los receptores CCK-A (CCK-AR), los cuales revierten la inhibición de la ingesta de alimento producida por la CCK en mamíferos (Lotti *et al.*, 1987; Lotti y Chang, 1989; Crawley y Corwin, 1994; Wolkowitz *et al.*, 1990; Moran *et al.*, 1998; Matzinger *et al.*, 1999, 2000; Gutzwiller *et al.*, 2000); (b) la relajación transitoria del esfínter esofágico, inducida por distensión gástrica, aumenta por la acción de CCK y disminuye por el loxiglumide, un antagonista de los CCK-AR (Boulant *et al.*, 1997); (c) el devazepide y el A-70104, dos antagonistas de los CCK-AR, revierten la inhibición del vaciado gástrico que se produce en respuesta a una dosis de CCK (Reidelberger *et al.*, 2003); (d) aunque los receptores CCK-B son los principales en el cerebro, también está presente el ARNm de los receptores CCK-A en áreas localizadas del cerebro, entre las que se encuentra el PVN (Honda *et al.*, 1993; Nagata *et al.*, 1996); (e) la administración central de CCK-8 induce un aumento plasmático de CCK suficiente para inhibir la ingesta de alimento por un mecanismo periférico (Crawley *et al.*, 1991; Blevins *et al.*, 2000). Así mismo, la inyección central del antagonista de los CCK-AR en el PVN disminuye el efecto saciante periférico de la CCK-8, sugiriendo que la CCK liberada por las neuronas cerebrales podría participar en el procesamiento de la información producida por la CCK periférica (Smith y Gibbs, 1994) y (f) la inyección intraperitoneal de CCK-8 no consigue disminuir la ingesta de alimento en ratones que carecen de receptores CCK-A, mientras que la reducen en un 90% en ratones normales y deficientes en receptores CCK-B (Kopin *et al.*, 1999). No obstante, el antagonista del receptor CCK-B, el L-365,260, estimula la ingesta de alimento y retrasa la saciedad postprandial en ratas parcialmente saciadas (Dourish *et al.*, 1989), aumentando la ingesta de alimento tras su inyección en el LH (Schick *et al.*, 1994). Sugiriendo que, en

determinadas condiciones, el receptor CCK-B podría desempeñar un papel en la regulación de la alimentación (Inui, 2000).

En los últimos años se ha demostrado que la administración de CCK aumenta la concentración plasmática de leptina por movilización de la leptina gástrica (Bado *et al.*, 1998), y se ha probado una interacción sinérgica, en la reducción a corto plazo de la ingesta de alimento, entre leptina y CCK (Barrachina *et al.*, 1997; Matson *et al.*, 1997, 1999, 2000, 2002; Emond *et al.*, 1999, 2001; Wang *et al.*, 2000). Así mismo, la CCK modula la actividad de la serotonina (Voigt *et al.*, 1998). Ambas sustancias están implicadas en la mediación de los efectos fisiológicos saciantes, sugiriéndose una relación sinérgica entre los mecanismos de control de la CCK y 5-HT en la ingesta total de alimento (Cooper y Dourish, 1990; Burton-Freeman *et al.*, 1999; Gobbi *et al.*, 2001). También se ha descrito una interacción entre la CCK y el NPY. La inyección periférica de CCK disminuye los niveles plasmáticos e hipotalámicos de NPY (Pages *et al.*, 1990). En animales ayunados, el efecto saciante de la CCK se ve atenuado, mientras que aumenta la respuesta a agentes orexigénicos como el NPY (Ahima *et al.*, 1996).

En relación con el efecto de la CCK en la selección de macronutrientes en ratas, se ha descrito que la administración periférica (Avery y Livosky, 1986; McCoy *et al.*, 1990; Mamoun *et al.*, 1997) o central (Thibault *et al.*, 1990) de CCK reduce la ingesta de todos los macronutrientes y modifica su patrón de selección. Su inyección i.p. redujo la cantidad ingerida de todos los macronutrientes 30 minutos después de su inyección, permaneciendo disminuida la ingesta de P durante al menos seis horas, mientras que la de F sólo se mantuvo reducida durante una hora (McCoy *et al.*, 1990). No obstante, otros autores han encontrado que sólo reduce la ingesta de F y por un espacio de tiempo inferior a una hora después de su inyección (Avery y Livosky, 1986) o que el macronutriente cuya ingesta se ve reducida son los CH y no la P, ya que mientras que la CCK-8 inhibe la ingesta de CH, el devazepide, un antagonista de los receptores CCK-A, aumenta la ingesta de CH, pero ninguno de los dos afecta la ingesta de P (Mamoun *et al.*, 1997). La inyección central de un derivado de la CCK-8, el pGlu-CCK-8, marcadamente suprime la ingesta de CH y reduce, en menor medida, la ingesta de F (Thibault *et al.*, 1990). Independientemente del macronutriente sobre el cual se produzca el efecto, los resultados obtenidos sugieren que la CCK podría estar implicada en la regulación de la selección de macronutrientes.

Peces. La administración i.c.v. o i.p. de CCK-8 sulfatada produce una supresión aguda, del 95% (dosis de CCK-8: 50 ng/g) y 58% (100 ng/g) respectivamente, de la ingesta de alimento en el carpín dorado, 45 minutos después de su inyección. La administración i.p. de CCK-8 no sulfatada produce una reducción de la ingesta del 11% (95,6 ng/g), mostrando ser menos efectiva que la CCK-8s. Ambos resultados indican que la CCK actúa como un factor de saciedad en peces (Himick y Peter, 1994a). Así mismo, se ha observado que a continuación de una comida tiene lugar la síntesis y liberación de la CCK en carpín dorado, apareciendo un aumento transitorio postprandial de los niveles de ARNm de CCK en el cerebro, así como un aumento postprandial en la expresión génica de CCK en el hipotálamo, bulbos olfatorios, el área pre-óptica del telencéfalo y el área cerebral posterior, lo que sugiere que la síntesis y liberación de CCK, producida a continuación

de una comida, podría estar implicada en la acción central inhibidora de la ingesta de alimento por CCK (Peyon *et al.*, 1999).

En peces, el sistema gustatorio está dividido en dos subsistemas: (1) el subsistema facial del gusto, que sirve para localizar la presencia de alimento, ya que puede detectar sustancias químicas a una cierta distancia y (2) el subsistema vagal del gusto, que desempeña una función sensoriomotora relacionada con la ingesta selectiva de alimento (Kanwal y Finger, 1992). Como ya se ha indicado los lóbulos facial y vagal del metencéfalo-miencéfalo contienen una gran cantidad de sitios de unión para la CCK (Himick *et al.*, 1996) y una elevada IR para péptidos similares a la CCK (Himick y Peter, 1994a), sugiriendo la participación de la CCK en la percepción de las señales quimio-sensoriales del alimento por el sistema gustatorio (Peyon *et al.*, 1999). Al igual que pasa con el sistema gustatorio, los bulbos y tractos olfatorios, así como ciertas áreas telencefálicas, presentan una gran cantidad de sitios de unión y una elevada IR para CCK (Himick y Peter, 1994a; Himick *et al.*, 1996), lo que indica una posible participación de la CCK en la recepción y transmisión de la información sensorial olfatoria desde el telencéfalo al hipotálamo ventroposterior durante la alimentación (Peyon *et al.*, 1999).

11.34.3. Bombasina (BBS)

La BBS es un tetradecapéptido que se aisló por primera vez de extractos de la piel del abdomen del sapo de fuego, *Bombina bombina* (Anastasi *et al.*, 1971). En mamíferos, tanto la BBS como el GRP, un péptido de 27 aminoácidos con una secuencia C-terminal similar a la de la BBS, están ampliamente distribuidos en el TGI y el SNC (McCoy y Avery, 1990). Otro péptido análogo a la BBS detectado en el esófago es la neuromedina B (NMB) (Von Schrenck *et al.*, 1989). La BBS interactúa por igual con los dos tipos de receptores, los GRP-preferentes y los NMB-preferentes, indicando el papel que desempeñan ambos en la supresión de la ingesta de alimento por la BBS y los péptidos similares a la BBS (Ladenheim *et al.*, 1996). Han sido descritos otros dos tipos de receptores en mamíferos, el BB3 (Fathi *et al.*, 1993) y el BB4 (Nagalia *et al.*, 1995). En peces, los péptidos similares a la BBS han sido localizados en neuronas (Himick y Peter, 1994b, 1995a; Himick *et al.*, 1995) y células endocrinas del TGI (Holmgren y Jonson, 1988; Jensen y Conlon, 1992; Kiliaan *et al.*, 1992; Barrenechea *et al.*, 1994; Himick y Peter, 1994b; Holmgren *et al.*, 1994), sistema cardiovascular (Himick y Peter, 1994b; Holmgren *et al.*, 1994), sistema respiratorio (Holmgren *et al.*, 1994) y cerebro (Himick y Peter, 1994b). En el carpín dorado, los péptidos similares a BBS/GRP están presentes en áreas nucleares del hipotálamo ventro-posterior y los lóbulos inferiores hipotalámicos, asociados con el centro de alimentación hipotalámico de peces (Himick y Peter, 1995a). Así mismo, se han encontrado sitios de unión específicos para la BBS/GRP en las mismas regiones cerebrales (Himick *et al.*, 1995a). Recientemente se ha aislado y secuenciado un ADNc codificador de BBS/GRP en el cerebro de carpín dorado (Volkoff *et al.*, 2000).

Mamíferos. Los péptidos relacionados con la BBS han mostrado ser potentes supresores de la ingesta de alimento cuando se administran mediante inyección i.p. o centralmente dentro de áreas específicas del hipotálamo y/o en el tronco encefálico (Gibbs *et al.*,

1979; Flynn, 1991; Bai-Han y Rowland, 1996). La BBS produce una pronunciada disminución de la ingesta de alimento cuando se inyecta i.c.v. en el PVN, DMN, VMN y LH, así como cuando se inyecta en la amígdala (Kyrkouli *et al.*, 1987). Se ha observado que cuando se suministra BBS mediante inyección i.p., diferentes regiones cerebrales, como el PVN, el área postrema, el núcleo lateral parabraquial y central de la amígdala muestran una fuerte IR Fos, similar a la inducida por CCK (Bai-Han y Rowland, 1996), por ello se ha propuesto que la BBS puede ser liberada por el TGI en respuesta a la ingesta de alimento y que, a través de mecanismos neuroendocrinos, sirve de puente entre el TGI y el cerebro para inhibir la ingesta de alimento (Merali *et al.*, 1999).

En relación con la selección de macronutrientes, la administración i.p. de BBS, además de reducir la ingesta total, reduce la ingesta de F y de CH en los 30 minutos siguientes a su inyección, mientras que la ingesta de P no se altera, permaneciendo este patrón de ingesta durante al menos un periodo de una hora (Avery y Livosky, 1986). Otros autores encuentran un efecto supresor de la BBS en la ingesta de P durante los 30 minutos siguientes a su administración i.p. y de CH durante los 30-60 minutos siguientes, durando esta inhibición de la ingesta de CH al menos 2 horas (McCoy *et al.*, 1990).

Peces. Los péptidos similares a la BBS han demostrado estar implicados en la regulación de la motilidad gástrica y la actividad visceral de varias especies de peces (Holmgren y Jonson, 1988; Bjerning *et al.*, 1991). La inyección i.p. de BBS disminuye la alimentación en carpa común (*Cyprinus carpio*) (Beach *et al.*, 1988). En el carpín dorado, la BBS suprime la ingesta de alimento de una forma aguda tras su administración tanto i.p. como i.c.v., aumentando los niveles plasmáticos de GH, lo que indica que la BBS no sólo tiene efecto en la supresión de la ingesta sino que también causa una alteración concomitante en los niveles de una hormona, la GH (Himick y Peter, 1994b), pero la posible relación entre la BBS y la GH en la supresión de la ingesta de alimento permanece sin esclarecer. La BBS actúa en el TGI de los peces, pudiendo ejercer su efecto anorético a través de señales a nivel del TGI, como contracción del TGI, vaciado gástrico, etc. (Himick y Peter, 1994b).

1.1.3.4.4. Péptido regulador de la transcripción de cocaína-anfetamina (CART)

El CART es un nuevo neuropeptido aislado inicialmente del hipotálamo de la rata que está transcripcionalmente regulado por la administración de cocaína y anfetamina (Douglas *et al.*, 1995). Se ha aislado en el cerebro, hipófisis, tracto digestivo, páncreas y glándula adrenal de mamíferos (Koylu *et al.*, 1997, 1998; Couceyro *et al.*, 1998; Jensen *et al.*, 1999) y en áreas hipotálamicas implicadas en el control del comportamiento alimentario (Douglas *et al.*, 1995), como el PVN y el ARC (Douglas y Daoud, 1996; Koylu *et al.*, 1997; Elias *et al.*, 1998a; Broberger, 1999). El péptido CART maduro contiene bien 102 (forma larga) o 89 (forma corta) residuos aminoácidos (Douglas y Daoud, 1996) y tiene varios sitios de corte específicos del tejido donde se expresa, dando lugar a varios fragmentos biológicamente activos (Thim *et al.*, 1999). Hasta el momento se han encontrado al menos seis péptidos CART diferentes en mamíferos (Adams *et al.*, 1999). En el cerebro, hipófisis, ojos, gónadas y riñón del carpín dorado se han identificado dos precursores de péptidos CART,

el CART I y el CART II, el CART I está presente también en las agallas. En el cerebro, el CART I se distribuye principalmente en los bulbos olfatorios y el hipotálamo, mientras que el CART II predomina en el tectum óptico (Volkoff y Peter, 2001a).

Mamíferos. Este neuropéptido ha mostrado desempeñar un papel en el control de la ingesta de alimento en ratas (Kuhar y Dall Vechia, 1999). La inyección i.c.v. de fragmentos recombinantes de CART inhibe la ingesta de alimento en condiciones normales y en alimentación inducida por ayuno (Lambert *et al.*, 1998; Broberger, 1999). El fragmento más potente es el CART(55-102), por su estructura, pero otros fragmentos como el CART(55-76) y el CART(62-76) también producen una inhibición dosis dependiente de la ingesta de alimento (Lambert *et al.*, 1998).

Se ha encontrado que el CART modula la acción de dos sustancias reguladoras de la ingesta de alimento, la leptina y el NPY (Kristensen *et al.*, 1998). Las neuronas portadoras de NPY están presentes alrededor de los cuerpos celulares CART positivos en el PVN, sugiriendo una regulación de NPY sobre la producción de CART (Lambert *et al.*, 1998; Broberger, 1999). La disminución de los niveles de leptina provoca un descenso en la expresión del ARNm del CART (Wang *et al.*, 1999b), el cual puede ser restaurado por administración de leptina (Kristensen *et al.*, 1998), ya que la leptina activa las neuronas hipotalámicas de CART (Elias *et al.*, 1998a). En relación con el NPY, inyecciones i.c.v. de fragmentos recombinantes de CART inhiben la alimentación inducida por NPY (Lambert *et al.*, 1998). Estos resultados indican que los péptidos CART desempeñan un papel en el control cerebral de la ingesta de alimento, sugiriendo interacciones funcionales entre los péptidos CART, el NPY y la leptina.

Peces. Se ha observado que tanto el CART(62-76) como el CART(55-102) humanos reducen la ingesta de alimento tanto en peces sujetos a restricción alimentaria como en peces con alimentación inducida por NPY o por OX-A. El CART(55-102) parece ser más potente que el CART(62-76) inhibiendo la ingesta de alimento, produciendo una inhibición de la ingesta del 60-70% a la hora de su administración, empezando su actuación a los 15 minutos. Todo ello sugiere que los péptidos CART desempeñan un papel en la regulación de la alimentación en el carpín dorado (Volkoff y Peter, 2000).

El ayuno durante 96 horas produce una disminución del ARNm del CART I en la región telencefálica-preóptica, hipotálamo y bulbos olfatorios, mientras que sólo disminuye el ARNm del CART II en los bulbos olfatorios del carpín dorado. La realimentación aumenta los niveles de ARNm del CART I en los bulbos olfatorios y el hipotálamo 2 horas después de la ingesta de alimento, mientras que no se observan cambios postprandiales en los niveles de CART II (Volkoff y Peter, 2001a).

En carpín dorado el ayuno produce un aumento de la expresión cerebral del NPY y una reducción de la expresión del CART (Volkoff *et al.*, 2003). Así mismo, se ha observado que la inyección central de leptina incrementa el efecto del CART e induce un aumento en la expresión del ARNm del CART cerebral (Volkoff y Peter, 2001a). Lo que sugiere que la regulación de la ingesta de alimento por los péptidos CART afecta el comportamiento alimentario estimulado por NPY (Volkoff *et al.*, 2003) y que podrían actuar como factores saciantes regulados por leptina (Volkoff y Peter, 2001a).

1.1.3.4.4. Factor liberador de corticotropina (CRF)

El CRF es un péptido de 41 aminoácidos, es la primera hormona hipotalámica estimuladora de la liberación de ACTH en la hipófisis, la cual estimula a su vez la secreción de cortisol por las glándulas adrenales (Antoni, 1986). Además de estar involucrado en la regulación del eje pituitario-adrenal ha demostrado ser un potente anorético en mamíferos, inhibiendo la ingesta de alimento, aumentando el gasto energético y produciendo una pérdida sostenida de peso (Inui, 1999b). Los sitios de acción anorética del CRF están localizados dentro del PVN y son mediados posiblemente por dos tipos de receptores: CRFR1 y CRFR2 (Monnikes *et al.*, 1992; Heinrichs *et al.*, 1993). El CRF ha sido aislado en varias especies de peces (Okawara *et al.*, 1988; Ando *et al.*, 1999; Bernier *et al.*, 1999). En el cerebro de los teleósteos el núcleo preóptico hipotalámico y el núcleo lateral tuberal han mostrado ser los principales sitios donde se encuentra el CRF (Okawara *et al.*, 1992; Ando *et al.*, 1999). Los receptores para el CRF también han sido caracterizados en peces, estando localizados en la hipófisis del carpín dorado (Fryer y Lederis, 1986).

Mamíferos. Las pruebas que indican su papel como un inhibidor endógeno de la ingesta de alimento son numerosas. Su inyección central (i.c.v.), concretamente en el PVN, el principal sitio de expresión del CRF, induce inhibición de la ingesta de alimento (Morely y Levine, 1982; Morley, 1987; Kaiyala *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1994, 1995; Levine y Billington, 1997; Heinrichs *et al.*, 1998). Su administración crónica causa anorexia sostenida y una pérdida de peso progresiva (Schwartz *et al.*, 1995). La capacidad de un antagonista, el a-hélice CRF₉₋₄₁, para atenuar los efectos anoréticos de las inyecciones i.c.v. de CRF en el PVN y no en el VMN, sugiere la participación de receptores específicos en el PVN (Heinrichs *et al.*, 1993).

El CRF interacciona con otras sustancias orexigénicas y anorexigénicas lo que sugiere que el CRF puede estar implicado en una amplia variedad de rutas reguladoras del apetito (Bernier y Peter, 2001a). Así, por ejemplo, el CRF inhibe la alimentación inducida por NPY y media, al menos parcialmente, los efectos anoréticos de la BBS, leptina y posiblemente de la serotonina (Bovetto *et al.*, 1996; Kent *et al.*, 1998; Heinrichs *et al.*, 1993; Heinrichs y Richard, 1999).

El CRF es el principal péptido hipotalámico cuya síntesis y liberación es sensible a la leptina (Inui, 1999b). La leptina estimula la expresión del gen codificador para el CRF (Schwartz *et al.*, 1996; Morimoto *et al.*, 2000) y la liberación basal del CRF en el cerebro (Raber *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 1997), así mismo el efecto anorético de la leptina es atenuado por el antagonista del CRF, el a-hélice CRF₉₋₄₁ (Uehara *et al.*, 1998), y la pérdida de peso producida por la leptina es acompañada por la liberación hipotalámica de CRF. La inyección i.c.v. conjunta de leptina y del antagonista del CRF atenúa el efecto anorético de la leptina en ratas (Uehara *et al.*, 1998). Además, la administración central de leptina estimula la actividad del eje hipotalámico-pituitario-adrenocortical (HPA) (Morimoto *et al.*, 2000). Todo ello sugiere que el CRF está relacionado con la mediación de los efectos de la leptina en la ingesta de alimento (Ingvarsen y Boisclair, 2001).

La inhibición de la actividad de la CRF endógena por inyección del antagonista a-hélice CRF₉₋₄₁ en el PVN (Heinrichs *et al.*, 1993) o la destrucción de neuronas portadoras de

CRF por citotoxinas (Menzaghi *et al.*, 1993) da lugar a un incremento de la ingesta en respuesta a NPY exógeno. Por ello se ha propuesto que el CRF ejerce un efecto inhibitorio sobre la alimentación y el peso corporal a través de la interrupción de la ruta anabólica del NPY (Inui, 1999b), actuando como un neuropéptido anorexigénico secundario en la vía de actuación del NPY (Heinrichs *et al.*, 1993; Uehara *et al.*, 1998).

Peces. El CRF ha mostrado actuar como un regulador de la ingesta de alimento en el carpín dorado (De Pedro *et al.*, 1993, 1995c, 1997, 1998a; Bernier y Peter, 2001b). La inyección i.c.v. de CRF ejerce un efecto inhibitorio de la ingesta de alimento en el carpín dorado 2 horas y en la tenca 8 horas después de su administración, mientras que la i.p. no produce efecto, apoyando un papel central del CRF en el control de la ingesta de alimento (De Pedro *et al.*, 1993, 1995c). Este efecto inhibitorio puede ser revertido por la inyección del antagonista α -hélice CRF₉₋₄₁, sugiriendo que la acción del CRF es mediada a través de receptores específicos (De Pedro *et al.*, 1997; Bernier y Peter, 2001b). En peces, la acción anorética del CRF parece ser independiente del eje pituitario-adrenal, ya que el aumento de cortisol plasmático, debido a la inyección i.p. de CRF, no afecta la alimentación (De Pedro *et al.*, 1993, 1997; Bernier y Peter, 2001b), mientras que la inyección i.c.v. disminuye la ingesta (De Pedro *et al.*, 1993, 1997). Además, los receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos y dopaminérgicos han mostrado estar implicados en la acción anorética del CRF en el carpín dorado (De Pedro *et al.*, 1998a). También es posible que existan interacciones entre el sistema monoaminérgico y el CRF, ya que se ha demostrado que el CRF y la serotonina pueden actuar juntos inhibiendo la ingesta de alimento, mediando el CRF la acción anorética de la serotonina en el carpín dorado (De Pedro *et al.*, 1998b).

11.34.5. Serotonina (5-HT)

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es una monoamina que se sintetiza a partir del aminoácido esencial L-triptófano (Figura 5), siendo la disponibilidad de triptófano en el cerebro el factor limitante para la síntesis de 5-HT tanto en mamíferos (Boadle-Biber, 1993) como en peces teleósteos (Aldengunde *et al.*, 1998, 2000; Winberg *et al.*, 2001).

La 5-HT cerebral se sintetiza en el citoplasma de las neuronas, almacenándose en vesículas densas en la membrana presináptica (Halford *et al.*, 2000), mientras que la 5-HT periférica es sintetizada y liberada por las células enterocromafines de la mucosa del digestivo en respuesta a diferentes estímulos como la distensión del aparato digestivo, la presión osmótica o la presencia de glucosa (Hubel, 1985).

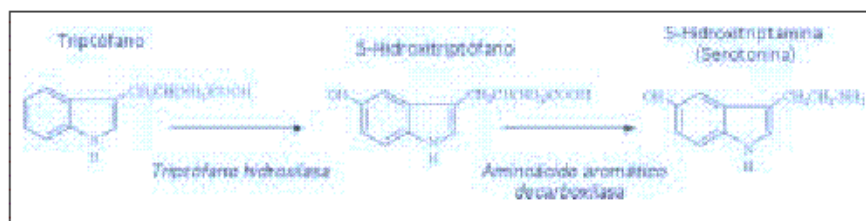


Figura 5. Síntesis de la serotonina a partir de su precursor, el triptófano.

La 5-HT posee una gran variedad de receptores, habiéndose identificado catorce subtipos en mamíferos (Barnes y Sharp, 1999), de ellos actualmente se han descrito cinco subtipos para el receptor 5-HT₁ y tres para el 5-HT₂ (Zittel *et al.*, 2002). En el sistema nervioso entérico de los mamíferos aparecen los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1P}, 5-HT₃ y 5-HT₄ (Wade *et al.*, 1994), mientras que en la trucha arco iris está presente el receptor 5-HT₂ (Burka *et al.*, 1988). En el cerebro de mamíferos el tipo de receptor es el 5-HT_{1A}, el cual ha sido identificado también en el cerebro de la trucha alpina (*Salvelinus alpinus*) (Winberg y Nilsson, 1996). Se cree que los receptores implicados en la reducción de la ingesta asociada con los procesos de saciedad por acción de la 5-HT son los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{2C} (Halford *et al.*, 2000). La distribución exacta de los receptores de las clases 5-HT₁ y 5-HT₂ en los sistemas entérico y nervioso central permanecen sin dilucidar y los receptores más importantes para la ingesta de alimento parece ser que todavía no han sido identificados (Simansky, K.J., 1996).

Mamíferos. La 5-HT está implicada en el control central del comportamiento alimentario y del peso corporal en mamíferos, ya que se ha observado que sustancias estimulantes de la síntesis y liberación de 5-HT hipotalámica reducen la ingesta de alimento y la ganancia de peso, aumentando el gasto energético (Leibowitz y Alexander, 1998). Se ha observado que tanto la 5-HT endógena como la exógena inhiben la ingesta de alimento (Edwards y Stevens, 1991; Ward *et al.*, 1999; Chapelot *et al.*, 2000). Así mismo, también se ha observado que la 5-HT inhibe la ingesta de alimento por reducción de la motivación para iniciar la alimentación, del tamaño de la comida y la duración de la comida, pero no por la frecuencia de alimentación (Shor-Posner *et al.*, 1986; Zittel *et al.*, 2002), habiéndose propuesto la posibilidad de que la 5-HT endógena pueda influir principalmente la terminación más que en el inicio de la alimentación (Leibowitz y Alexander, 1998), acelerando el proceso de saciación (Edwards y Stevens, 1991) y promoviendo principalmente el estado de saciedad (Halford *et al.*, 2000) antes que la supresión del hambre (Shor-Posner *et al.*, 1986). La 5-HT administrada periféricamente también reduce la ingesta de alimento en mamíferos (Simansky, 1995), pero la mayoría de los estudios realizados se ciñen al control hipotalámico de la 5-HT.

Los núcleos PVN, VMN, SCN y DMN son esenciales en el control de la ingesta de nutrientes, siendo especialmente sensibles a la estimulación serotoninérgica directa, y hay pruebas que sugieren que la integridad del hipotálamo, pero no de un núcleo concreto (Fletcher *et al.*, 1993), es necesaria para la respuesta normal de las drogas serotoninérgicas (Stanley *et al.*, 1985).

En mamíferos, la 5-HT está involucrada en la regulación del eje HPA (Chaouloff, 1993; Dinan, 1996), estimulando la liberación de CRF en el hipotálamo (Dinan, 1996). También se ha descrito que reduce el comportamiento agresivo en mamíferos (Larson y Summers, 2001) y peces (Höglund *et al.*, 2001; Hseu *et al.*, 2002). La 5-HT hipotalámica puede interactuar con el NPY tanto en la modulación de la ingesta de alimento como en la regulación del balance energético (Currie y Coscina, 1998). Los niveles hipotalámicos de NPY disminuyen en respuesta a la administración de agonistas de la 5-HT o aumentan por la administración de antagonistas (Rogers *et al.*, 1991; Dryden *et al.*, 1993; Currie y Coscina, 1998). Por último, la 5-HT está asociada a desórdenes alimentarios y de peso corporal como la bulimia y la anorexia nerviosa (Kaye, 1997).

La 5-HT hipotalámica tiene un papel específico en el control de aspectos temporales de la alimentación. En la rata, la 5-HT hipotalámica exhibe un ritmo circadiano caracterizado por un pico al principio del periodo activo de alimentación, justo en la transición entre las fases de iluminación-oscuridad, cuando la motivación para la alimentación es mayor y el almacenamiento de energía es deficitario. En ese momento del día, tiene lugar una preferencia por la ingesta de carbohidratos (CH), que se produce de forma natural (Leibowitz, 1990). Al principio de la fase de oscuridad, el periodo de actividad alimentaria para la rata, la estimulación serotoninérgica del PVN, VMN o SCN es más efectiva en la supresión de la ingesta de alimento y, especialmente, de la ingesta de CH (Leibowitz *et al.*, 1990). La ingesta de P y F permanece inalterada o incluso potenciada por la 5-HT a esta hora (Leibowitz y Alexander, 1998). La supresión de la ingesta de CH es más eficaz al inicio del periodo de alimentación, cuando está aumentada la concentración de triptófano y la síntesis de 5-HT en el cerebro (Fernstrom y Fernstrom, 1995). Se ha propuesto que la 5-HT podría actuar estimulando las neuronas de la "saciedad" en el PVN o VMN, terminando la ingesta de CH de estas comidas iniciales (Sclafani y Aravich, 1983). Así mismo, se ha propuesto que podría interactuar de forma antagonista con la NE y sus receptores α_2 -noradrenérgicos en el PVN (Currie *et al.*, 1994). Hay evidencias que indican que la NE en el PVN es más eficaz al principio del ciclo natural de alimentación, cuando actúa de forma sinérgica con la corticosterona para estimular la ingesta de CH. Esta acción en este momento del día es específicamente antagonizada por la administración de agonistas de la 5-HT (Leibowitz y Alexander, 1998).

El aumento de la 5-HT cerebral en respuesta a la ingesta de alimento (Schwartz *et al.*, 1990) disminuye la ingesta de CH (Leibowitz *et al.*, 1989) mientras que potencia de forma moderada la ingesta de P y F (Leibowitz *et al.*, 1989) o reduce la ingesta de F (Mullen y Martin, 1992). También se ha indicado que lo que podría modificar fuera la ratio CH-P, ya que se ha observado que la proporción de CH en la dieta disminuye por estimulación serotoninérgica (Leibowitz, 1990). Se ha descrito que la inyección de 5-HT en el PVN suprime la ingesta de CH de forma selectiva y dosis dependiente, mientras que no tiene efecto o posiblemente aumenta la ingesta de P o F (Leibowitz *et al.*, 1989), que la inyección en el VMN y SCN disminuye selectivamente la ingesta de CH, existiendo una tendencia al aumento de la ingesta de P y F, mientras que la inyección de 5-HT en otros sitios hipotalámicos o extra-hipotalámicos tiene un efecto reducido o carece de efecto (Weiss y Leibowitz, 1988). Por tanto, se ha propuesto que la 5-HT endógena es activa en el PVN y VMN en el proceso de terminar las comidas tempranas ricas en CH (Leibowitz, 1990).

En resumen podemos decir que la inhibición o reducción de la ingesta de alimento que produce la 5-HT es dosis dependiente, tiene lugar selectivamente sobre los nutrientes y es tiempo dependiente, ya que no tiene lugar en las fases media y tardía del periodo de alimentación, sólo tiene efecto al principio del periodo de alimentación (Leibowitz *et al.*, 1989). En relación con su efecto selectivo sobre la ingesta de macronutrientes, difiere en función de los autores (Tabla 3).

La ingesta de dietas ricas en CH aumentan los niveles de 5-HT en el hipotálamo (Thibault, 1994), lo que termina la ingestión de este nutriente y produce saciedad (Figura 6), sugiriendo un mecanismo de retroalimentación entre la ingesta de CH y los niveles de 5-

Dosis	Ingesta	Plazo	Momento administración	Hábito	Fuente bibliográfica
5-20 nmal	? CH; ? P; ? F	1 h	Principio oscuridad	-	Leibowitz <i>et al.</i> , 1989
5-20 nmal	= CH; = P; = F	1 h	Medio y final oscuridad	-	Leibowitz <i>et al.</i> , 1989
1, 10 nmal/μl	= CH; = P; = F	1,5 h	Principio oscuridad	Comedor CH	Smith <i>et al.</i> , 1999
100, 1000 nmal/μl	= CH; = P; ? F	1,5 h	Principio oscuridad	Comedor CH	Smith <i>et al.</i> , 1999
1, 10, 100 nmal/μl	= CH; ? P; = F	1,5 h	Principio oscuridad	Comedor F	Smith <i>et al.</i> , 1999
1000 nmal/μl	? CH; ? P; ? F	1,5 h	Principio oscuridad	Comedor F	Smith <i>et al.</i> , 1999
2,5 nmal/24h	= CH; ? P; = F	? días	Medio oscuridad	-	Thibault <i>et al.</i> , 1999

CH: carbohidratos; P: proteína; F: grasa

Comedor CH o F: consume >40% de la energía de la dieta como CH o F, respectivamente.

Tabla 3. Efecto de la administración central de 5-HT en la selección de macronutrientes en la rata en función de la dosis empleada, momento de administración, plazo de tiempo en el que se observa el efecto y hábito alimentario.

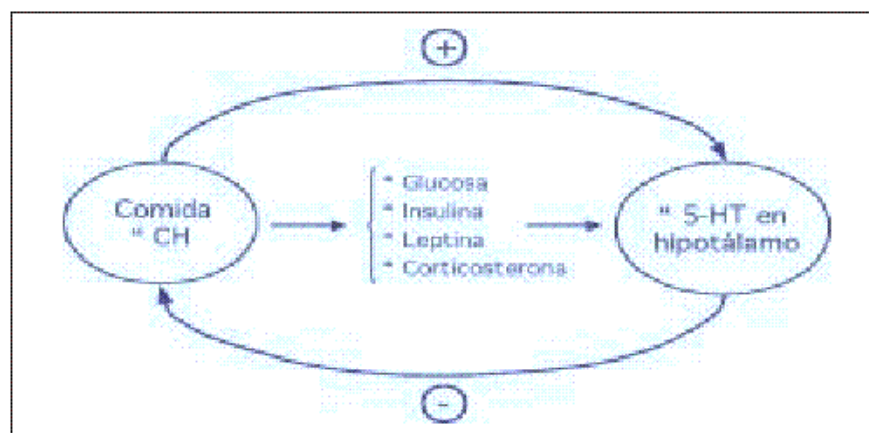


Figura 6. Mecanismo de retroalimentación negativa, que relaciona la serotonina hipotalámica con la glucosa y hormonas circulantes, en el control del tamaño de una comida rica en CH (Redibujado de Leibowitz y Alexander, 1998).

HT (Leibowitz y Alexander, 1998). La insulina y la glucosa se liberan en respuesta a comidas ricas en CH, pudiendo actuar directamente en la inhibición de la ingesta de alimento (McHugh y Moran, 1986; McGowan *et al.*, 1990) o bien hacerlo mediante su efecto estimulador de la síntesis de 5-HT (Leibowitz y Alexander, 1998; Orosco *et al.*, 2000a). Se ha descrito que la administración periférica de insulina potencia la síntesis de 5-HT (Shimizu y Bray, 1990) y que la 5-HT activa la secreción de insulina (Peschke *et al.*, 1997), pero se desconoce cuál es el mecanismo exacto de interacción, especulándose que probablemente sólo sea un eslabón en la amplia cascada de acontecimientos que implica a otros mediadores (Orosco *et al.*, 2000b).

Se ha descrito que la leptina puede aumentar la actividad de las neuronas serotoninérgicas en el cerebro de ratón, aumentando los niveles de 5-HT (Calapai *et al.*, 1999), sin embargo, otros autores han fracasado en su intento de aumentar los niveles de 5-HT administrando leptina (Orlando *et al.*, 2001; Telles *et al.*, 2003).

Peces. En los últimos años se ha demostrado que la 5-HT también está implicada en el control central de la ingesta de alimento en peces, mostrando una acción anorética (De Pedro *et al.*, 1998b; Ruibal *et al.*, 2002). Mientras que la inyección i.p. de 5-HT no tiene efecto en la ingesta de alimento por el carpín dorado, su inyección i.c.v. reduce significativamente la ingesta de alimento 2 h después de su administración (De Pedro *et al.*, 1998b). El CRF podría mediar, al menos parcialmente, la inhibición alimentaria ocasionada por la 5-HT en el carpín dorado, ya que el α -CRF_{9,41}, un antagonista del CRF, parcialmente bloquea el efecto inhibitorio en la ingesta de alimento de la 5-HT (De Pedro *et al.*, 1998b). Se desconoce cuál es la posible relación entre la regulación de la GH y la alimentación mediada por 5-HT, pero se ha observado una acción directa de la 5-HT en la pituitaria del carpín dorado, inhibiendo la liberación de GH (Somoza y Peter, 1991; Peng y Peter, 1997). En peces, la GH no sólo estimula el crecimiento, sino que se ha comprobado que desempeña un papel importante en la regulación de la ingesta de alimento (Peng y Peter, 1997; Lin *et al.*, 2000).

En el intestino de mamíferos se ha cuestionado el papel de la 5-HT como neurotransmisor entre el sistema nervioso entérico y las células epiteliales, por el contrario, en peces se ha sugerido una acción directa de la 5-HT en los enterocitos (Kiliaan *et al.*, 1989; Kiliaan *et al.*, 1996), regulando su funcionamiento. Pudiéndose asumir que la 5-HT es un regulador endocrino en los peces (Kiliaan *et al.*, 1996).

En trucha arco iris y alpina se ha descrito la implicación de la 5-HT en el control del eje hipotalámico-pituitario-interrenal (HPI), el homólogo al eje HPA en mamíferos (Winberg y Lepage, 1998; Øverli *et al.*, 1999; Höglund *et al.*, 2000), mostrando un efecto estimulador de la actividad del HPI (Winberg *et al.*, 1997), como lo demuestra la elevada correlación positiva existente entre el aumento de las concentraciones plasmáticas de cortisol y ACTH en relación con la ratio de ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA)/5-HT (Winberg y Lepage, 1998; Øverli *et al.*, 2000).

1.1.4. Control endocrino de la ingesta

Como ya se ha indicado, en los vertebrados el control de la saciedad y la ingesta de alimento está regido por mecanismos complejos, multifactoriales, los cuales no están claramente definidos. La ingesta de alimento produce estímulos periféricos entre los que se encuentran metabolitos, como la glucosa, hormonas, que pueden proveer información sobre el estatus fisiológico del animal. A continuación se resumirán algunas de las hormonas implicadas en el control de la ingesta de alimento en peces, partiendo de los conocimientos existentes en mamíferos.

1.1.4.1. Hormonas estimuladoras de la ingesta

1.1.4.1.1. Hormonas Tiroideas (TH)

En peces los folículos tiroideos (glándula tiroides) se encuentran presentes en el tejido conectivo de la región faríngea. La principal hormona que liberan es la tiroxina (T_4), la

cual se transforma en los tejidos periféricos en triyodotironina (T_3) por conversión enzimática, aunque también es sintetizada y liberada a la circulación, en menor medida, por el tiroides. La T_4 se considera como la hormona precursora de la T_3 que es la forma biológicamente activa. Las TH están involucradas en la regulación del crecimiento y el metabolismo (revisión: Leatherland, 1994). El estatus nutricional influye en la función del tiroides en los peces; así, se ha observado que la reducción de la cantidad de alimento o el ayuno disminuyen la producción de T_4 y T_3 (Leatherland y Farbridge, 1992; Reddy y Leatherland, 1994; Sefkow et al., 1996), aunque un ayuno a corto plazo no modifica las concentraciones de TH (Pavlidis et al., 1999). La realimentación o la hiperfagia producen un rápido aumento de los niveles de T_4 , pero no de T_3 (Himick y Eales, 1990; Gómez et al., 1997).

Varias especies, como la trucha, lubina, dorada (*Sparus aurata*) y pargo (*Pagrus pagrus*), presentan variaciones diarias en los niveles plasmáticos de T_4 (Osborn et al., 1978; Boujard y Leatherland, 1992a; Cerdá-Reverter et al., 1996; Pavlidis et al., 1997, 1999), y de T_3 (Pavlidis et al., 1997, 1999) mientras que en la trucha arco iris las fluctuaciones diarias de T_3 son de escasa amplitud o nulas (Boujard y Leatherland, 1992a; Boujard et al., 1993; Reddy y Leatherland, 1994; Gómez et al., 1997). No obstante, el momento del día en el que se producen las concentraciones plasmáticas máximas y mínimas de TH parece no estar asociado con el momento de la alimentación o con el número de comidas por día, sino que más bien se relacionan con el ciclo luz-oscuridad y el patrón de actividad diario del pez (Cook y Eales, 1987; Boujard y Leatherland, 1992b; Boujard et al., 1993; Gómez et al., 1997; Pavlidis et al., 1997, 1999), así como con el crecimiento del animal (Gélineau et al., 1996).

La administración crónica de TH aumenta la ingesta de alimento en peces (Donaldson et al., 1979; Fagerlund et al., 1980; Refstie, 1982). En mamíferos se ha descrito que la ingesta de alimento aumenta por la administración de TH o por hipertiroidismo endógeno, debido a aumentos en el gasto energético. Es decir, las TH inducen una pronunciada estimulación del metabolismo basal, creando un balance energético negativo asociado a una pérdida de grasa corporal, y reducen los niveles plasmáticos de insulina y leptina. Por el contrario, el hipotiroidismo disminuye el metabolismo basal, produciendo un aumento de peso corporal y de la ingesta de alimento (Lin et al., 1983). La disminución de la glucosa plasmática observada en la carpa común tras la inyección de T_4 (Donaldson et al., 1979) sugiere que las TH podrían ejercer su efecto estimulador de la ingesta de alimento (Le Bail y Boeuf, 1997) y del crecimiento (Donaldson et al., 1979) a través de la disminución de la glucemia. El posible mecanismo de acción de las TH en el crecimiento y la ingesta de alimento se desconoce. Entre las posibilidades que se sugieren cabe citar una posible acción directa, la facilitación de la actividad anabólica de otras hormonas implicadas en el control de la ingesta de alimento, como la GH con la cual actuaría sinérgicamente (Leatherland, 1994), o ejerciendo una influencia general en el metabolismo. Una elevada actividad tiroidea puede ser necesaria para la lipólisis y la síntesis de proteína (Plisetskaya et al., 1983). Esto coincide con la elevada conversión de T_4 a T_3 , movilización de lípidos hepáticos y la actividad esterasa, observados durante el periodo previo a la puesta de huevos, probablemente debido a una mayor necesidad de requerimientos energéticos y de lípidos para la vitelogénesis y formación de esteroides (Mustonen et al., 2002).

Se han descrito sitios específicos de unión de T_3 en el epitelio olfatorio y el cerebro de peces (Kudo *et al.*, 1994), sugiriendo un importante papel de la T_3 en el funcionamiento del cerebro y del SNC. Así mismo, se han observado cambios en el estatus tiroidal en el cerebro que parecen relacionados con la sensibilidad olfatoria (Morin *et al.*, 1994).

1.1.4.1.2. Hormona del crecimiento (GH) y "Insulin-like growth factor I" (IGF-I)

Hormona del crecimiento. Es una proteína de 22 kDa presente en todos los vertebrados. Posee 190 aminoácidos, pero el número de aminoácidos varía entre especies. La principal fuente de GH plasmática son las células somatotropas localizadas en la *pars distalis* de la adenohipófisis, células endocrinas que sintetizan y secretan la GH. Otras fuentes secundarias de GH en mamíferos son el cerebro y el sistema inmune, pero no están demostradas como tales fuentes en peces. Tanto en mamíferos como en peces se han localizado receptores para GH en la mayoría de los tejidos (Le Bail y Boëuf, 1997), incluyendo el cerebro, lo que sustenta una posible acción directa de la GH en el SNC (Posner *et al.*, 1974; Fraser *et al.*, 1990; Gray *et al.*, 1990; Lai *et al.*, 1991; Sakamoto y Hirano, 1991; Lee *et al.*, 2001).

Neuropéptidos	Efecto	Fuente
Colecistoquinina (CCK)	?	Himick y Peter, 1994a
Bombesina (BBS)	?	Himick y Peter, 1994b
Neuropéptido Y (NPY)	?	Narneware <i>et al.</i> , 2000
Hormona liberadora de GH (GRF)	?	Peter y Merchant, 1995
Polipéptido activador de adenilato-ciclasa pituitaria (PACAP)	?	Parker <i>et al.</i> , 1997
Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)	?	Holloway y Leatherland, 1997
Dopamina	?	Wong <i>et al.</i> , 1993
Factor liberador de tirotropina (TRH)	?	Lin <i>et al.</i> , 1993
Somatostatina (SRIF)	?	Peter y Merchant, 1995
Serotonina (5-HT)	?	Somaza y Peter, 1991
Melatonina	=	Somaza y Peter, 1991

Tabla 4. Regulación neuroendocrina de la liberación de GH en peces.

Está bien establecido que el control de la secreción de GH en peces es multifactorial, siendo el resultado de la interacción de neurohormonas que actúan, directa o indirectamente sobre la hipófisis, estimulando o inhibiendo su secreción (Peng y Peter, 1997; Holloway y Leatherland, 1998). En la tabla 4, aparecen resumidos los efectos que producen diversas neurohormonas en la regulación de la secreción de GH en peces.

En peces la GH está implicada en el crecimiento, la osmorregulación, la reproducción, el funcionamiento del sistema inmune (Peter y Merchant, 1995; Björnsson, 1997; Mancera, y McCormick, 1998, 1999; Pérez-Sánchez, 2000), en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas (Foster *et al.*, 1991a; Rodgerds *et al.*, 1992; O'Connor *et al.*, 1993) y en

el comportamiento de los peces, aumentando la dominancia, agresión y la ingesta de alimento, y disminuyendo la evasión a los predadores (Johnsson y Björnsson, 1994; Jönsson *et al.*, 1996, 1998). Se ha descrito que la GH desempeña un papel importante en la regulación de la ingesta de alimento. La administración crónica de GH da lugar a un aumento de la ingesta de alimento en varias especies de teleósteos (Donaldson *et al.*, 1979; Wilson *et al.*, 1988; Johnsson y Björnsson, 1994; Jönsson *et al.*, 1996; Narnaware *et al.*, 2000). Se ha demostrado la existencia de una clara relación, a corto plazo, entre el estatus nutricional y los niveles plasmáticos de GH, así, por ejemplo, el carpín dorado exhibe una elevación aguda del nivel plasmático de GH 30 minutos después de ingerir alimento, aumento que es seguido de un abrupto descenso que continúa con un descenso gradual durante las siguientes 3 horas, hasta alcanzar niveles inferiores a los obtenidos en animales ayunados (Himick y Peter, 1995b). Así mismo, en peces a los que se reduce el tamaño de la comida, la GH plasmática aumenta su concentración, alcanzando sus valores máximos en peces ayunados, sugiriendo que los niveles elevados de GH podrían actuar como un factor estimulante del apetito (Pérez-Sánchez *et al.*, 1994; Peter y Marchant, 1995; Narnaware *et al.*, 2001a). Por el contrario, otros autores han descrito que los niveles plasmáticos de GH de peces ayunados pueden ser considerablemente menores que los niveles de peces alimentados (Shepherd *et al.*, 1997). Como ya se ha indicado, la inyección periférica de GH produce un aumento de la ingesta de alimento en peces. Por el contrario, su inyección central no produce cambio alguno en la ingesta de alimento en la trucha arco iris, sugiriendo que la GH actúa en el comportamiento alimentario indirectamente a través de una ruta periférica, mediante algún(os) factor(es) periféricos secundarios, más que por una acción directa central (Jönsson *et al.*, 2003). Por lo tanto, los mecanismos por los que la GH aumenta la ingesta de alimento en peces se desconocen, proponiéndose dos vías de acción principales: un efecto estimulador directo sobre el SNC, o una acción indirecta por estimulación de tejido periférico o cambios metabólicos, llevando señales de retroalimentación al cerebro, si bien, por el momento, esta última posibilidad no ha sido demostrada (De Pedro y Björnsson, 2001).

La GH está implicada en el metabolismo de los CH en teleósteos. Se ha descrito que dosis elevadas de GH producen hiperglucemia en peces, en parte debido a la estimulación de la gluconeogénesis (Leung *et al.*, 1991; O'Connor *et al.*, 1993; Mancera y McCormick, 1998; Mancera *et al.*, 2002). A su vez, la glucosa inhibe la liberación de GH (Rodgerds *et al.*, 1992), contribuyendo de este modo a la regulación de la concentración de glucosa plasmática. En relación con la movilización de lípidos, la GH estimula la lipólisis produciendo liberación de ácidos grasos y glucógeno, estimulando a su vez la gluconeogénesis tanto *in vivo* (Leatherland y Nuti, 1981) como *in vitro* (O'Connor *et al.*, 1993) en trucha arco iris.

Le Bail y Bœuf (1997) afirman que el control de la ingesta de alimento por GH puede ser el resultado del balance entre su acción periférica y su acción central, modificándolo en función del estatus nutricional del pez, de acuerdo con la siguiente hipótesis: durante la alimentación, o justo al principio de ésta, los elevados niveles de glucosa y ácidos grasos estimulan el centro de la saciedad e inhiben la liberación de GH, así como su acción central en la ingesta de alimento. El descenso de los niveles plasmáticos de ácidos grasos y glucosa, que se produce entre comidas o durante el ayuno, induce un aumento de la GH plasmática, aumentando la ingesta de alimento.

Factor del crecimiento similar a la insulina (IGF-I). Es un polipéptido de 70 aminoácidos, con una secuencia bien conservada entre las especies de peces, así como entre peces y mamíferos (Cao *et al.*, 1990; Reinecke *et al.*, 1997). En mamíferos la administración periférica de GH aumenta la ingesta de alimento, mientras que la administración central de IGF-I inhibe la alimentación (Foster *et al.*, 1991b). Se ha descrito que los efectos biológicos de la GH están mediados por IGF-I en teleósteos, así, cuando los niveles plasmáticos de GH son elevados, los niveles de IGF-I aumentan (McCormick *et al.*, 2000). Sin embargo, durante el ayuno prolongado se ha descrito que los niveles de GH aumentan (Björnsson, 1997), mientras que los sitios hepáticos de unión de GH y los niveles plasmáticos de IGF-I disminuyen (Pérez-Sánchez *et al.*, 1994), lo que sugiere que la GH aumenta durante los periodos de ayuno movilizando las reservas energéticas, mientras que la disminución de IGF-I minimiza el crecimiento celular (De Pedro y Björnsson, 2001).

El efecto de la IGF-I en los niveles plasmáticos de glucosa no parece claro. Mientras que en trucha común (*Salvelinus fontinalis*) su inyección produce hipoglucemia (Skyrud *et al.*, 1989), en trucha arco iris produce hiperglucemia (McCormick *et al.*, 1991) y en el fúndulo (*Fundulus heteroclitus*) no modifica los niveles de glucosa (Mancera y McCormick, 1998).

1.1.4.1.3. Insulina (Efectos a corto plazo)

En peces, la insulina contiene 51-58 aminoácidos y es secretada por el páncreas endocrino, que en muchas especies está organizado como un órgano discreto, el cuerpo de Brockmann extrapancreático (Mommensen y Plisetskaya, 1991). Es un importante regulador del metabolismo de lípidos, proteínas y carbohidratos, actuando como un regulador anabólico y aumentando las reservas de glucógeno, proteína y lípidos (Le Bail y Bœuf, 1997).

Los peces teleósteos han sido generalmente considerados como intolerantes a la glucosa, presentando, como consecuencia, una hiperglucemia prolongada (Palmer y Ryman, 1972; Blasco *et al.*, 1996, 2001; Wright *et al.*, 1998), habiéndose comprobado que la inyección conjunta de insulina y glucosa, en truchas ayunadas, promueve la hipoglucemia y aumenta la tolerancia a la glucosa (Palmer y Ryman, 1972). La ingesta de alimento aumenta la secreción de insulina, con niveles plasmáticos de insulina superiores, después de la alimentación, respecto de los niveles basales en trucha común (*Salmo trutta*) y arco iris (Blasco *et al.*, 1996, 2001; Capilla *et al.*, 2003). La glucosa estimula la secreción de insulina en varias especies de peces, siendo los aminoácidos los secretagogos más importantes, generando valores de insulina que tienden a ser más elevados que en mamíferos (Revisado en Mommensen y Plisetskaya, 1991). Así mismo, se ha observado que el ayuno prolongado, en comparación con la alimentación, normalmente extiende el periodo de hiperglucemia (Blasco *et al.*, 1996, 2001; Legate *et al.*, 2001). La trucha consigue optimizar la utilización de la glucosa ingerida mediante el aumento de los niveles plasmáticos de insulina en respuesta a una dieta con elevado contenido en CH (Baños *et al.*, 1998), y el aumento de insulina desencadena una elevación en el número de sus receptores en el músculo esquelético (Navarro *et al.*, 1999).

Los receptores para la insulina existen en el músculo esquelético de numerosas especies de peces (Gutiérrez y Plisetskaya, 1991), pero en un número inferior a los mamíferos, y en menor medida en especies carnívoras (salmónidos) que en especies herbívoras (tilapia) u omnívoras (carpa común) (Párrizas *et al.*, 1994a). El número de receptores parece estar regulado por el ayuno y la hiperinsulinemia, los cuales disminuyen el número de receptores en los hepatocitos de salmónidos (Plisetskaya *et al.*, 1993) y lampreas, así como el número de receptores en el músculo rojo de carpa común y trucha común (Baños *et al.*, 1997), sin embargo, en el caso de la hiperinsulinemia, los efectos parecen no ser homogéneos, e incluso diferir entre tejidos, apareciendo un aumento del número de receptores en hígado y músculo blanco de trucha arco iris y carpa común (Párrizas *et al.*, 1994b).

La intolerancia a la glucosa en peces podría ser debida, al menos parcialmente, a la baja actividad de la insulina o al reducido número de los transportadores y/o receptores (Navarro *et al.*, 1999).

En relación con la ingesta de alimento, se ha descrito un aumento en el consumo de alimento en tilapia, inducido por la administración de insulina en el agua mediante inmersión. Durante la primera parte del periodo postprandial, el potencial efecto estimulador de la ingesta por acción de la insulina es inhibido por el aumento de los niveles de glucagón, mientras que varias horas después de la ingesta de alimento, la relación glucagón/insulina disminuye lo suficiente para permitir el efecto estimulador de la ingesta (Chang y Lin, 1995).

Le Bail y Bœuf (1997) sugieren que la secreción de insulina es, al menos parcialmente, regulada positivamente por los CH y los aminoácidos circulantes. Así mismo, sugieren que el efecto orexigénico de la insulina a corto plazo podría ser debido al descenso de los CH plasmáticos.

1.14.2. Hormonas inhibidoras de la ingesta

1.14.2.1. Melatonina

La melatonina es una hormona derivada de la 5-HT (Reiter, 1991) (Figura 7). Fue aislada por primera vez del extracto de glándula pineal bovina por Aaron Lerner, quien la bautizó con este nombre a causa de su acción sobre los melanocitos de la piel de rana (Sanders *et al.*, 1998). Aunque originalmente fue descubierta en la glándula pineal, posteriormente se localizaron fuentes extrapineales de melatonina como la retina, las glándulas de Harder y el tracto gastrointestinal (Huether, 1994). La principal fuente extrapineal de melatonina es el tracto gastrointestinal, donde la concentración de melatonina exceden los 500 pg/g, mientras que en el suero de ratas alcanza una concentración nocturna de 40 pg/ml (Bubenik y Brown, 1997) a 100-180 pg/ml (Selmaoui *et al.*, 2001).

Se sabe que el ciclo luz oscuridad es el principal mediador de la producción de melatonina de origen pineal en peces (Falcón *et al.*, 1992; Iigo *et al.*, 1994; Zachmann *et al.*, 1992), apareciendo niveles plasmáticos bajos de melatonina asociados con la fase de iluminación y elevados con el periodo de oscuridad (Falcón *et al.*, 1992; Iigo *et al.*, 1994; Sánchez-Vázquez *et al.*, 1997). En relación con las estaciones también tienen

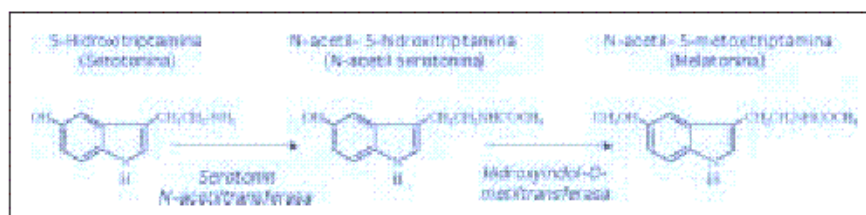


Figura 7. Síntesis de la melatonina a partir de su precursor, la serotonina.

lugar cambios en los niveles plasmáticos de melatonina, la duración de la elevación nocturna durante fotoperiodos cortos (invierno) es más larga que durante fotoperiodos largos (verano) (Iigo y Aida, 1995; García-Allegue *et al.*, 2001). En los peces, la melatonina, además de estar asociada a los ritmos diarios y estacionales, también está involucrada en la regulación de actividades neurales, endocrinas, reproducción, comportamiento migratorio (Zachmann *et al.*, 1992), pigmentación (Mårtensson y Andersson, 1996) y osmorregulación (Kulczykowska, 2002). En mamíferos se ha demostrado que está implicada en el crecimiento, desarrollo, maduración sexual, ciclo reproductivo, envejecimiento, inmunidad celular (Yu y Reiter, 1993), siendo además un potente antioxidante (Reiter *et al.*, 1996; 2000).

La presencia de melatonina en el tracto gastrointestinal ha sido demostrada por numerosos autores (Huether, 1994; Bubenik y Pang, 1997; Martín *et al.*, 1998; Van't Hof y Gwinner, 1999), además se han descrito sitios de unión de melatonina en el intestino de aves y mamíferos (Bubenik *et al.*, 1993; Pontoire *et al.*, 1993), llevando a pensar que dicha hormona puede estar implicada en los procesos de ingesta de alimento (Bubenik *et al.*, 1996; Martín *et al.*, 1998). Se ha postulado que la síntesis de melatonina por las células enterocromafines del intestino depende más de la presencia de nutrientes y del comportamiento alimentario (Huether, 1994; Bubenik *et al.*, 1996; Martín *et al.*, 1998) que del fotoperiodo, atribuyéndole funciones como desencadenante de los procesos digestivos esenciales para la apropiada utilización del alimento (Bubenik *et al.*, 1996), actuando como un factor paracrino y/o autocrino en el intestino (Van't Hof y Gwinner, 1999), y como protector de procesos fisiopatológicos en el tracto gastrointestinal (Pentney y Bubenik, 1995; Bubenik *et al.*, 1998). Se ha demostrado que la melatonina es un regulador de la motilidad gastrointestinal (Bubenik, 1986; Martín *et al.*, 1998) y de la ingesta de alimento en ratas (Huether, 1994), ratones (Bubenik y Pang, 1997), cerdos (Bubenik *et al.*, 1996), hámster (Bartness y Wade, 1985) y carpín dorado (Pinillos *et al.*, 2001) (Tabla 5).

La melatonina producida por el TGI puede ser liberada a la circulación periférica en mamíferos (Huether, 1994; Bubenik *et al.*, 1998). Así mismo, se ha descrito que los niveles plasmáticos de melatonina son inferiores a los observados en el TGI en vacas, cerdos (Bubenik *et al.*, 1999), ratas, (Bubenik y Brown, 1997), reptiles, anfibios y peces (Bubenik y Pang, 1997). El TGI presenta cambios rítmicos en el nivel de melatonina, llevando a pensar que la disponibilidad periódica de alimento puede proporcionar un mecanismo de sincronización circadiano (Van't Hof y Gwinner, 1999). La melatonina sería secretada en el segmento anterior del TGI en respuesta a la ingesta de alimento (Bubenik *et al.*, 1996), pudiendo actuar como una señal de regulación del apetito. Después la melatonina pasaría

Administración	Especie	Efecto en IA	Puente
Intraperitoneal	Carpin dorado	?	Pinillos <i>et al.</i> , 2001
Intracerebroventricular	Carpin dorado	=	Pinillos <i>et al.</i> , 2001
Intravenosa	Hámster siberiano	?	Bartness y Wade, 1985a
Intraperitoneal	Aves domésticas	?	Bermúdez <i>et al.</i> , 1983
Intravenosa	Hámster sirio	=	Bartness y Wade, 1985b
Intravenosa	Hámster siberiano	=	Bartness y Wade, 1985b
Bebida	Rata	=	Wolden-Hanson <i>et al.</i> , 2000
Intraperitoneal	Rata	=	Raghavendra y Kulkarni, 2000
Intravenosa	Rata	?	Shaji y Kulkarni, 1998
Intraperitoneal	Rata	?	Angers <i>et al.</i> , 2003
Implantes	Ratón	?	Bubenik y Pang, 1994

La disparidad de efectos encontrados podría estar relacionada con los hábitos alimentarios, nocturnos-diurnos, de las especies en las que se ha estudiado, momento de administración, etc.

Tabla 5. Efecto de la melatonina en la ingesta de alimento (IA).

a los segmentos posteriores del TGI, donde actuaría a través de sus receptores (Bubenik *et al.*, 1993), pudiendo intervenir como sincronizador de los procesos de alimentación y digestión (Martín *et al.*, 1998; Bubenik *et al.*, 1999).

La restricción alimentaria potencia la formación extrapineal de melatonina en el TGI (Bubenik *et al.*, 1992), habiéndose descrito que la restricción de alimento durante tres semanas disminuye los niveles pineales de melatonina, mientras que los aumenta en plasma y TGI, indicando que la melatonina plasmática durante la restricción alimentaria crónica procede en parte del TGI y que los cambios en el nivel circulante de melatonina son inducidos por el régimen alimentario (Huether, 1994). Por consiguiente, tanto la alimentación como el ayuno prolongado pueden aumentar los niveles de melatonina (Bubenik *et al.*, 1996). El aumento inducido por la alimentación podría desencadenar la secuencia de procesos digestivos esencial para la apropiada utilización del alimento, mientras que el aumento causado por el ayuno podría iniciar una reducción total en la actividad del tracto gastrointestinal (Bubenik *et al.*, 1996).

Como ya se ha indicado, la melatonina se forma a partir de su precursor, la 5-HT, la cual está implicada en el control cerebral del comportamiento alimentario, reduciendo la ingesta de alimento, tanto en mamíferos como en peces (De Pedro *et al.*, 1998b; Leibowitz y Alexander, 1998). Es plausible pensar que ambas sustancias estén interrelacionadas (Angers *et al.*, 2003), ya que la síntesis de melatonina pineal depende de la cantidad de 5-HT plasmática circulante, aumentando la síntesis y la concentración plasmática de melatonina, cuando se induce un aumento de la 5-HT plasmática (Huether *et al.*, 1993). Así mismo, se han descrito ritmos opuestos en los niveles cerebrales de melatonina y 5-HT, sugiriendo la influencia de ambas sustancias en la concentración de la otra (Bubenik *et al.*, 1992). Cuando los niveles cerebrales de 5-HT son relativamente altos al principio del periodo de oscuridad, los de melatonina son bajos, aumentando considerablemente conforme avanza la noche (Selmaoui *et al.*, 2001; Barassin *et al.*, 2002), mientras que los de 5-HT comienzan a declinar (Barassin *et al.*, 2002), de manera que la disponibilidad de 5-HT

determina la producción de melatonina por acción de la N-acetiltransferasa (Delgado *et al.*, 1993).

La melatonina podría regular el flujo espontáneo y la liberación evocada de 5-HT en el hipocampo (Monnet, 2002), así mismo, se ha comprobado que la administración intra-peritoneal de melatonina inhibe la liberación de 5-HT en el hipotálamo y cuerpo estriado de ratas (Chuang and Lin, 1994) y se ha postulado que la melatonina es un inhibidor natural de la 5-HT en el TGI (Bubenik *et al.*, 1992), presentando en el intestino una distribución característica que concuerda con la distribución de 5-HT (Bubenik y Dhanvantari, 1989). Probablemente, la melatonina actúa como un agonista competitivo de los receptores de 5-HT (Bubenik, 1986), concretamente de los 5-HT₂, pero en dosis elevadas podría actuar como un antagonista de dichos receptores (Sandyk y Kay, 1991). Se ha investigado la interacción entre la melatonina y los receptores 5-HT₂ en el SNC, en relación con la acción antidepresiva de la melatonina por su capacidad para disminuir la neurotransmisión mediada por 5-HT₂ (Eison *et al.*, 1995), pero su posible interacción en el TGI, o en relación con la ingesta de alimento, permanece sin dilucidar. Otro aspecto en el que se ha demostrado la interacción melatonina-5-HT es la motilidad intestinal. La melatonina restaura la motilidad intestinal en ratas, después de espasmos producidos por 5-HT y enlentece el tiempo de tránsito del alimento previamente reducido por 5-HT (Bubenik y Dhanvantari, 1989). La acción antagonista de la melatonina, sobre los cambios inducidos por la 5-HT en la motilidad intestinal, parece estar mediada por el SNC (Bubenik y Dhanvantari, 1989; Bubenik *et al.*, 1992), si bien los mecanismos implicados en los efectos de la melatonina en la motilidad gastrointestinal y la interacción melatonina-5HT no son totalmente entendidos (Martín *et al.*, 1998).

Recientemente, en la rata, se ha encontrado un efecto nutricional a corto plazo de la melatonina en la ingesta de dietas ricas en CH, sugiriendo una relación positiva entre el efecto estimulante de la melatonina sobre la ingesta de alimento y la cantidad de CH de la dieta. Así mismo, la melatonina aumenta la ingesta de CH en la rata al principio del periodo de alimentación (Angers *et al.*, 2003).

En peces la melatonina y 5-HT tienen un efecto inhibitorio de la ingesta en carpín dorado (De Pedro *et al.*, 1998b; Pinillos *et al.*, 2001). Por tanto, se podría especular que la melatonina podría emular la acción saciante de su precursor, a nivel cerebral y/o gastrointestinal, en peces.

1.1.4.2.2. Insulina, glucagón y péptidos similares al glucagón (GLPs)

Todas estas hormonas ejercen una influencia anabólica o catabólica en el metabolismo intermediario de peces, respondiendo al balance nutricional, por ejemplo, a los cambios postprandiales de glucosa (De Pedro y Björnsson, 2001).

La insulina no es la única hormona que puede alterar los niveles plasmáticos de glucosa en peces, pudiendo ejercer su acción también el glucagón, GLP, IGF, GH, somatostatina, cortisol y catecolaminas. Pero la relación entre insulina, glucagón y GLP no está tan bien definida en peces como en mamíferos y, de hecho, según Mommsen y Plisetskaya (1991), podría existir una disociación entre dichas hormonas.

Insulina. Es la principal hormona anabólica en peces, estimula la captación de glucosa y aminoácidos por el músculo esquelético e hígado, estimulando a su vez la síntesis proteica en estos tejidos; inhibe la glucogenolisis y la gluconeogénesis hepáticas, mientras que aumenta la incorporación de ácidos grasos en lípidos hepáticos (Plisetzkaya y Duguay, 1993). Aún así, el papel que desempeña el hígado en la tolerancia a la glucosa en peces no es tan claro como en mamíferos (Moon, 2001). Hay una tendencia a considerar la glucosa como el centro de acción de la insulina, lo que no parece muy apropiado en el caso de los peces, animales en los que los productos de almacenamiento principales son las proteínas y los lípidos (Mommson, 1998). Apoyando esta idea, se ha señalado la presencia de receptores para la insulina en el hígado de peces teleósteos (Navarro *et al.*, 1999), pero no se ha descrito la presencia de transportadores para la glucosa (GLUT). Una elevada concentración de glucosa plasmática podría reducir la producción hepática de glucosa en una forma insulino-dependiente, ya que si no se produciría un aumento exagerado de la glucosa plasmática (Zierler, 1999). En mamíferos se acepta la existencia de una represión de la glucosa-6-fosfatasa mediada por glucosa que ayuda a mantener una normoglicemia, pero en trucha arco iris no se ha podido encontrar dicha represión (Panzerat *et al.*, 2000), siendo necesarios estudios posteriores para determinar el papel que desempeña el hígado en la homeostasis de la glucosa en peces teleósteos (Moon, 2001).

Moon (2001) recopila las posibles explicaciones para la intolerancia a la glucosa de los peces (Figura 8), reduciéndolas a dos principales: (a) los niveles plasmáticos de insulina, y (b) la utilización periférica de la glucosa, que en mamíferos ha demostrado estar ligada a la presencia de receptores para la insulina y a transportadores para la glucosa.

Glucagón. Es un péptido de 29 aminoácidos, altamente conservado en los vertebrados, que en peces se sintetiza en el cuerpo de Brockmann, por la acción estimuladora de

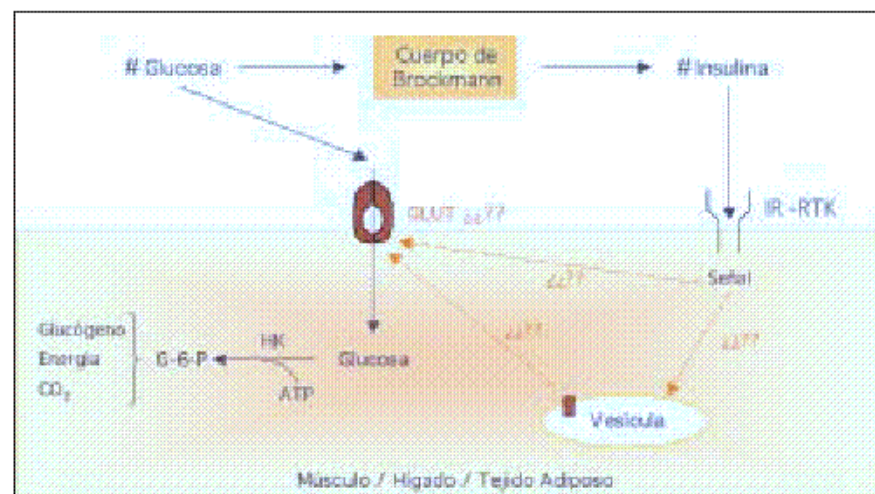


Figura 8. Resumen de las interacciones que acontecen en mamíferos entre la glucosa plasmática y la producción de glucosa en el músculo, hígado y tejido adiposo, señalando los aspectos que permanecen sin dilucidar en peces (representados en naranja). GLUT, transportador facilitado de glucosa independiente de Na; IR-RTK, receptor de insulina-receptor tirosin kinasa; HK, hexokinasa; G-6-P, glucosa-6-fosfato. (Redibujado de Moon, 2001).

los aminoácidos básicos, mientras que la glucosa inhibe su secreción (Hazon y Balment, 1998). Se ha descrito la presencia de receptores para el glucagón en los hepatocitos de dos especies de peces, receptores cuya densidad es regulada por la presencia del propio glucagón (Navarro y Moon, 1994).

La acción del glucagón es la opuesta a la acción de la insulina. Tanto en peces como en mamíferos, su principal efecto es aumentar la glucogenolisis y la gluconeogénesis hepáticas primando la hiperglucemia. También estimula la lipólisis en peces, provocando la acumulación de ácidos grasos y glicerol en el plasma y aumentando la excreción de amonio (Hazon y Balment, 1998).

El glucagón circulante aumenta como resultado de la ingesta de alimento tanto en peces como en mamíferos (Bray, 1993; Navarro *et al.*, 1993), habiéndose demostrado que la administración, central o periférica, de glucagón reduce la ingesta de alimento y la ingesta de P en mamíferos (Bray, 1993).

Péptido similar al glucagón (GLP). El GLP es un péptido de 31 residuos, que en peces es sintetizado en los cuerpos de Brockmann y en ocasiones en el TGI. No se ha descrito la presencia de receptores para el GLP en el hígado de los peces (Navarro *et al.*, 1999).

En peces, en contraposición a lo que sucede en mamíferos, el GLP actúa en el hígado como "super glucagón" (Le Bail y Boeuf, 1997), siendo los efectos fisiológicos del glucagón y el GLP en el hígado de peces virtualmente idénticos (Mommensen y Moon, 1990). Su principal órgano diana es el hígado, con poco o ningún efecto en el páncreas (Mommensen y Moon, 1989), donde estimula la glucogenolisis, la gluconeogénesis y la lipólisis, a través de receptores y segundos mensajeros (Hazon y Balment, 1998).

11.4.2.3. Leptina

En mamíferos la leptina ha sido ampliamente estudiada, y aunque es un importante regulador en otros procesos fisiológicos, como el inicio de la pubertad (Ahima *et al.*, 1997; Plant, 2001); la reproducción (Barash *et al.*, 1996; Chehab *et al.*, 1996); la formación de huesos (Ducy *et al.*, 2000; Karsenty, 2001); la angiogénesis (Bouloumie *et al.*, 1998), y la regulación del eje tiroideo (Kim *et al.*, 2000). La principal función estudiada es su efecto en la obesidad, a través de su papel en la regulación de la ingesta de alimento y en el metabolismo de los lípidos. Reidy y Weber (2000), en una revisión monográfica dedicada al papel de la leptina en el metabolismo de los lípidos, resumen los procesos en los que está implicada la leptina en su actuación sobre la lipólisis (Figura 9).

Como ya se ha indicado con anterioridad, la presencia de leptina o la expresión de su gen ha sido recientemente descrita en plasma, cerebro, corazón e hígado, pero no en tejido adiposo, de varias especies de peces (Johnson *et al.*, 2000); en estómago de trucha (Murúzabal *et al.*, 2002); plasma de lota (Mustonen *et al.*, 2002); tejido nefronal (más gónadas), intestino, músculo estriado y columna grasa de lamprea (Yaghoubian *et al.*, 2001), habiéndose observado que en situación de ayuno, los niveles circulantes de leptina disminuyen en *Lepomis cyanellus*, mostrándose una correlación positiva entre el porcentaje de grasa corporal y la concentración cerebral de leptina (Johnson *et al.*, 2000).

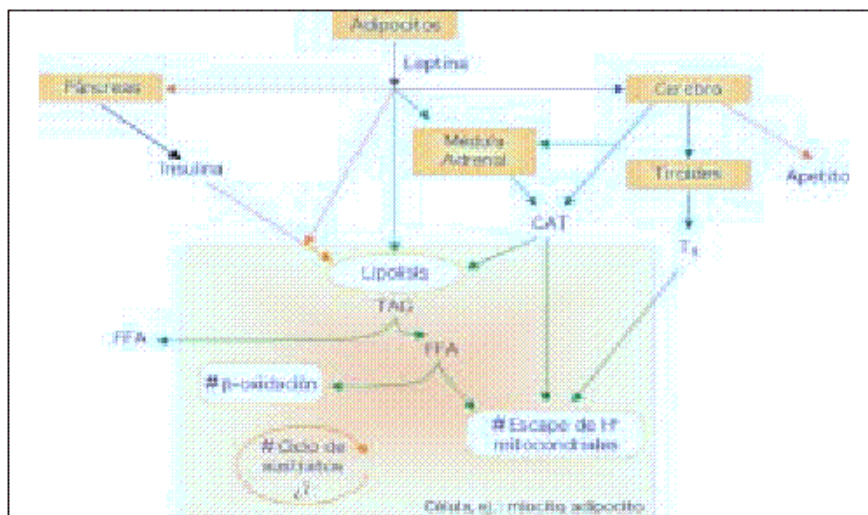


Figura 9. Esquema que representa las rutas a través de las que ejerce su acción la leptina sobre el metabolismo lipídico, gasto energético e ingesta calórica. Las líneas verdes indican un efecto estimulador de la leptina, mientras que las naranjas indican un efecto inhibidor. Aunque no se indica, el aumento de la oxidación y del escape mitocondrial de protones (H^+), inducidos por el aumento de leptina, también pueden estimular la lipólisis. TAG, triacilglicerol; FFA, ácidos grasos libres; CAT, catecolaminas; T_3 , tri-yodotironina.

Se ha observado que el tratamiento con leptina de mamíferos inhibe la ingesta de alimento (Volkoff *et al.*, 2003) e incrementa la inhibición de la ingesta de alimento inducida por CART, en el carpín dorado (Volkoff y Peter, 2001a); aumenta el metabolismo lipídico en *L. cyanellus* (Londrville y Duball, 2002), pero no produce efecto en la masa corporal o las reservas energéticas del salmón plateado (Baker *et al.*, 2000).

En relación con el papel de la leptina en peces, Johnson y colaboradores (2000), formularon la siguiente hipótesis: si la leptina sirve como un adipostático en mamíferos, y la concentración de leptina está positivamente correlacionadas con la grasa corporal, entonces la concentración de leptina también tendría que estar positivamente correlacionada en peces con el tamaño del tejido adiposo, si la leptina cumpliera una función similar en ellos. Como finalmente encontraron dicha correlación, sugieren que la leptina, al igual que sucede en mamíferos, debe actuar como marcador de la adiposidad en peces.

Se ha descrito que la administración periférica de leptina es menos efectiva que la central reduciendo la ingesta de alimento, tanto en mamíferos (Campfield *et al.*, 1995), como en peces (Volkoff *et al.*, 2003), sugiriendo que la acción reguladora del balance energético de la leptina tiene lugar principalmente en el cerebro (Volkoff *et al.*, 2003). Los mismos autores sugieren que, quizás en peces, vertebrados con un metabolismo más lento, la leptina pueda actuar predominantemente como un factor de saciedad, en lugar de comportarse como un regulador a largo plazo de la homeostasis energética. Se apoyaron para ello en la falta de efecto en el peso corporal y crecimiento del salmón (Baker *et al.*, 2000) y el *L. cyanellus* (Londrville y Duball, 2002), tras la administración periférica a largo plazo de leptina.

La administración de elevadas dosis de leptina, tanto central como periféricamente, inhibe la ingesta de alimento en el carpín dorado. Dosis muy bajas de leptina son suficientes para

suprimir los efectos orexigénicos del NPY y la orexina A en la ingesta de alimento en el carpín dorado (Volkoff *et al.*, 2003). Por lo que los autores sugieren una interacción funcional entre la leptina, el NPY y las orexinas en la regulación central del apetito. También sugieren que sus efectos sobre la ingesta son en parte mediados por CCK, debido a la fuerte interacción que encuentran entre la leptina y la CCK, al potenciar aquella los efectos anoréxicos de la CCK y aumentar la expresión hipotalámica de su ARNm. Por último, señalan la posible existencia de una compleja integración entre la regulación a largo plazo del balance energético por la leptina y las señales a corto plazo relacionadas con la comida procedentes del TGI.

1.1.4.2.4. Cortisol

El cortisol es el principal corticosteroide secretado por las células interrenales localizadas en la cabeza del riñón (Balm *et al.*, 1989; Patiño *et al.*, 1987), siendo el más abundante y activo en el plasma de los peces teleósteos (van der Boon *et al.*, 1991). Aunque la ACTH secretada por la hipófisis es el principal secretagogo del cortisol, la regulación endocrina de su secreción es compleja, participando en ella numerosos factores y hormonas de una forma indirecta. Las hormonas corticosteroideas son moléculas hidrofóbicas que circulan en el plasma unidas a proteínas y actúan como factores de transcripción por unión a secuencias de DNA específicas en los tejidos. En peces sólo se conoce un tipo de receptores para los corticosteroides, denominado GR que es del tipo II (receptor de glucocorticoides), no habiéndose descrito la presencia de receptores de tipo I (MR, receptor de mineralocorticoides) (revisado en Mommsen *et al.*, 1999).

Se ha sugerido que la fluctuación de la concentración plasmática de cortisol está asociada al fotoperiodo y la alimentación (Spieler y Noeske, 1984; Boujard *et al.*, 1993), así se ha observado un aumento pronunciado del cortisol circulante cuatro horas antes de la alimentación en carpín dorado (Spieler y Noeske, 1984), en el momento de la alimentación en trucha arco iris (Boujard y Leatherland, 1992a) y varias horas después de la alimentación en trucha arco iris (Boujard *et al.*, 1993). Cuando el pico de cortisol tiene lugar durante el periodo de alimentación no es posible saber si el aumento en la concentración de cortisol es debido a la alimentación o al efecto estresante de la competición por el alimento (Boujard y Leatherland, 1992b).

En los estudios realizados con cortisol hay que hacer una clara diferenciación entre los efectos agudos (corto plazo) y los tratamientos a largo plazo con cortisol, ya que, durante los tratamientos agudos, la concentración plasmática de cortisol aumenta rápidamente, dentro de un intervalo de tiempo que va de minutos a una hora, descendiendo de una forma gradual hasta alcanzar la concentración basal (Mommsen *et al.*, 1999). Por el contrario, durante un tratamiento a largo plazo, los peces parecen adaptarse a la fluctuación del cortisol plasmático dentro de un rango considerado como "normal", resultando en una elevación crónica (Mommsen *et al.*, 1999; De Boeck *et al.*, 2001).

En relación con la alimentación, se ha observado que la administración crónica de dosis bajas de cortisol (50 µg de cortisol /g de alimento) aumenta la ingesta de alimento en carpín dorado, mientras que con dosis elevadas (500 µg/g) no se aprecian cambios en la cantidad de alimento ingerido (Bernier *et al.*, 2004). Así mismo, se ha descrito que la

elevación crónica del cortisol plasmático reduce significativamente la ingesta de alimento en trucha arco iris, si bien también son observadas en dicho estudio una elevada tasa de agresión entre individuos y una elevada mortalidad, no pudiendo atribuir con certeza dicha reducción de la ingesta al efecto del cortisol (Gregory y Wood, 1999), además, la inyección i.p. de cortisol no produce un efecto agudo en la ingesta de alimento en el carpín dorado (De Pedro *et al.*, 1997). Los estudios sobre el posible efecto del cortisol en la ingesta de alimento en peces son reducidos y, una vez más, la variabilidad de resultados no permite asignar al cortisol un papel claro en la regulación de la ingesta de alimento.

En peces el cortisol ejerce su acción en el metabolismo intermediario (Mommsen *et al.*, 1999), movilizand las reservas de energía y produciendo un aumento de la gluconeogénesis, pudiendo derivar energía de los procesos anabólicos (De Boeck *et al.*, 2001). En general el cortisol aumenta la gluconeogénesis hepática, elevando la concentración plasmática de glucosa, además de incrementar la concentración de glucógeno hepático. En el músculo estimula la proteólisis y, por tanto, la concentración plasmática de aminoácidos. En los adipocitos y músculo rojo estimula la lipólisis, aumentando el glicerol y los ácidos grasos libres plasmáticos (Revisado en Mommsen *et al.*, 1999).

La mayoría de los trabajos concernientes al estudio del efecto del cortisol en el metabolismo de los CH se limitan a la liberación de glucosa plasmática y al contenido hepático de glucógeno, encontrando una gran variabilidad de resultados en función de la especie, estadio de desarrollo y situación fisiológica. En peces, tanto la concentración plasmática de la glucosa como la de glucógeno hepático sólo proporcionan una idea estática del estado fisiológico, la glucosa plasmática no se mantiene estable frente a perturbaciones externas, especialmente en peces carnívoros, y, además, ambas concentraciones pueden ser influidas por varios factores que pueden enmascarar un posible efecto del cortisol. Al igual que sucedía con el metabolismo de los CH, tanto en el metabolismo proteico como en el lipídico la gran variabilidad de resultados obtenidos no permite establecer una imagen clara del efecto del cortisol en dichos metabolismos, siendo necesarios estudios posteriores para intentar esclarecer los mecanismos por los que podría actuar (Revisado en Mommsen *et al.*, 1999).

Se ha propuesto que neuropéptidos como el NPY y el CRF podrían desempeñar un papel como mediadores de los efectos del cortisol en la ingesta de alimento en el carpín dorado, ya que la administración crónica de cortisol aumenta la expresión génica del NPY y disminuye la del CRF en el cerebro del carpín dorado (Bernier *et al.*, 2004).

1.1.5. Control metabólico de la ingesta

1.1.5.1. Precargas de Macronutrientes

Cuando a los animales se les da la opción de elegir entre varios tipos de alimentos, normalmente componen una dieta consumiendo varios de ellos en lugar de ingerir sólo uno (Rolls *et al.*, 1982). Esta preferencia por la variedad de alimentos puede ser debida a dos tipos de mecanismos no excluyentes: (a) la existencia de hambres específicas por nutrientes esenciales y (b) la aparición de una saciedad específica por el alimento que

está siendo consumido. Pero para que los animales puedan desarrollar hambres específicas necesitan tener la capacidad innata para diferenciar los nutrientes esenciales y/o ser capaces de asociar efectos postabsortivos con las propiedades orosensoriales de un alimento. Existen pruebas de que los animales pueden aprender a identificar los efectos postabsortivos de ciertos alimentos por su sabor-olor ("flavor"), así, por ejemplo, aprenden a evitar un sabor-olor asociado con la sensación de náuseas (García *et al.*, 1974); a elegir un sabor-olor asociado con su contenido calórico (Pérez *et al.*, 1996); a asociar un olor con el contenido proteico (Baker *et al.*, 1987; Simpson y White, 1990) y a asociar un color (Raubenheimer y Tucker, 1997) o una textura (Booth y Baker, 1990) con un macronutriente concreto, mediante aprendizaje asociativo.

La capacidad de los animales para seleccionar los nutrientes esenciales dentro del periodo de una comida no puede estar basada en las consecuencias metabólicas producidas por el alimento que está siendo ingerido, ya que no ha transcurrido tiempo suficiente para su total absorción o metabolismo. No obstante, puede ser debida a un aprendizaje asociativo, entre las consecuencias metabólicas de una comida previa con las propiedades orosensoriales de ese alimento concreto. Numerosas pruebas apoyan que los nutrientes entrantes en el intestino pueden producir un rápido efecto en la sensación de hambre (Greenberg *et al.*, 1990; Foster *et al.*, 1996) o saciedad (Lavin y Read, 1995). Además, los nutrientes en el intestino pueden interactuar con las propiedades orosensoriales de un alimento para afectar la saciación (Antin *et al.*, 1977), la tasa metabólica (Wang y Koopmans, 1995) y la selección de alimento (Pérez *et al.*, 1996).

La precarga de un nutriente es definida como una sustancia nutritiva que es administrada a un animal antes de que tenga acceso a la comida. Dicha precarga puede ser proporcionada de forma oral, por infusión intragástrica, intestinal, portal o periférica.

La acción de la precarga puede tener lugar de dos maneras diferenciadas: (a) a nivel orosensorial o (b) a nivel postingestivo.

Cuando una precarga es ingerida, parte de los efectos de esa precarga deben ser producidos por las características orosensoriales de la precarga. Diferentes nutrientes dentro de una clase definida de macronutrientes presentan sabores que son preferidos por los animales, así las ratas disminuyen su ingesta de CH cuando se les suministra fructosa, con respecto a la cantidad de CH que consumen cuando es sucrosa (Matsuno y Thibault, 1995). Pero cuando una precarga es infundida, las propiedades orosensoriales no participan en esos efectos, por lo que deben ser producidos por acciones postingestivas (Foster, 2000). Así mismo, existen pruebas de un aprendizaje asociativo entre las propiedades orosensoriales de un nutriente concreto y sus efectos postabsortivos (Baker *et al.*, 1987; Simpson y White, 1990; Sclafani *et al.*, 1993).

Las acciones postingestivas de los nutrientes en la ingesta de alimento son normalmente consideradas inhibitorias (saciación y saciedad), siguiendo un modelo clásico de retroalimentación negativa, en el cual la precarga de un macronutriente concreto puede interactuar con un receptor específico, que va a reducir la ingesta de ese nutriente concreto pero no de los restantes (Foster, 2000). Pero, pese a que esta teoría es comúnmente aceptada, no siempre se cumple, ya que en ocasiones la precarga no suprime la ingesta de ningún nutriente (Rolls *et al.*, 1988; Burggraf *et al.*, 1997), o suprime de forma

indiscriminada todos los nutrientes ofrecidos (Bartness y Rowland, 1983). No obstante, cuando una precarga suprime de forma diferencial la ingesta de alimento, el nutriente que más se suprime es el que tiene la composición más parecida a la precarga (Foster, 2000). Por el contrario, estudios recientes demuestran que las acciones postingestivas de la precarga pueden ser positivas y aumentar las preferencias alimentarias y la aceptación. Así cuando se empareja la infusión intragástrica de un nutriente concreto con la ingesta de una solución provista de un sabor-olor nuevo (condicionamiento positivo, C+), frente a una sustancia no nutritiva asociada a otro sabor-olor nuevo (condicionamiento negativo, C-) aumenta la ingesta de la solución con el C+ (Sclafani *et al.*, 1993). Sugiriendo que la retroalimentación postingestiva positiva y negativa causada por un nutriente está mediada por dos sistemas fisiológicos diferentes, de manera que las acciones reforzadoras y saciantes de los nutrientes no están necesariamente correlacionadas (Sclafani, 1997).

Se ha descrito la presencia de ciertos receptores en el TGI que poseen las características de los receptores del gusto, lo que indica la posibilidad de que los nutrientes que llegan al estómago sean diferenciados, al igual que ocurre en la boca mediante el sentido del gusto (Höfer *et al.*, 1996). Dichos receptores pueden interactuar eficazmente con nutrientes a lo largo de todo el intestino, enviando señales que producen la reducción de la ingesta de alimento y pueden prolongar la saciedad (Meyer *et al.*, 1998a,b).

Los efectos que producen las precargas de macronutrientes en la ingesta de alimento y en el patrón de selección de macronutrientes han sido ampliamente estudiados en mamíferos, apareciendo resultados contradictorios que no permiten establecer un patrón general común para los diferentes macronutrientes.

Precargas de carbohidratos. En general, las precargas de CH reducen la posterior ingesta de alimento, como puede observarse en la tabla 6, si bien en algunos casos no consiguen producir una reducción de la ingesta e, incluso, en términos de energía, llegan a aumentar la ingesta cuando se considera la precarga. Las diferencias observadas podrían

Precarga	Especie	Efecto en IA	Fuente
<i>Ingesta expresada en cantidad (g)</i>			
Intragástrica	Rata	?	Bartness y Rowland, 1983
Intragástrica	Rata	?	Van Zeggeren y Li, 1990
Intragástrica	Rata	?	Schwartz <i>et al.</i> , 1999b
Intestinal	Rata	=	Foster, 1997
Intestinal	Rata	?	Mayer <i>et al.</i> , 1998a
Intestinal	Rata	?	Trigezis <i>et al.</i> , 1999
Oral	Rata	=	Burton-Freeman <i>et al.</i> , 1997
Oral	Rata	?	Li y Anderson, 1982
Oral	Rata	?	Wenwick <i>et al.</i> , 2000
Intravenosa	Humanos	=	Chapman <i>et al.</i> , 1998
<i>Ingesta expresada en energía (cal)</i>			
Oral	Rata	= (?)	Rolls <i>et al.</i> , 1991
Oral	Rata	(?)	Burton-Freeman <i>et al.</i> , 1997
Intragástrica	Humanos	= (?)	Shide <i>et al.</i> , 1995
Intravenosa	Humanos	?	Chapman <i>et al.</i> , 1998

Valores dentro del paréntesis: incluyen la energía correspondiente a la precarga.

Tabla 6. Efecto de una precarga de carbohidratos en la ingesta de alimento (IA).

deberse a múltiples factores, como la composición de la precarga, la cual no siempre es especificada; el momento del periodo de alimentación en el que se proporciona la precarga, la cual tampoco se especifica en muchos casos; el tiempo de demora entre la precarga y la comida, o la vía de administración de la precarga.

En relación con el efecto de una precarga de CH en el posterior patrón de selección de macronutrientes, su administración, en general, disminuye la ingesta de CH, pero una vez más encontramos discrepancias en su efecto, como aparece reflejado en la tabla 7.

Precarga	Proteína	Carbohidratos	Grasa	Fuente
Intragástrica	=	?	(+35%)	Bartness y Rowland, 1983
Intragástrica	?~	? (+35%)*	-	Van Zeggeren y Li, 1980
Intragástrica	=	=	=	Shide <i>et al.</i> , 1985
Oral	? (+20%)~	?*	-	Li y Anderson, 1982
Oral		=	=	Rolls <i>et al.</i> , 1991
Intestinal	- ?	=		Foster, 1997
Intravenosa	=	=	=	Chapman <i>et al.</i> , 1998

Entre paréntesis aparece el incremento del porcentaje de inhibición respecto del otro macronutriente inhibido.

~ Dieta rica en P (proteína) (80% P); * Dieta rica en CH (73.5% CH).

Tabla 7. Efecto de una precarga de carbohidratos en la ingesta de macronutrientes.

Precargas de lípidos. Se ha sugerido que los lípidos (F), concretamente los ácidos grasos de cadena larga, son detectados en las paredes del intestino, desencadenando la liberación de CCK y 5-HT por las células enterocromafines y activando las terminales nerviosas aferentes vagales (Burton-Freeman *et al.*, 1999; Raybould, 1999). Se sabe que la presencia de F en el intestino reduce la ingesta de alimento y prolonga la saciedad postprandial (Drewe *et al.*, 1992; Burton-Freeman *et al.*, 1996, 1997, 1999; Meyer *et al.*, 1998a); que la precarga de F por infusión intravenosa es menos efectiva induciendo saciedad que la intrainestinal (Welch, 1985; Greenberg *et al.*, 1987, 1993; Rolls, 1995); también se conoce que la infusión intestinal de F produce la liberación de CCK endógena (Drewe *et al.*, 1992; Matzinger *et al.*, 1999), activando las aferencias vagales (Drewe *et al.*, 1992), efecto que es mediado por los receptores CCK-A (Burton-Freeman *et al.*, 1999; Matzinger *et al.*, 1999) y los receptores para la 5-HT (Burton-Freeman *et al.*, 1999). Todo ello parece indicar que la hipótesis mencionada al principio del párrafo, relativa al efecto de la precarga de F, podría ser cierta.

En general se puede afirmar que la precarga de F reduce de forma significativa la ingesta de alimento en mamíferos (Tabla 8).

Por otro lado, la precarga de F parece modificar el posterior patrón de selección de macronutrientes, su infusión gástrica disminuye la ingesta de F en un 90% y la de P en un 60%, permaneciendo inalterada la ingesta de CH (Bartness y Rowland, 1983).

Precargas de proteína. La administración de una precarga de P reduce la posterior ingesta de alimento (tabla 9) y la cantidad de todos los macronutrientes seleccionados, así, Bartness y Rowland (1983) encontraron que una precarga intragástrica de P reduce la ingesta de P en un 50%, la de CH en un 70% y la de F en un 60%. Así mismo, una precarga oral de P reduce más la ingesta de dietas con un alto contenido en P (60% de P)

Precarga	Especie	Efecto en IA	Fuente
<i>Ingesta expresada en cantidad (g)</i>			
Intragástrica	Rata	?	Bartness y Rowland, 1983
Intragástrica	Rata	=	Schwartz <i>et al.</i> , 1999b
Intestinal	Rata	?	Cox <i>et al.</i> , 2000
Intestinal	Rata	?	Mayer <i>et al.</i> , 1998a
Intestinal	Rata	?	Trigasiz <i>et al.</i> , 1999
Oral	Rata	?	Burton-Freeman <i>et al.</i> , 1997
Oral	Rata	?	Warwick <i>et al.</i> , 2000
<i>Ingesta expresada en energía (cal)</i>			
Oral	Rata	= (?)	Rolls <i>et al.</i> , 1991
Oral	Rata	(?)	Burton-Freeman <i>et al.</i> , 1997
Intragástrica	Humanos	= (?)	Shide <i>et al.</i> , 1995
Intestinal	Humanos	?	Metzinger <i>et al.</i> , 1999

Valores dentro del paréntesis: incluyen la energía correspondiente a la precarga.

Tabla 8. Efecto de una precarga de lípidos en la ingesta de alimento (IA).

que la ingesta de una dieta rica en CH (73.5% de CH), pero en ambos casos la ingesta se vio reducida (Li y Anderson, 1982).

Precarga	Especie	Efecto en IA	Fuente
<i>Ingesta expresada en cantidad (g)</i>			
Intragástrica	Rata	?	Bartness y Rowland, 1983
Intragástrica	Rata	?	Schwartz <i>et al.</i> , 1999b
Intestinal	Rata	?	Mayer <i>et al.</i> , 1998a
Intestinal	Rata	?	Trigasiz <i>et al.</i> , 1999
Oral	Rata	?	Burton-Freeman <i>et al.</i> , 1997
Oral	Rata	?	Li y Anderson, 1982
<i>Ingesta expresada en energía (cal)</i>			
Oral	Rata	(?)	Burton-Freeman <i>et al.</i> , 1997

Valores dentro del paréntesis: incluyen la energía correspondiente a la precarga.

Tabla 9. Efecto de una precarga de P en la ingesta de alimento (IA).

Para tratar de explicar los mecanismos por los que actúa la precarga de P, se ha sugerido la existencia de un hambre específica por P, intentando demostrar su existencia se provocó una preferencia condicionada por un sabor-olor de una solución no nutritiva asociándolo a la infusión gástrica de P. Cuando posteriormente se les infundía P, las ratas disminuían el consumo de la solución, mientras que cuando se les infundían gástricamente CH o una solución acalórica, los animales mantenían su ingesta de la solución asociada a P, mostrando una inhibición específica de la "ingesta de P" por la precarga de P (Baker *et al.*, 1987).

Interacción específica neuropéptido-nutriente. Como se ha indicado con anterioridad, los neuropéptidos regulan la ingesta de alimento tanto a nivel del tracto gastrointestinal como central, pero algunos de ellos se ha demostrado que sólo interactúan con nutrientes específicos (Buchan, 1999). Así, por ejemplo, la reducción de la ingesta de alimento que tiene lugar después de precargas de P es completamente bloqueada por el

pre-tratamiento con antagonistas de los receptores CCK-A, mientras que no bloquean la reducción de la ingesta inducida por precargas de aminoácidos, almidón y aceite de maíz, concluyendo los autores que existe una interacción específica entre el receptor CCK-A y la saciedad inducida por P en ratas (Trigazis *et al.*, 1997, 1999). La administración central de GLP-1 reduce la ingesta de alimento tras una precarga de CH, pero no tras una precarga de P, mientras tras una precarga de F produce una supresión transitoria de la ingesta (Choi y Anderson, 2001). Pero cuando se consideran los resultados obtenidos por otros autores, la interacción neuropéptidos-nutriente no parece tan sencilla, ya que se ha mostrado que la utilización de antagonistas de los receptores CCK-A también bloquea la reducción de la ingesta producida por una precarga de F (aceite de maíz) (Matzinger *et al.*, 1999) o rica en CH (banana: 95% CH, 4% P y 1% F) en humanos (Gutzwiller *et al.*, 2000).

11.52. Ayuno selectivo

En las últimas décadas, los estudios dedicados a los efectos de la privación de alimento "deprivation" y el hambre prolongada o "starvation" son numerosos. En teoría, debería ser sencillo atribuir cambios en la ingesta de alimento debidos a una intervención experimental que altere los mecanismos que controlan la ingesta de P, CH o F. Pero, aunque se han encontrado algunos hallazgos importantes, más oscuridad que luz ha sido arrojada sobre la verdadera naturaleza de los controles de la ingesta (Castonguay y Brown, 2000). Al igual que se ha señalado reiteradamente a lo largo de la presente introducción, Castonguay y Brown (2000) encuentran la bibliografía relativa a la selección de alimento repleta de contradicciones y generalizaciones erróneas, debido, en la mayoría de los casos, a la falta de control de todos y cada uno de los factores que pueden contribuir a la determinación de la selección de alimento. Factores que, en el caso de los peces, se ven incrementados por el hecho de vivir en un medio ambiente acuático. Cualquier cambio físico o químico de las propiedades del agua o medioambiental, puede inducir un resultado diferente en la selección de macronutrientes, al igual que lo deben producir diferencias en el estado fisiológico y nutricional de los animales, preferencias nutricionales previas, horario de alimentación, demora entre la administración de una sustancia y la alimentación, presencia o ausencia de sabor-olor, y etc. Consecuentemente, los resultados de cada experimento deben ser considerados exclusivamente como el desenlace de una serie de procesos que tienen múltiples controles, cualquiera de los cuales puede alterar el resultado final (Castonguay y Brown, 2000).

Los experimentos que pueden encontrarse en la literatura utilizan, en la mayoría de las ocasiones, los términos "deprivation", "starvation" y "fasting", indistintamente. Por ello, Castonguay y Brown (2000) pretenden diferenciar entre estos términos, definiendo "deprivation", privación, como la ausencia de alimento, o de un nutriente, por un periodo de tiempo inferior a tres días y "starvation", como la ausencia de un alimento, o nutriente, por un periodo superior a 48 horas. El termino "fasting", ayuno, se utiliza a menudo en los estudios de peces de una forma incorrecta, ya que no se especifica si se trata de un ayuno a corto plazo o a largo plazo en la especie estudiada, dando una información parcial que dificulta la interpretación de los resultados.

En el caso de los peces, que pueden sobrevivir durante meses sin alimento, y en los

que un periodo de ayuno forma parte del ciclo natural de vida de muchas especies (Navarro y Gutiérrez, 1995), los términos son más difíciles de restringir a un periodo temporal, debido a que lo que en una determinada especie constituye un periodo de privación, en otra supone un periodo de "starvation", dificultando el establecimiento de ambas categorías sin considerar la especie. Además, hay otros factores (estación del año, temperatura, fotoperiodo, edad del pez, desarrollo gonadal, época de reproducción...) que dificultan dicho establecimiento, así, por ejemplo, la movilización del glucógeno muscular está positivamente correlacionada con la temperatura. En la trucha común el glucógeno muscular disminuye significativamente al cabo de 8 días en verano, mientras que en invierno son necesarios 30 días para observar dicho efecto (Navarro *et al.*, 1992).

La principal ruta de utilización de glucosa suministrada por la dieta es la glicólisis, pero parte de glucosa ingerida va a acumularse en los tejidos del pez (Blasco *et al.*, 2001). Los CH principalmente se acumulan en los peces como glucógeno hepático (Kim y Kaus-hik, 1992; Navarro y Gutiérrez, 1995; Peres y Oliva-Teles, 1999a). Cuando el pez lo necesita, el glucógeno sufre glucogenolisis y es transportado a los tejidos extrahepáticos como glucosa. Cuando la glucosa llega a las células diana, puede ser metabolizada o reconvertida en glucógeno (Navarro y Gutiérrez, 1995). Los carbohidratos también pueden convertirse en proteína en los tejidos, acumulándose en mayor o menor medida en los diferentes tejidos. También puede convertirse parte de la glucosa en lípidos, pero el proceso de lipogénesis a partir de glucosa es un proceso muy lento y es el que se ve afectado principalmente por el ayuno (Blasco *et al.*, 2001).

Existe un acuerdo general en relación con que los lípidos almacenados son las primeras reservas que se movilizan durante la "starvation" (Sargent *et al.*, 1989; Shearer, 1994; Black y Love, 1986; Cook *et al.*, 2000). Los lípidos de la dieta se suelen acumular como grasa en las vísceras, pero los tejidos en los que se acumulan difieren entre especies (Navarro y Gutiérrez, 1995; Lanari *et al.*, 1999; Peres y Oliva-Teles, 1999a). Con independencia de su localización en los tejidos, durante el ayuno prolongado, acontece una movilización simultánea de los lípidos y los carbohidratos, pero siempre antes de que tenga lugar la degradación proteica (Navarro y Gutiérrez, 1995). Desde un punto de vista bioenergético, es más rentable catabolizar 1g de grasa, el cual libera aproximadamente el doble de energía, que 1g de proteína (Cook *et al.*, 2000).

Al principio del ayuno se evita el uso de las reservas proteicas, la proteolisis sólo tiene lugar una vez que las reservas de glucógeno hepático y de grasa han sido ampliamente consumidas. Diferentes tejidos pueden contribuir a la movilización de las proteínas, pero el músculo esquelético es el que contiene las mayores reservas y, por tanto, constituye la principal reserva proteica durante el ayuno prolongado (Navarro y Gutiérrez, 1995). Cuando las proteínas son utilizadas, no todas ellas lo son como reserva energética directa, algunas proteínas pueden ser convertidas a CH a través de la gluconeogénesis (Lauff y Wood, 1996; Peres y Oliva-Teles, 2002), para ser utilizadas como fuente de energía en el cerebro.

Tras un periodo de privación del alimento, los teleósteos presentan una fase compensatoria del crecimiento caracterizada por una hiperfagia (Miglav y Jobling, 1989; Ali *et al.*, 2001; Volkoff *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2003). Durante el crecimiento compensatorio se produce un crecimiento e ingesta de alimento superior al desarrollado por

animales no sometidos a privación de alimento (Jobling, 1994). Cuando a los peces se les da la opción de seleccionar macronutrientes, se ha observado que el ayuno total durante 2 semanas no altera el patrón posterior de selección de macronutrientes en la carpa común (Yamamoto *et al.*, 2003), no presentando una ingesta compensatoria de ningún macronutriente concreto.

Como se ha indicado con anterioridad, los conceptos de privación y "starvation" varían entre especies de peces. Dado que la especie utilizada, para estudiar el efecto de la privación de macronutrientes en la ingesta en la presente Tesis (Capítulo 5.4), fue la lubina, a continuación se profundizará en los efectos del ayuno en dicha especie.

La lubina es una especie que acumula las grasas de la dieta directamente como grasa perivisceral, perinefrítica, intermuscular e intramuscular, mientras que los carbohidratos aumentan el contenido en grasa del hígado, intermuscular e intramuscular (Lanari *et al.*, 1999). Es una especie con una elevada capacidad gluconeogénica, mostrando los animales alimentados con una dieta sin carbohidratos valores similares de glucemia que los alimentados con carbohidratos en la dieta (Peres y Oliva-Teles, 2002). Su glucógeno muscular disminuye poco después de permanecer 22 días en ayuno durante el verano (Gutiérrez *et al.*, 1991). Como ya se ha indicado, sus depósitos de grasa se acumulan principalmente como grasa mesentérica, por lo que el ayuno durante 22 ó 130 días no produce disminución de la grasa muscular o hepática (Stirling, 1976; Gutiérrez *et al.*, 1991), mientras que los depósitos intestinales disminuyen un 41%, respecto del control, después de 15 días de ayuno (Gutiérrez *et al.*, 1991).

Echevarría y colaboradores (1997) encontraron dos fases diferenciadas por los procesos metabólicos en la "starvation" de la lubina, con un punto de inflexión a los 50 días. Durante la primera fase predomina la movilización de las reservas energéticas, mientras que en la segunda fase se movilizan las reservas estructurales globales.

Tras una privación de alimento de 6 días, la lubina muestra hiperfagia, aumentando la ingesta de energía, pero no modifica su patrón de selección de macronutrientes. Pero cuando después de 6 días de realimentación, se la somete a un segundo periodo de ayuno de 15 días, durante el nuevo periodo de realimentación, además de presentar una ingesta compensatoria, muestra un hambre específica por la P, aumentando significativamente su porcentaje de selección durante los dos primeros días de la realimentación (Aranda *et al.*, 2001).

En la lubina, el ayuno de CH, suministrándoles una dieta compuesta por P-F (63 y 18%) durante 56 días, produce una disminución de la ingesta de alimento y energética; disminuye el glucógeno hepático y del pez completo; aumenta el contenido hepático de lípidos mientras que mantiene el contenido lipídico del músculo inalterado (Peres y Oliva-Teles, 2002). Así mismo, el ayuno de P y el de F, utilizando dietas compuestas por CH-F (37 y 37%) y P-CH (55 y 19%), respectivamente, disminuye la ingesta de alimento y de energía. Durante la fase de realimentación la lubina no modifica el patrón de selección de macronutrientes, no apareciendo hambres específicas por la P, después de 2 semanas de privación, o por la F, después de 3 semanas de privación (Vivas *et al.*, 2003).

El ayuno produce cambios en la expresión cerebral de algunos neuropéptidos; así, aumenta la expresión de NPY (Silverstein *et al.*, 1998; Narnaware *et al.*, 2000), disminuye

la de CART (Volkoff *et al.*, 1999) y mantiene inalterada la de CCK (Volkoff *et al.*, 2003) en el carpín dorado. Además, cuando se les inyecta i.c.v. leptina o CCK, durante la realimentación disminuye la ingesta con respecto a los animales ayunados sin tratamiento; cuando se les inyecta i.c.v. leptina más CCK, la ingesta es menor que la de los carpines a los que se les suministró sólo CCK (Volkoff *et al.*, 2003). Todo ello sugiere que algunos neuropéptidos podrían regular la realimentación. No obstante, en el caso de la CCK, la falta de variación en su expresión génica durante el ayuno quizás sea debida a la naturaleza reguladora a corto plazo de este péptido (Volkoff *et al.*, 2003).

1.16. Influencia de los factores ambientales en la ingesta

El crecimiento y la ingesta de alimento están controlados por factores internos que implican al SNC y a los sistemas endocrino y neuroendocrino, y por factores externos de origen medioambiental como la temperatura, iluminación, disponibilidad de oxígeno, de alimento, presencia de competidores, de depredadores, etc. (Figura 10). Muchos factores medioambientales son específicos del medio acuático, como la salinidad, nivel de oxígeno, compuestos nitrogenados, pH, etc. Se ha demostrado que todos ellos están implicados en el proceso de la alimentación, bien en uno de los pasos o, como sucede con la temperatura, en varios de los procesos que intervienen en la alimentación, ya que la temperatura está implicada en la disponibilidad de presas, probabilidad de captura y en los procesos de digestión, absorción y transformación de nutrientes.

A continuación se procederá a detallar algunos de los factores medioambientales del medio acuático que influyen en la ingesta total de alimento, ya que hasta el momento no se ha estudiado su posible influencia en el patrón de selección de macronutrientes en peces.

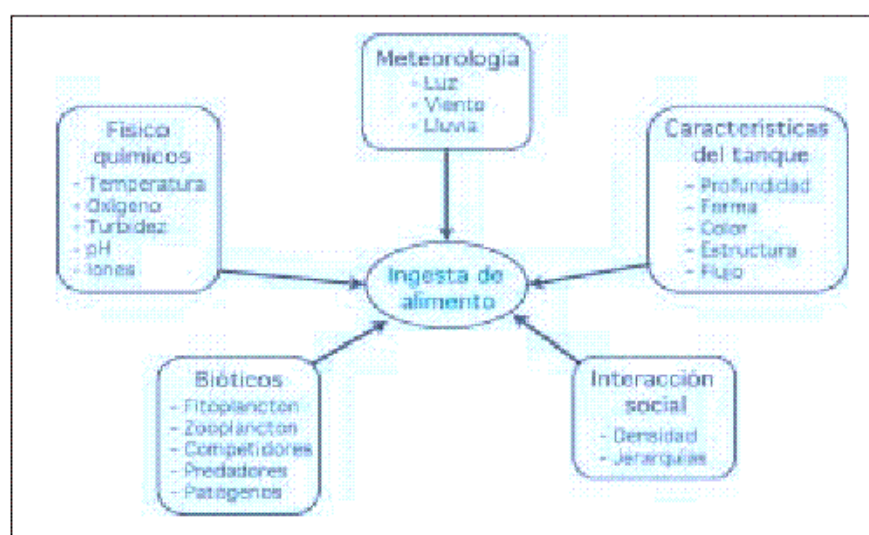


Figura 10. Factores medioambientales que influyen la ingesta de alimento en los peces. Los factores han sido agrupados en unidades funcionales (Redibujado de Kestemont y Baras, 2001).

1.1.6.1. Factores abióticos

Los principales en el medio acuático son la iluminación, temperatura, oleaje y corrientes, oxígeno, pH, salinidad, etc.

1.1.6.1.1. Iluminación

La principal fuente de luz es el Sol, pero existen otras fuentes secundarias de iluminación como son la Luna, estrellas y la procedente de organismos bioluminiscentes. El término iluminación comprende la intensidad luminosa (cantidad de luz), el espectro luminoso (longitud de onda) y el fotoperiodo (periodicidad). La luz (intensidad, espectro y fotoperiodo) es un parámetro extremadamente variable y puede cambiar, dentro de un amplio rango, de una forma muy rápida, afectando al crecimiento de los peces (Bœuf y Le Bail, 1999).

Fotoperiodo. Los animales no se alimentan durante las 24 h del día, sino que seleccionan un periodo de iluminación, el día o la noche, para alimentarse, pudiendo clasificarse en general como diurnos o nocturnos. Entre los peces podemos encontrar tanto especies diurnas como nocturnas como crepusculares (Thorpe, 1978), además de especies duales (Sánchez-Vázquez et al., 1998a) (Figura 11). Las especies duales son aquellas capaces de alimentarse tanto durante el periodo de iluminación, como durante el periodo de oscuridad, como por ejemplo la lubina y el salmón Atlántico, dos especies de comportamiento predominantemente nocturno durante el invierno y diurno durante el resto del año (Jobling et al., 1993; Fraser y Metcalfe, 1997; Sánchez-Vázquez et al., 1998a).

La ingesta de alimento ha sido ampliamente estudiada en el salmón del Atlántico, observando un comportamiento alimentario predominantemente diurno según algunos autores, catalogándolos como comedores diurnos, pero a menudo estos estudios excluyen observaciones de la ingesta de alimento durante la fase de oscuridad (Jørgensen y Jobling, 1992; Smith et al., 1993; Paspatis y Boujard, 1996). Por el contrario, otros autores han descrito un aumento de la ingesta de alimento preferentemente durante la escotofase (Fraser et al., 1993, 1995; Fraser y Metcalfe, 1997; Admundsen et al., 1999), pudiendo exhibir una alimentación exclusivamente nocturna durante el invierno (Admundsen et al., 1999). Dicho cambio de preferencia de fase del fotoperiodo parece estar ligado al descenso de la temperatura, ya que en condiciones naturales, cuando desciende la temperatura, el salmón cambia su comportamiento alimentario, prefiriendo ingerir alimento en la fase de oscuridad (Jørgensen y Jobling, 1992; Fraser et al., 1993, 1995; Fraser y Metcalfe, 1997; Admundsen et al., 1999, 2000). Como se ha indicado con anterioridad, esta inversión de comportamiento alimentario, caracterizado por una ingesta de alimento predominantemente nocturna durante el invierno y la primavera y preferentemente durante la fotofase en verano y otoño, tiene lugar también en otras especies, como la lubina, la trucha alpina y la trucha arco iris (Jobling et al., 1993; Boujard et al., 1995; Gelineau et al., 1996; Sánchez-Vázquez et al., 1995, 1998a).

Hay algunas especies en las que parece ser que la ingesta de alimento tiene lugar exclusivamente en una de las fases del fotoperiodo, durante la fase de iluminación, como el rodaballo (*Psetta maxima*), la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) y el pámpano amarillo

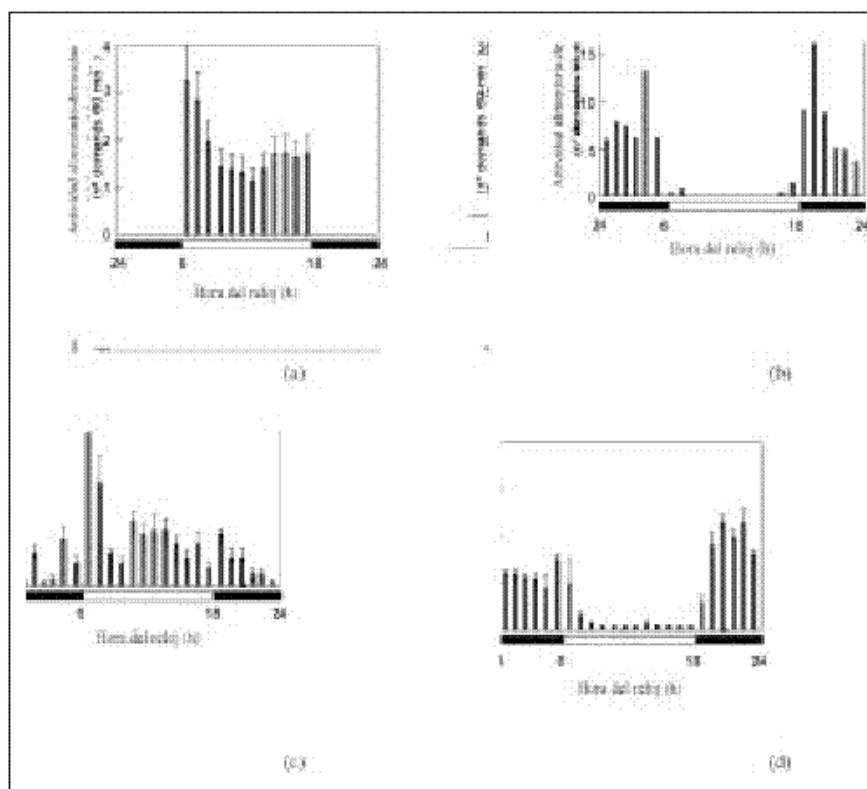


Figura 11. Patrones diarios de demandas de alimento de tres especies de peces mantenidas bajo condiciones de laboratorio de fotoperiodo artificial (L:D, 12:12). Las barras horizontales vacías y rellenas situadas debajo de cada gráfica representan las fases de iluminación y oscuridad, respectivamente. A) trucha arco iris, mostrando un patrón diurno (redibujado de Sánchez-Vázquez & Tabata 1998). B) atipa, *Hoplosternum littorale*, un pez nocturno (redibujado de Boujard et al. 1990). C, D) lubina, una especie con dualidad de fase en la cual se puede observar ambos comportamientos alimentarios diurno y nocturno (redibujado de Sánchez-Vázquez et al. 1995).

(*Trachinotus carolinus*); o durante la fase de oscuridad, como la mayoría de las especies de pez gato (Boujard, 1995; Boujard y Luquet, 1996; Burel et al., 1997; Toguyeni et al., 1997; Heilman y Spieler, 1999).

El fotoperiodo puede influir tanto la cantidad de alimento ingerido, como la duración del periodo de alimentación. Algunos autores observaron en salmónidos que conforme aumentaba la duración de la fase de iluminación en el fotoperiodo, se estimulaba la ingesta alimentaria, mientras que, por el contrario, cuando se acortaba dicha fase, la ingesta de alimento disminuía (Saunders et al., 1989; Stefanson et al., 1990; Jørgensen y Jobling, 1992). En lubinas diurnas, cuando se acortó el periodo de iluminación desde 12h a 0,25 h, los peces prefirieron alimentarse mayoritariamente durante la fase de iluminación, mientras que por el contrario, cuando las lubinas eran nocturnas y se extendió el periodo de iluminación desde 12 h hasta 23,75 h, los animales prefirieron ingerir alimento durante el periodo de oscuridad, es decir, la lubina prefiere alimentarse en una fase concreta del fotoperiodo, ya sea la fase de iluminación o la de oscuridad, y la manipulación de dicha fase por extensión o compresión, no consigue forzar una inversión en el comportamiento

alimentario, restringiendo el mayor número de demandas de alimento a la fase del fotoperiodo en la que preferían alimentarse inicialmente (Aranda *et al.*, 1999a).

Utilizando comederos a demanda ha sido descrita una distribución temporal, relacionada con el fotoperiodo, en la ingesta de macronutrientes por el carpín dorado. Se observó que prefieren ingerir CH durante el periodo de iluminación, P al principio de la fase de oscuridad y F en la transición entre las fases de iluminación y oscuridad (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1998b). Pero se desconocen los mecanismos de actuación por los cuales el fotoperiodo produce un efecto en la selección de macronutrientes, una posible explicación son los cambios hormonales que tienen lugar a lo largo del día.

El fotoperiodo se ha determinado que regula la concentración plasmática de ciertas hormonas, algunas de las cuales han mostrado estar implicadas en la regulación de la ingesta de alimento en mamíferos y peces, y en la selección de macronutrientes en mamíferos. Durante la fase de oscuridad, los niveles de melatonina en plasma son más elevados que durante el periodo de iluminación (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1997; Iigo *et al.*, 1998; García-Allegue *et al.*, 2001). Además, el perfil diario de melatonina plasmática sigue un patrón estacional. Se ha observado que durante los meses de otoño-invierno, en los que la escotofase es más amplia, aumenta la duración de los niveles elevados de melatonina, si bien la concentración máxima de melatonina es menor que la que se observa durante los meses de primavera-verano, en los que la escotofase es más restringida, y por tanto la duración de los niveles elevados de melatonina son más cortos (Iigo y Aida, 1995; García-Allegue *et al.*, 2001). Así mismo, el fotoperiodo también influye en la concentración plasmática de GH, ya que conforme aumenta la duración de la fase de iluminación, aumenta la concentración de GH en plasma (Boeuf *et al.*, 1989; Prunet *et al.*, 1989; Björnsson *et al.*, 1989, 1995; Björnsson, 1997; McCormick *et al.*, 1995). Las concentraciones de TH también son modificadas por el fotoperiodo, apareciendo variaciones diarias de los niveles de T_4 en función del fotoperiodo y el régimen de alimentación y pudiendo aparecer o no variaciones diarias de menor amplitud en la concentración de T_3 (Boujard y Leatherland, 1992a; Gómez *et al.*, 1997).

Intensidad y espectro luminoso. El efecto de la intensidad de la luz en la tasa de crecimiento en peces ha recibido una considerable atención (Brett, 1979). Se ha observado que las larvas de diferentes especies de peces requieren un umbral mínimo de iluminación para desarrollarse normalmente y crecer (Gehrke, 1994; Daniels *et al.*, 1996; Denson y Smith, 1997). La lubina es una especie que presenta una correlación lineal de su crecimiento y eficacia alimentaria respecto a la intensidad de iluminación, dentro de un rango comprendido entre 3,5-69,5 lux (Hidalgo *et al.*, 1993).

Se ha descrito que el salmón Atlántico es capaz de ingerir alimento en completa oscuridad (0,0 lux) (Jørgensen y Jobling, 1992; Fraser y Metcalfe, 1997; Admundsen *et al.*, 1999), exhibiendo la mayor ingesta de alimento con este nivel de iluminación. Por el contrario, la trucha arco iris se había sugerido que sólo se alimentaba durante la fotofase porque era incapaz de alimentarse en oscuridad absoluta, comiendo de noche sólo cuando la luz de la luna y de las estrellas le permitían localizar y activar el comedero (Boujard y Leatherland, 1992c), pero cuando se las mantiene con una luz constante de baja intensidad (LL_{0M}), la cantidad de alimento ingerido disminuye drásticamente (Sánchez-Vázquez y

Tabata, 1998). La lubina es capaz de alimentarse eficazmente en completa oscuridad (0,0 lux), cuando el alimento permanece en el fondo del tanque durante unos minutos (Rubio et al., 2003a).

Los cambios en la intensidad luminosa parecen ser eficaces en inducir inversiones del comportamiento alimentario en algunas especies, ya que se ha descrito en el *Ictalurus nebulosus*, que con elevadas intensidades luminosas son nocturnos, mientras que con reducidas intensidades son diurnos (Eriksson, 1978).

En la lubina, la intensidad luminosa se ha observado que puede inhibir o estimular los niveles plasmáticos y oculares de melatonina, respectivamente, con un nivel umbral mínimo de $6 \text{ } \mu\text{W cm}^{-2}$. La concentración de melatonina en el ojo aumenta conforme aumenta la intensidad luminosa, mientras que en el plasma disminuye. Así mismo, se ha determinado que la longitud de onda correspondiente al color azul del espectro luminoso es la más efectiva en producir el aumento ocular y la disminución plasmática de melatonina (Bayarri et al., 2002).

Se ha observado que el espectro luminoso no afecta al crecimiento del salmón Atlántico, en uno de los pocos estudios encaminados a dilucidar este aspecto (Stefansson y Hansen, 1989).

1.16.12. Temperatura

La temperatura es el principal factor medioambiental que determina los requerimientos metabólicos de alimento, ya que gobierna la tasa de reacciones metabólicas afectando todos los procesos fisiológicos en animales ectotermos, como el metabolismo, la ingesta de alimento y la eficiencia nutricional, así como la tasa de vaciado gástrico (Brett, 1979; Burel et al., 1996). Entre ciertos límites, conforme la temperatura aumenta, los procesos metabólicos aumentan exponencialmente en los peces (Fry, 1971), relación que ha sido constatada mediante la observación de la variación diaria del consumo de oxígeno y excreción de nitrógeno en fletán del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) y rodaballo (Imslund et al., 2000a, 2000b, 2001a; Jonassen et al., 2000a). Los incrementos de temperatura producen un aumento de la demanda de alimento en paralelo al aumento de la tasa metabólica, a la vez que aumentan la velocidad de tránsito del alimento a través del digestivo (Brett, 1979; Burel et al., 1996).

Los peces, en general, son animales ectotermos que no regulan su temperatura corporal, fluctuando su temperatura con la medioambiental. A menudo son clasificados en euritermos y estenotermos de agua cálida o de agua fría. Los euritermos son aquellos que toleran grandes cambios de temperatura, mientras que por el contrario los estenotermos son aquellos que tienen un rango de tolerancia restringido (Kestemont y Baras, 2001).

Se ha descrito la existencia de temperaturas límite, tanto superiores como inferiores, por encima o debajo de las cuales, respectivamente, los peces no ingieren alimento (Brett, 1979; Elliott, 1991; Burel et al., 1996; Buentello et al., 2000). No obstante, estas temperaturas límite para la alimentación pueden ampliarse con una aclimatación progresiva a la temperatura (Elliott, 1991).

La ingesta de alimento por los peces aumenta conforme aumenta la temperatura, mostrando una relación positiva dentro de un rango, disminuyendo de una forma más o

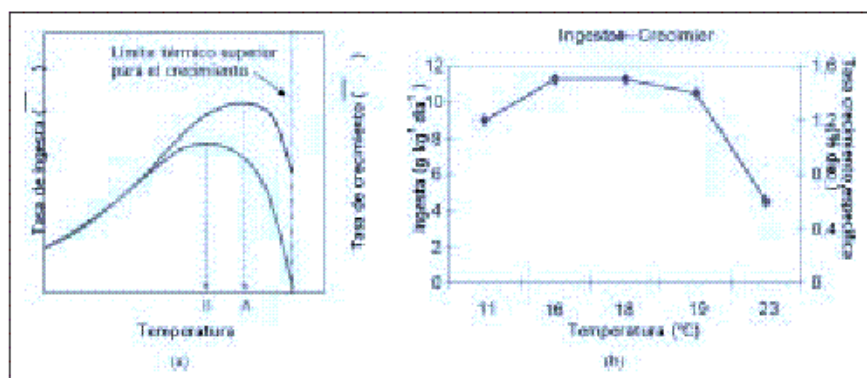


Figura 12. Efecto de la temperatura en la tasa de ingesta de alimento y en la tasa de crecimiento: (a) la temperatura a la cual tiene lugar la mayor tasa de ingesta de alimento (A) es unos grados superior a la temperatura a la cual se obtiene el mayor crecimiento (B) (Modificado de Jobling, 1997); (b) ejemplo en el cual se puede observar como la mayor tasa de crecimiento tiene lugar a 16 °C frente a la mayor tasa de ingesta de alimento a 18 °C en *Salmo salar* (Redibujado de Koskela et al., 1997).

menos dramática cuando se alcanza una temperatura supraóptima (Fry, 1971; Brett, 1979; Elliott, 1991; Burel et al., 1996; Buentello et al., 2000). La temperatura a la cual la ingesta de alimento es máxima suele ser unos grados superior a la temperatura a la cual se obtiene el mayor crecimiento (Figura 12) (Brett, 1971; Jobling, 1997; Koskela et al., 1997; Buentello et al., 2000). No obstante, los peces continúan alimentándose a temperaturas que exceden la temperatura a la cual alcanzan la máxima ingesta de alimento, así, por ejemplo, el salmón del Atlántico continúa comiendo hasta que la temperatura alcanza cotas de 28-29°C, mientras que su ingesta de alimento máxima tiene lugar a 16-18°C (Koskela et al., 1997).

Un descenso de la temperatura produce cambios en el comportamiento alimentario de algunas especies de peces, aumentando el comportamiento alimentario nocturno (Fraser et al., 1993, 1995), mientras que en otras especies, la temperatura *per se* no es capaz de inducir cambios, como por ejemplo en la lubina (Aranda et al., 1999b).

La temperatura modifica la selección de macronutrientes en algunas especies, así se ha observado que la carpa común selecciona dietas ricas en P y ricas en F (38% P; 40% G y 22% C) a 17°C, mientras que a 25°C selecciona dietas ricas en P (55% P; 21% G y 24% C) (Yamamoto et al., 2003). La cantidad de P seleccionada por la carpa común disminuye conforme se disminuye la temperatura, si bien la P seleccionada se mantuvo constante cuando la temperatura se redujo de 17 a 8°C (Yamamoto et al., 2001). La lubina aumenta su ingesta de P a 25°C respecto a la ingerida a 18°C (Peres y Oliva-Teles, 1999b) y la trucha arco iris no modifica la selección de macronutrientes con los cambios de temperatura, prefiriendo una dieta rica en P a una rica en F o CH, independientemente de la temperatura (Yamamoto et al., 2001).

Se ha observado que en la dorada, con el descenso brusco de la temperatura del agua, la concentración plasmática de cortisol, ACTH y glucosa aumentan, mientras que disminuyen los de GH y α -MSH y permanecen inalterados los de lactato, disminuye el nivel de cortisol en el riñón y de ACTH y α -MSH en la hipófisis (Rotllant et al., 2000). La

temperatura afecta claramente al perfil postprandial de glucosa e insulina en trucha arco iris, los cuales son menores a 8°C que a 18°C, manteniéndose elevados durante más tiempo a 8°C, probablemente debido al retraso de la velocidad de tránsito del alimento (Capiella *et al.*, 2003).

1.16.13. Otros factores físicos

Otros factores físicos, como el oleaje, las corrientes de agua, las mareas, el viento y la lluvia también pueden ejercer su influencia en la ingesta de alimento.

Oleaje. Tanto la frecuencia como la altura de las olas pueden influir en la alimentación de los peces, así se ha observado que la trucha arco iris cesa su ingesta de alimento cuando la frecuencia de las olas aumenta por encima de 0,28 Hz (Srivastava *et al.*, 1991). El oleaje debido a las tempestades en lugares como los rompientes de playas con fondos arenosos influyen en los ritmos de alimentación de la lubina (Pickett y Pawson, 1994), comprobándose que los periodos de mayor ingesta de alimento coinciden con los de tempestad (Barnabé, 1991).

Corrientes de agua. La velocidad de la corriente de agua ejerce un efecto en la alimentación de los peces, ya que si la velocidad de la corriente es elevada la capacidad para capturar el alimento se ve reducida (Flore y Keckeis, 1998), mientras que una velocidad moderada puede mejorar la alimentación (Christiansen y Jobling, 1990; Jørgensen *et al.*, 1996). Se ha comprobado que los peces que realizan ejercicio, en corrientes de agua con una velocidad moderada, consumen una mayor cantidad de alimento (Jørgensen y Jobling, 1993).

Viento. La intensidad del viento modifica otros parámetros, así una elevada intensidad modifica el nivel de oxígeno aumentándolo (Boyd y Teichert-Coddington, 1992), aumenta la turbidez del agua y genera corrientes (Howerton y Boid, 1992), parámetros todos ellos que intervienen en la ingesta de alimento. Así mismo, la dirección del viento también puede condicionar la ingesta de alimento. En el rodaballo y la lubina, se ha comprobado que la ingesta de alimento aumenta cuando el viento procede del mar con respecto a la ingesta que tiene lugar cuando el viento sopla desde tierra (Bégout Anras, 1995; Mallekh *et al.*, 1998), no obstante la posible causa de este fenómeno se desconoce.

Lluvia. La lluvia inhibe la ingesta de alimento y aumenta la actividad locomotora de los peces (Bégout Anras, 1995). Una lluvia intensa produce estratificación del agua, modifica la temperatura del agua (Bégout Anras *et al.*, 2001) y aumenta la cantidad de oxígeno disuelto (Bégout Anras, 1995), afectando por ello la ingesta de alimento. Así mismo, la lluvia y el oleaje pueden provocar movimientos verticales de los peces dentro de la columna de agua, haciéndolos desplazarse desde la superficie del agua a profundidades mayores, afectando a la ingesta de alimento al restringir la distribución de los peces a ciertas zonas de la columna de agua (Juell, 1995). Otra de las posibles causas de la disminución de la ingesta de alimento debida a la lluvia y el viento es el ruido que producen ambos factores (Lagardère *et al.*, 1994).

11.6.1.4. Factores químicos

El oxígeno, los compuestos nitrogenados y el pH son factores que en ciertas cantidades resultan letales para los peces, pero los efectos de sus niveles subletales en la ingesta de alimento han sido investigados en pocas ocasiones.

Oxígeno. El nivel de oxígeno en peces mantenidos en cultivo intensivo es un factor muy importante ya que los peces presentan un metabolismo predominantemente aerobio, por lo que el oxígeno es un factor potencialmente limitante (Fry, 1971), especialmente cuando la temperatura es elevada (Jobling 1997). Se sabe que las concentraciones bajas de oxígeno modifican la ingesta de alimento, la tasa de crecimiento, la eficacia alimentaria y el metabolismo de los peces (Brett, 1979; Jobling, 1994). El descenso de la concentración de oxígeno desde niveles de normoxia hasta niveles de hipoxia reduce de una forma pronunciada la ingesta de alimento, el crecimiento y la eficacia alimentaria de diferentes especies, como por ejemplo el rodaballo y la lubina (Thetmeyer et al., 1999; Pichavant et al., 2000). En condiciones de hipoxia la reducción de la ingesta de alimento puede ser considerada como una estrategia para reducir la demanda de energía por los tejidos, y por lo tanto, la demanda de oxígeno por los mismos (Van Dam y Pauly, 1995). Los estudios dedicados al efecto de la hiperoxia sobre la ingesta de alimento son muy reducidos. Person-Le Ruyet et al. (2002) observaron que en el rodaballo no existen diferencias significativas entre la ingesta de alimento, crecimiento y conversión del alimento de rodaballos expuestos a condiciones de normoxia e hiperoxia, apreciando un aumento en la acumulación de lípidos en los peces expuestos a supersaturación de oxígeno.

Compuestos nitrogenados. Los compuestos nitrogenados tales como el amoníaco y los nitritos son factores que, además de perjudicar la salud de los peces, pueden afectar la ingesta de alimento. Concentraciones de amoníaco inferiores a 0,1 ppm no afectan la ingesta de alimento de la trucha lacustre (*Salvelinus namaycush*), niveles de 0,1 ppm disminuyen temporalmente la ingesta, mientras que valores de 0,3 ppm producen una gran disminución de la ingesta de alimento, disminución que fue mayor en peces alimentados con una dieta rica en P (Beamish y Tandler, 1990).

Salinidad. Es un factor específico del medio acuático. En los peces su detección es uno de los factores abióticos más importantes presentando para tal fin quimiorreceptores en las pseudobranquias (Laurent y Dunel-Erb, 1984). La salinidad modifica la ingesta de alimento dependiendo de la especie, estado de desarrollo, estación del año y periodo de aclimatación (Kestemont y Baras, 2001). Numerosos estudios muestran que el nivel de salinidad influye en el crecimiento de los animales afectando la ingesta total de alimento (Dendrinis y Torpe, 1985; Lambert et al., 1994b; Buckel et al., 1995; Peterson-Curtis, 1997; Imsland et al., 2001b), la tasa metabólica estándar (Woo y Kelly, 1995; Swanson, 1996; Dutil et al., 1997), la eficiencia de conversión alimentaria (Arunachalam y Reddy, 1979; Lambert et al., 1994b; Likongwe et al., 1996; Alava, 1998; Imsland et al., 2001b) y la estimulación hormonal (McCormick, 1996; Bœuf y Payan, 2001; Handeland, 2000).

Generalmente la mayor ingesta de alimento tiene lugar a una salinidad intermedia (Klaoudatos y Conides, 1996; Partridge y Jenkins, 2002), pero como en toda generalización tienen lugar numerosas excepciones. Algunas especies, como la carpa de hierba

(*Ctenopharyngodon idella*), la carpa común, la lubina y la platija Europea (*Paralichthys flesus*), aumentan su ingesta de alimento conforme aumenta la salinidad (Kilambi, 1980; Dendrinis y Torpe, 1985; Gutt, 1985; Wang *et al.*, 1997c), por el contrario otras especies mantienen estable o aumentan su ingesta de alimento paralelamente a la disminución de la salinidad, como por ejemplo el rodaballo (Imslund *et al.*, 2001b); disminuyen su ingesta con el aumento de la salinidad como el bacalao del Atlántico, la dorada, la trucha arco iris y la chopra (*Acanthopagrus butcheri*) (McKay y Gjerde, 1985; Lambert *et al.*, 1994b; Conides *et al.*, 1997; Partridge y Jenkins, 2002); o mantienen estable su ingesta independientemente de la salinidad, como la anchova de banco (*Pomatomus saltatrix*) y el perro chico (*Anarchichthys minor*) (Buckel *et al.*, 1995; Foss *et al.*, 2001). Durante el invierno la transferencia abrupta de la trucha alpina de agua salada a agua dulce produce una marcada reducción de la ingesta de alimento y una pérdida de peso a corto plazo, mientras que la transferencia gradual reduce dicho efecto. Por el contrario, la transferencia abrupta en verano produce una pequeña reducción (Arnesen *et al.*, 1993a,b), lo que indica que la trucha alpina presenta cambios estacionales en su capacidad osmorreguladora, influyendo en su ingesta de alimento (Kestemont y Baras, 2001).

Numerosos trabajos estudian el control hormonal de la osmorregulación en teleósteos eurihalinos, habiéndose comprobado que la prolactina (PRL) es el principal factor que regula el balance hidromineral en agua dulce (AD), mientras que el cortisol es el principal factor que lo regula en agua salada (AS) (Utida *et al.*, 1972; McCormick, 2001), aunque se ha encontrado que el cortisol puede desempeñar un papel osmoregulatorio dual (Mancera *et al.*, 2002). Recientemente se ha comprobado que la GH y la IGF-1 están también implicadas en el control de la adaptación a agua salada en salmónidos, tilapia de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*) y el fúndulo (Sakamoto y Hirano, 1993; Sakamoto *et al.*, 1997; Shepherd *et al.*, 1997a; Mancera y McCormick, 1999). Por el contrario, la información sobre la osmorregulación en peces estenohalinos es muy reducida.

La salinidad modifica los niveles de determinadas hormonas en peces. Así, en peces eurihalinos, los niveles circulantes de prolactina aumentan cuando los peces se transfieren de agua salada a agua dulce (Hasegawa *et al.*, 1987; Yamauchi *et al.*, 1991) y disminuyen cuando se transfieren de agua dulce a agua salada (Hasegawa *et al.*, 1987; Auperin *et al.*, 1995; Morgan *et al.*, 1997). Esto último también se ha observado en los niveles de PRL en la hipófisis (Shepherd *et al.*, 1997b). Las concentraciones de GH en la hipófisis aumentan cuando los peces se transfieren de AD a AS (Borski *et al.*, 1994; Shepherd *et al.*, 1997b), así mismo, la concentración plasmática de GH aumenta con la salinidad (Björnsson, 1997; Sakamoto y Hirano, 1993; Sakamoto *et al.*, 1997; Björnsson *et al.*, 1998; Handeland *et al.*, 2000; McCormick *et al.*, 2003), al igual que la IGF-I plasmática (Sakamoto y Hirano, 1993; Riley *et al.*, 2002; McCormick *et al.*, 2003). Los cambios que se producen en el cortisol plasmático debidos a las transferencias de una salinidad a otra son inconsistentes, habiéndose descrito una gran diversidad de efectos, incluso cuando se trata de la misma especie (Tabla 10). Se ha postulado un posible efecto de la insulina en la osmorregulación de los teleósteos, pero su papel no está claro (Mancera y McCormick, 1998), así, se ha descrito un aumento de la concentración de insulina plasmática durante el proceso de esmolificación en el salmón plateado (Plisetskaya *et al.*, 1988), pero por el contrario no parece

tener un efecto aparente en la osmorregulación de la trucha arco iris (McCormick *et al.*, 1991). Otras hormonas que parecen estar implicadas en la osmorregulación son las TH, describiéndose un aumento de las concentraciones plasmáticas de T_3 y T_4 causado por la transferencia de trucha arco iris de AD a AS (Orozco *et al.*, 2002).

Nivel de cortisol	Especie	Fuente
<i>Transferencia de AD a AS</i>		
Aumenta	Tilapia del Mozambique (<i>Oreochromis mossambicus</i>)	Assam y Henke, 1981
	Fúndula (<i>Fundulus heteroclitus</i>)	Jacob y Taylor, 1983
	Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>)	Shrimpton y McCormick, 1988
Igual o aumenta	Lucioperca (<i>Stizostedion lucioperca</i>)	Brown <i>et al.</i> , 2001
	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Orozco <i>et al.</i> , 2002
Igual o disminuye	Tilapia del Mozambique (<i>Oreochromis mossambicus</i>)	Balm <i>et al.</i> , 1985
	•	Morgan <i>et al.</i> , 1987
	•	Deen <i>et al.</i> , 2003
Disminuye	•	Nichols <i>et al.</i> , 1985
	Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>)	
<i>Transferencia de agua salobra a AS</i>		
Disminuye	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Manoara <i>et al.</i> , 1983
	•	Manoara <i>et al.</i> , 1984
	Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Rocha <i>et al.</i> , 1989
<i>Transferencia de AS a AD</i>		
Aumenta	Tilapia del Mozambique (<i>Oreochromis mossambicus</i>)	Assam y Henke, 1981
Disminuye	•	Morgan <i>et al.</i> , 1987

Tabla 10. Efecto del cambio de salinidad en la concentración plasmática de cortisol en diferentes especies de peces.

1.1.6.2. Factores bióticos

Están basados en las interacciones que se producen entre organismos, son la densidad de cultivo, la estructura social, la disponibilidad de presas, las perturbaciones humanas, la presencia de depredadores, parásitos, etc.

1.1.6.2.1. Estructura social

Los grupos de peces desarrollan relaciones jerárquicas entre ellos, apareciendo individuos dominantes frente a individuos subordinados. Los factores que pueden dar lugar al establecimiento de dichas relaciones jerárquicas son numerosos, así en trucha arco iris se han descrito: el abastecimiento de alimento, la densidad de población, la velocidad del agua, la presencia de depredadores, de sitios donde resguardarse, la estructura física del fondo y la competición inter e intraespecífica, siendo de todos ellos los de mayor importancia el abastecimiento de alimento y la densidad de población (Alanärä, 1996). Se ha demostrado que los peces dominantes monopolizan el comedero, no permitiendo su acceso a los peces subordinados, y por tanto, no dejándolos alimentarse adecuadamente, por lo que su crecimiento se ve afectado (Alanärä y Brännäs, 1996). En la trucha alpina, alimentada a autodemanda, los individuos más grandes son los dominantes, los que activan

el sensor, mientras que en la trucha arco iris no hay diferencias de tamaño entre los individuos que predominantemente lo activan (Alanärä y Brännäs, 1996). Algunos peces pueden exhibir un comportamiento alimentario nocturno, evitando así a los individuos dominantes que prefieren alimentarse durante el día. Este tipo de establecimiento de relaciones sociales y de cambios en el comportamiento alimentario ha sido descrito en trucha arco iris, trucha alpina, lubina y pargo (Alanärä y Brännäs, 1996, 1997; Jobling y Koskela, 1996; Maragoudaki *et al.*, 2001; Paspatis *et al.*, 2003).

En la naturaleza los peces interactúan con individuos de otras especies, pero en cultivo (monocultivo) carecen de estas interacciones. Es frecuente la aparición de bajas debidas a ataques, algunos de ellos de carácter caníbal entre individuos de la misma especie (Jobling y Koskela, 1996; Hatzithanasiou *et al.*, 2002; Paspatis *et al.*, 2003). Así mismo, se ha observado que, en algunos casos, el nivel de agresividad disminuye por la interacción que se produce entre dos especies cultivadas en un mismo tanque (duocultivo), mejorando el crecimiento de los individuos, por ejemplo entre el salmón del Atlántico, la trucha común y arco iris, o entre el salmón del Atlántico y la trucha alpina (Mork, 1982; Nordvedt y Holm, 1991), por el contrario, en otras ocasiones los ataques que se producen entre especies son numerosos, no mejorando el crecimiento, como por ejemplo en el caso de la interacción el salmón del Atlántico y la trucha común (Jobling *et al.*, 1998).

1.16.2.2. Densidad de cultivo

En los grupos pequeños de trucha arco iris, utilizando sistemas de alimentación a demanda, la dominancia social ha mostrado determinar la capacidad competitiva para demandar alimento, de manera que uno o dos individuos del grupo son los que realizan la mayoría de las demandas de alimento dentro del mismo (Adron *et al.*, 1973; Landless, 1976; Alanärä y Brännäs, 1993, 1996; Brännäs y Alanärä, 1994). Se ha observado que la tasa de agresión disminuye conforme aumenta el tamaño del grupo, ya que, bajo estas condiciones, los repetidos ataques por parte de los dominantes, para defender una posición o una fuente de alimento, no pueden ser mantenidos (Jørgensen *et al.*, 1993). Sin embargo, pese a la observación de la disminución de la dominancia con el aumento del tamaño del grupo, se han encontrado pruebas de dominancia social en grupos de truchas de todas las densidades (Alanärä y Brännäs, 1996).

La densidad de cultivo es un factor que ejerce una pronunciada influencia en el crecimiento, mortalidad, eficacia alimentaria y heterogeneidad de tamaño de muchas especies de peces cultivados (Jørgensen *et al.*, 1993; Ewing *et al.*, 1998; Irwin *et al.*, 1999; Maragoudaki *et al.*, 1999, 2001; Lambert y Dutil, 2001; Jonassen, 2002; Paspatis *et al.*, 2003). Una baja densidad disminuye el crecimiento y aumenta la mortalidad en el pargo, si bien este efecto sólo se ha observado durante los meses de verano, permaneciendo estables el crecimiento, la mortalidad y la eficacia alimentaria, durante el resto del año, independientemente de la densidad del grupo (Maragoudaki *et al.*, 2001). Se ha demostrado que la densidad de cultivo afecta al comportamiento alimentario, a la cantidad de alimento demandado y a la pérdida de alimento a causa del estrés y de la estructura social dentro del grupo (Alanärä y Brännäs, 1996). Se acepta generalmente, entre ciertos límites, la existencia de

una relación inversa entre densidad de cultivo y crecimiento, así como eficacia alimentaria, en una gran variedad de especies, como la lubina, pargo, rodaballo, perro chico, bacalao, (Irwin *et al.*, 1999; Maragoudaki *et al.*, 1999; Lambert y Dutil, 2001; Jonassen, 2002; Paspatis *et al.*, 2003), si bien las explicaciones a la posible causa que la provocan difieren entre autores, proponiéndose la competición (Irwin *et al.*, 1999), la limitación de espacio (Ewing *et al.*, 1998) y la disponibilidad de alimento (Irwin *et al.*, 1999; Lambert y Dutil, 2001) y, por tanto, la ingesta de alimento (Jørgensen *et al.*, 1993; Lambert y Dutil, 2001; Almazán, 2004). En general, de lo anteriormente expuesto, se podría deducir que el efecto de la densidad en el crecimiento, eficacia alimentaria y mortalidad, depende de la especie estudiada (Tabla 11).

El cultivo en densidades elevadas puede producir una situación de estrés crónico, elevando cuatro veces los niveles plasmáticos de cortisol respecto a los niveles obtenidos en densidades de cultivo bajas, en dorada (Montero *et al.*, 1999). Por el contrario, en el pez gato africano (*Clarias gariepinus*), en condiciones de alta densidad de cultivo, los niveles de cortisol y lactato se mantienen estables, mientras que los de glucosa aumentan respecto de los niveles obtenidos a baja densidad de cultivo (Almazán Rueda, 2004). Como consecuencia de la posible situación de estrés el hematocrito, la hemoconcentración, la cantidad de eritrocitos y la glucosa plasmática aumentan; se deprime el sistema inmune y el índice hepatosomático disminuye, produciendo una alteración en la composición de ácidos grasos hepáticos de los peces. Por tanto, el cultivo en altas densidades puede producir cambios en las rutas metabólicas relacionadas con el metabolismo lipídico, lo que favorece el aumento de la demanda energética (Montero *et al.*, 1999).

Especie	Crecimiento	Eficacia alimentaria	Mortalidad	Fuente
<i>Dicentrarchus labrax</i>	?	?	?	Paspatis <i>et al.</i> , 2003
<i>Dicentrarchus labrax</i> (*)	? (=)	-	? (=)	Kestemont <i>et al.</i> , 2003
<i>Anarhichas minor</i>	?	-	?	Jonassen, 2002
<i>Scophthalmus maximus</i>	?	-	?	Irwin <i>et al.</i> , 1999
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	?	-	?	Holm <i>et al.</i> , 1990
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	?	-	?	Papoutsoglou <i>et al.</i> , 1987
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	?	=	=	Ewing <i>et al.</i> , 1998
<i>Gadus morhua</i>	?	?	?	Lambert y Dutil, 2001
<i>Gadus morhua</i> (*)	=	(?) - =	(?)	Baskerville-Bridges y Kling, 2000
<i>Parca fluviatilis</i> (*)	? (?)	-	? (?)	Kestemont <i>et al.</i> , 2003
<i>Salvelinus alpinus</i>	?	-	?	Jørgensen <i>et al.</i> , 1993
<i>Pagrus pagrus</i> (*)	= (?)	= (-)	= (?)	Maragoudaki <i>et al.</i> , 2001
<i>Pagrus pagrus</i> (**)	= (?)	= (=)	= (=)	Maragoudaki <i>et al.</i> , 1999
<i>Clarias gariepinus</i>	?	?	=	Almazán Rueda, 2004
<i>Clarias gariepinus</i>	=	-	=	Hongsawat <i>et al.</i> , 1997

(*) Entre paréntesis los resultados obtenidos para larvas, fuera del paréntesis para post-larvas.

(*) Entre paréntesis los resultados obtenidos con disponibilidad de alimento restringida.

(*) Entre paréntesis los resultados obtenidos durante el verano, fuera del paréntesis el resto del año.

(**) Entre paréntesis los resultados obtenidos durante la primavera, fuera del paréntesis en invierno.

Tabla 11. Efecto de la elevada densidad de cultivo en el crecimiento, eficacia alimentaria y mortalidad de diferentes especies de peces.

1.16.2.3. Predadores

En los peces se han observado cambios en el comportamiento alimentario que pueden estar asociados a la presencia de predadores en el medio. Ciertos peces, como el pez sol (*Lepomis macrochirus*) y el salmón del Atlántico, en presencia de uno de sus predadores transcurren más tiempo en áreas con poco alimento pero con más zonas de refugio, eludiendo zonas abiertas (Werner *et al.*, 1983; Metcalfe *et al.*, 1987); otras especies permanecen escondidas durante ciertas horas del día, evitando las áreas peligrosas o escapando de los predadores (Smith, 1992); mientras que otros peces aprovechan para conseguir alimento en el periodo del día en el que sus predadores no son activos o pueden reaccionar al riesgo de predación reduciendo su actividad o aumentando el uso de refugios (Smith, 1992). La disponibilidad de alimento produce un marcado efecto. Cuando no hay restricciones en la disponibilidad de alimento, los movimientos en busca de alimento se ven restringidos por la presencia de predadores, mientras que cuando la cantidad de alimento es limitada, los peces aumentan la búsqueda de alimento aún en presencia de predadores (Figura 13a) (Werner *et al.*, 1983; Magnhagen, 1988; Johnsson *et al.*, 2001; Vehanen, 2003), pasando menos tiempo en los refugios, aumentando, por tanto, el riesgo de ser capturados en los peces hambrientos más que en los peces saciados (Höjesjö *et al.*, 1999; Vehanen, 2003). La trucha común se alimenta durante el anochecer y el principio del periodo de oscuridad, cuando el riesgo de predación es menor pero la alimentación es efectiva (Alanärä *et al.*, 2001). Cuando existe presencia de predadores, el carpín (*Carassius carassius*) cambia su patrón alimentario de nocturno a arrítmico (Pettersson *et al.*, 2001). La estrategia consistente en cambiar el periodo de alimentación para evitar la presencia de predadores visuales ha sido observada también en salmón del Atlántico, aumentando la seguridad, pero disminuyendo la eficacia de alimentación (Fraser y Metcalfe, 1997; Nicieza y Metcalfe, 1997). El salmón del Atlántico es predominantemente nocturno en esta época, consiguiendo evitar el riesgo de predación en invierno, pero a temperaturas elevadas precisa de mayores requerimientos energéticos teniendo que cambiar su momento de alimentación para poder satisfacer sus necesidades nutricionales (Fraser *et al.*, 1993, 1995).

1.16.2.4. Perturbaciones humanas

El ser humano es uno de los principales factores bióticos medioambientales, interfiriendo en el comportamiento alimentario de los peces por diversos procedimientos rutinarios en la piscifactoría como pueden ser la manipulación de los peces, la limpieza de los tanques, la profilaxis y tratamiento de enfermedades y la administración de alimento a los peces (Kestemont y Baras, 2001). Así, por ejemplo, las perturbaciones producidas por la manipulación de los peces, debidas a los procesos de pesada de los animales o de transferencia, producen una reducción de la ingesta de alimento que puede prolongarse por periodos de varias horas o incluso días (Boujard *et al.*, 1992). Pero las perturbaciones humanas no siempre producen una reducción de la ingesta de alimento. Se ha observado que juveniles de trucha arco iris alojados en tanques próximos a los pasillos más utilizados de una piscifactoría, aumentan su ingesta de alimento respecto a los animales confinados

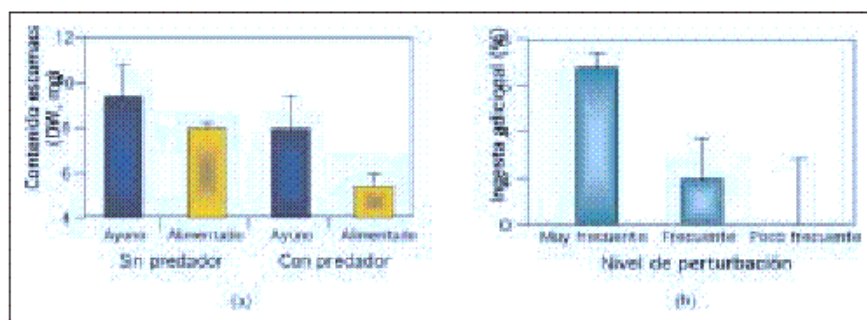


Figura 13. Efecto de la presencia de predadores (bacalao) en la ingesta de alimento del gobio de arena (*Pomatoschistus minutus*) ayunados durante una semana. Predadores y presas se encontraban separados por una combinación de paredes opacas y transparentes que le permitían a los gobios refugiarse de los bacalaos (Modificado de Magnhagen, 1988) (a); Efecto de la perturbación humana en la ingesta de alimento de juveniles de trucha arco iris. Porcentaje de incremento de la ingesta de alimento respecto a la línea base, calculada como la ingesta de alimento realizada en tanques alejados de la zona de paso, donde la perturbación humana es poco frecuente (Redibujado de Speare et al., 1995) (b).

en tanques alejados de dichos pasillos, donde el nivel de perturbación es poco frecuente (Figura 13b) (Speare et al., 1995).

12. Biología: Aspectos generales de las especies objeto de estudio

Para la realización de los experimentos que presentamos a continuación se seleccionaron dos especies de peces, un teleósteo marino, la lubina y un teleósteo de agua dulce, la trucha. A continuación se recogen algunos aspectos de la biología general de dichas especies.

12.1. Lubina

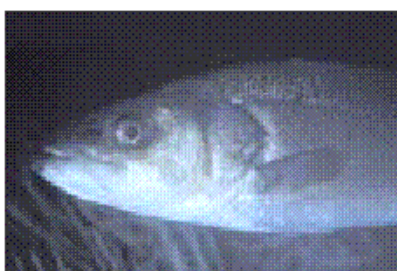
12.1.1. Nomenclatura

La lubina pertenece al superorden Teleósteos, orden Perciformes, suborden Percoides, familia Serránidos.

El término "lubina" se remonta a la antigua Grecia, Aristóteles denominó a este pez como *Labrax* o lobo marino, poniendo de relieve la voracidad y los hábitos de caza en grupo de esta especie depredadora. Posteriormente, Plinio le dio el nombre latino de *Lupus* (lobo). En 1749, Klein le adjudicó el nombre de *Labrax*. El nombre científico actualmente aceptado en Europa es el de *Dicentrarchus labrax*, el cual debemos a Linneo (1758).

12.1.2. Distribución geográfica, local y hábitat preferido

La lubina es común en el Mar Mediterráneo, Mar Negro, a lo largo de la costa Este del Océano Atlántico, distribuyéndose desde el Mar del Norte y Mar Báltico hasta el Norte



de África, llegando hasta las costas de Senegal (Moretti *et al.*, 1999). Sin embargo, al Norte sólo se pesca en cantidades apreciables por debajo de los 53°N ó 54°N, en las costas de Irlanda, País de Gales e Inglaterra (Pickett y Pawson, 1994).

La lubina es un pez eurihalino y euritermo, capaz de vivir en el mar o en estuarios, pudiendo llegar incluso a remontar ríos (Moretti *et al.*, 1999). Habitualmente vive en rangos de salinidad muy amplios, comprendidos entre 10-30‰ (Barnabé, 1980), tolerando la transferencia directa a agua de 3,9‰ de salinidad y gradual hasta el agua dulce de 0,5‰ de salinidad (Chervinski, 1974). Por lo tanto, es posible adaptar la lubina a agua dulce para su cultivo. La lubina migra en relación con la salinidad, siendo más tolerantes a las fluctuaciones de salinidad que la mayoría de los peces marinos (Kelley, 1986). El rango de temperatura en el que puede vivir también es muy amplio, oscilando entre 2°C y 32°C (Barnabé, 1990), prefiriendo las temperaturas comprendidas entre 10°C y 25°C, aunque este rango de preferencia varía en función del lugar de procedencia de las lubinas (Barnabé, 1980).

1.2.1.3. Comportamiento alimentario

Puede encontrarse en la columna de agua o cerca de la superficie cuando sube a cazar (Pickett y Pawson, 1994). Los individuos jóvenes suelen agruparse formando pequeños grupos, mientras que los ejemplares adultos son solitarios (Bas Peired, 2002).

La lubina es un pez carnívoro, un depredador voraz, que se alimenta de peces pequeños y de una gran variedad de invertebrados, como crustáceos, camarones y cangrejos (Moretti *et al.*, 1999). Las tácticas de captura de alimento varían en función del tipo de presa, en el caso de presas pelágicas las caza con movimientos ascendentes en la columna de agua, mientras que en el caso de cangrejos, moluscos bivalvos y gusanos poliquetos, la lubina introduce la cabeza en el sustrato para atraparlos. Una vez que localiza la presa, avanza hacia ella y la engulle con una velocidad asombrosa, regresando casi inmediatamente a su posición original (Pickett y Pawson, 1994).

En relación con la distribución temporal de la alimentación, la lubina presenta perfiles diurnos en verano y nocturnos en invierno (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1998a). Si bien esta dualidad debería no alterar significativamente su crecimiento ya que se ha descrito que la lubina se alimenta y crece por igual bajo diferentes condiciones de iluminación (Anthouard *et al.*, 1993).

La lubina es una especie capaz de ajustar su ingesta diaria de acuerdo con sus necesidades nutricionales (Kaushik, 2002). Para obtener un crecimiento óptimo precisa de dietas que contengan entre 43-45% de P (Pérez *et al.*, 1997; Dias *et al.*, 1998). La influencia de la temperatura del agua en los requerimientos proteicos de la lubina ha sido estudiada, mostrando que entre 18-25°C, los requerimientos proteicos no varían (Peres y Oliva-Teles, 1999). La relación óptima P digestible (DP) – energía digestible (DE) de la dieta se ha determinado en 19 mg kJ⁻¹ (DP), en dietas que contengan al menos 21 MJ kg⁻¹ (DE), con la mayor parte de la energía no proteica formada por F (Dias *et al.*, 1998). Ha sido descrita una mejora en la utilización proteica por la lubina cuando se aumentan los F de la dieta por encima de 18-19% (Dias *et al.*, 1998; Lanari *et al.*, 1999), sin embargo, niveles muy

elevados de F (30%) inducen una disminución en el crecimiento (Peres y Oliva-Teles, 1999). La lubina no tiene una elevada actividad amilolítica digestiva, por lo que la digestibilidad de los CH depende de la naturaleza y complejidad del carbohidrato proporcionado (Kaushik, 2002). No obstante, niveles muy elevados de CH parecen inducir una disminución en el crecimiento de la lubina (Dias et al., 1998).

Estudios recientes han mostrado la capacidad de la lubina para utilizar comederos a demanda (Boujard et al., 1996; Azzaydi et al., 1998; Sánchez-Vázquez et al., 1998a; Rubio et al., 2004a), y de seleccionar una dieta completa que se ajusta a sus hábitos nutricionales (carnívoro), utilizando comederos a demanda que contienen dietas granuladas incompletas, formuladas con pares de macronutrientes (Aranda et al., 2000, 2001).

1.2.2. Trucha arco iris

1.2.2.1. Nomenclatura

La trucha arco iris pertenece al superorden Teleostei, orden Salmoniformes, suborden Salmonoidei, familia Salmónidos.

El nombre original de *Salmo mykiss*, así como la nueva combinación de *Oncorhynchus mykiss*, le fueron asignados por Walbaum en 1972. Pallas, en 1914 la designó como *Salmo penshinensis*, término que se ha utilizado como sinónimo. En 1836, Richardson la denominó como *Salmo gairdneri*, nomenclatura que fue utilizada durante años. Pero el nombre científico actualmente aceptado es el *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1972).



1.2.2.2. Distribución geográfica, local y hábitat preferido

La trucha arco iris procede del Océano Pacífico Norte, se extendió por otras regiones americanas (Pivni?ka y ?ern?, 1997), desde el extremo sur de California hasta Alaska, las áreas Aleutianas y el Pacífico occidental la Península de Kamchatka y el Mar de Ojotsk en Siberia (Hardy, 2002), antes de ser traída a Europa en 1880, con el fin de enriquecer la fauna local, extendiéndose por otros continentes con posterioridad. En la actualidad está ampliamente distribuida, entre los 63°N y los 32°N, debido a que las aptitudes que posee esta especie para su cultivo intensivo han originado su introducción masiva (Pivni?ka y ?ern?, 1997).

La trucha arco iris es una especie bentopelágica, anádroma, soporta aguas menos oxigenadas que la trucha común y precisa menos de refugios acuáticos que la trucha de río. Puede tolerar un amplio rango de temperaturas, entre 10-24°C, y de otras variables como la calidad del agua, soportando temperaturas más altas que la trucha común, pero prospera en aguas de temperaturas comprendidas entre 13-18°C (Pivni?ka y ?ern?, 1997; Hardy, 2002). Habita principalmente en agua dulce, pero puede adaptarse a vivir en agua salobre o marina, siempre que el cambio sea gradual. La trucha arco iris vive en lagos, arroyos y ríos. Se ha descrito su presencia en Pacífico Norte, donde presenta ciclos similares

a los del salmón del Pacífico, pudiendo transcurrir parte de su vida en el océano, retornando a los lagos y ríos para desovar y pasar los primeros estadios de desarrollo (Hardy, 2002).

1.2.2.3. Comportamiento alimentario

La trucha arco iris es un pez carnívoro. Se alimenta de larvas de insectos acuáticos, zooplancton, moluscos y pequeños peces (Pivni?ka y ?ern?, 1997; Hardy, 2002). Se ha dicho de ella que es un carnívoro no especializado, un comedor visual que captura aquellos organismos más fácilmente alcanzables, ahorrando con ello energía (Blanco Cachafeiro, 1995).

La trucha arco iris es una especie que presenta una alta intolerancia a los CH, por lo que prefiere las P y F como fuente de energía en la dieta. Las dietas que se formulan para la trucha arco iris contienen entre un 42 y un 48% de P y de un 16 a un 24% de F, en función de su estadio de desarrollo (Tabla 12) (Hardy, 2002). Utilizando dietas con el mismo contenido en F (10%) e isocalóricas (20 kJ g⁻¹) pero diferente contenido en P (35 y 45%), la trucha arco iris no mostró diferencias en su tasa de crecimiento, ingesta de alimento y eficacia alimentaria (Valente *et al.*, 1998). Prefiere ingerir una dieta balanceada en aminoácidos, rica en caseína, independientemente del contenido en P a ingerir una dieta imbalanceda, rica en gelatina, o una dieta libre de P (Yamamoto *et al.*, 2000).

Fase de Producción	Proteína	Grasa
Dieta de iniciación (larvas)	45-50%	18-18%
Dietas de crecimiento (juveniles)	42-48%	20-24%
Dietas de reproducción (peces maduros)	35-40%	14-18%

Tabla 12. Niveles recomendados de proteína y grasa en dietas para trucha (Tomada de Hardy, 2002).

Al igual que en la lubina, numerosos estudios han mostrado la habilidad de la trucha arco iris para utilizar comederos a demanda (Alänarä, 1992a, 1992b, 1994, 1996; Alänarä y Brännäs, 1993; Boujard y Leatherland, 1992c; Boujard *et al.*, 1993, 1995; Valente *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2002), y de seleccionar una dieta completa que se ajusta a sus hábitos nutricionales, utilizando comederos a demanda que contienen dietas granuladas incompletas, formuladas con pares de macronutrientes (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1999), así como poder conocer sus preferencias utilizando dietas con diferentes contenidos en la cantidad o fuente de macronutrientes (Boujard y Médale, 1994; Yamamoto *et al.*, 2000, 2002). Cuando se le da la posibilidad de seleccionar, la dieta que demandan está compuesta por un 64% de P y un 18% de CH, lo que difiere considerablemente de las dietas que se emplean en su cultivo, y un 18% de F, lo que se ajusta a las dietas empleadas (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1999).

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Analizar la influencia de factores nutricionales, neuroendocrinos y ambientales en la regulación de la ingesta de alimento y la selección de macronutrientes en peces teleósteos.

2.2. Objetivos específicos

Desarrollos metodológicos previos

A.- Desarrollar una metodología, basada en la encapsulación de nutrientes, que permita el estudio de la selección de macronutrientes sin la interferencia de las propiedades organolépticas de los mismos. Determinar las posibles influencias del color y la posición de las cápsulas.

Influencia de factores nutricionales

B.- Dilucidar la influencia de la ingestión previa de un macronutriente (precarga) sobre la regulación de la ingesta posterior de proteína, grasa y carbohidratos encapsulados.

C.- Analizar la influencia del ayuno selectivo de corta duración, de uno o dos macronutrientes, en la ingesta de alimento y los patrones de selección de macronutrientes.

Influencia de factores neuroendocrinos

D.- Investigar el efecto de la administración exógena de colecistoquinina y de su antagonista proglumide sobre la ingesta de alimento y la selección de macronutrientes encapsulados.

E.- Determinar el efecto de la administración exógena de serotonina sobre su concentración en plasma, la ingesta de alimento y la selección de macronutrientes encapsulados.

Influencia de factores endocrinos

F.- Investigar el efecto de la administración exógena de melatonina sobre su concentración plasmática, la ingesta de alimento y la selección de macronutrientes encapsulados.

G.- Investigar el efecto de la administración exógena de cortisol sobre su concentración plasmática y la ingesta de alimento encapsulado.

Influencia de factores ambientales

H.- Analizar la influencia de la salinidad sobre la ingesta de alimento y los patrones de selección de macronutrientes encapsulados.

Introduction and objectives

3. General introduction and objectives

3.1. General introduction

Food intake regulation is the main component of energy balance, and hence of body weight regulation. Regulatory mechanisms have very often been restricted to the issue of energy regulation, but an increasing body of evidence points to the existence of complex mechanisms involved in the regulation of macronutrient intake (Richter *et al.*, 1938; Berthoud y Seeley, 2000). Although in nature some animals subsist on a single diet, most compose a complete diet by selecting from various food items of different nutrient composition (Carlson, 1994; Kaiser y Hughes, 1993). This selection is not a secondary effect of the variety of food available, since when animals have many foodstuffs at hand they select them so as to make up a balanced diet adapted to their physiological needs.

Since the pioneer studies of Richter and colleagues (1938), which described the ability of rats to select a diet from different foodstuffs, macronutrient selection has been widely investigated in mammals. Surprising, at difference of mammals, in fish, despite of an increasing body of studies dedicated to nutrition and feeding, this subject remain without elucidate and basic questions as the fish ability to compose a complete diet from pure macronutrients, continues unresolved. This absence of background is a consequence, almost in part, of technological difficulties to provide free access to the food, since the classical nutrition studies in fish generally involved the manual administration of food (composed by the three macronutrients), making impossible the realization of experiments on dietary selection. In addition, the manufacture of food pellets elaborated from pure macronutrients has been another limiting factor for the development of experiments on macronutrient selection in fish.

In fish are relatively well known the existence of physiological mechanisms responsible of energy intake regulation using complete diets. Previous results have been showed the rainbow trout, goldfish, common carp, sharpsnout seabream and European sea bass ability to choose a complete diet (containing the three macronutrients), according to their specific nutritional habits (carnivorous or omnivorous), from different macronutrient granulated diet with different chemosensory properties (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1998, 1999; Aranda *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2003; Torrejón Atienza *et al.*, 2004). However, the physiological mechanisms involved in the regulation of this macronutrient selection remain unknown.

The mechanisms involved in the control of feeding and satiation are complex and multifactorial. In mammals they have been studied for decades, exponentially progress during the last 30-40 years, although they are not yet clearly defined. In fish, the studies have been focused on the control of food intake. The appetite and satiety signals are originated in the digestive system and in the nutrient store tissues of mammals. They are peripheral signals that could be divided in two types: (a) short-term signals (e.g., nutrients and gastrointestinal hormones) and (b) long-term signals (e.g., adipose signals: insulin and leptin) (Havel, 2001). The target organ of these appetite and satiety signals

is the brain, thus, all the information about smell, taste and texture originated in the oral cavity and great variety of sensorial information originated in the internal organs, as for example the hunger signals from the liver, are received by the postrema area and the nucleus of the solitary tract (Carlson, 1998). In mammals, the existence of orexigenic and anorexigenic neural systems, morphological and functionally connected, is widely described. These systems conform an interconnected network in the hypothalamus to regulate the food intake and the body weight. Nevertheless, in fish only a small number of studies are focused on the cerebral (central) control of feeding behaviour. Recent works show the involvement of cerebral molecules that have an effect as orexigenic (e.g., neuropeptide Y, orexin, galanin) and anorexigenic (e.g., serotonin, cholecystokinin, bombesin) substances in mammals and fish (Lin *et al.*, 2000).

In fish, growth and food intake are controlled by internal factors involving the central nervous system and the endocrine and neuroendocrine systems, as well as by external factors of environmental origin like temperature, illumination, oxygen, food availability, etc. Several factors are specific of the aquatic environment, such as the salinity, oxygen level, pH, nitrogenous compounds, etc. All of them have demonstrated to be implied in the feeding process, in a single one of the steps, or in more than one, as the temperature that it is implied in the availability of preys, food capture probability and in the digestion, absorption and nutrient transformation process (Kestemont y Baras, 2001).

3.2. Objectives

The overall objective was to analyse the influence of nutritional, endocrine, neuroendocrine and environmental factors on food intake regulation and macronutrient selection in teleost fish.

3.2.1. Specific objectives

3.2.1.1. Previous methodological development.

Objective 1.- Develop of a methodology, based on nutrient encapsulation, that allows the study of macronutrient selection without the interference of organoleptic properties intrinsic to nutrients. Determine the possible influence of colour and/or position of the capsules on macronutrient selection.

3.2.1.2. Nutritional factors

Objective 2.- Elucidate the effect of a macronutrient previous ingestion (preload) on the regulation of the subsequent intake of encapsulated protein, fat or carbohydrates.

Objective 3.- Analyse the effect of a selective deprivation, of one or two macronutrients, on food intake and the macronutrient selection patterns.

3.2.13. Neuroendocrine factors

Objective 4.- Investigate the effect of oral administration of cholecystokinin and its antagonist proglumide on food intake and the encapsulated macronutrient selection.

Objective 5.- Determine the influence of oral administration of serotonin on its plasma concentration, food intake and encapsulated macronutrient selection.

3.2.14. Endocrine factors influence

Objective 6.- Investigate the influence of oral administration of melatonin on its plasma concentration, food intake and encapsulated macronutrient selection.

Objective 7.- Explore the effect of oral administration of cortisol on its plasma concentration and food intake.

3.2.15. Environmental factors influence

Objective 8.- Analyse the influence of salinity on food intake and encapsulated macronutrient selection pattern.

3.2.2. Experimental design

Chapter 5.1.- (Objective 1). Due to the difficulty to obtain pure fat pellets and due to the fact that the different pure macronutrients have different organoleptic characteristics that could affect the diet selection, the macro-encapsulation of pure macronutrients avoids this two inconvenient of the macronutrient diets. Nevertheless, this technology never has been used in fish. The senses (odour, taste, texture, etc.) significantly contribute to the process of food selection. The aim of this study was to elucidate if a fish as European sea bass is able to distinguish the food independently of its taste, odour or texture, by post-ingestive process, using for this purpose encapsulated macronutrients.

Chapter 5.2.- (Objective 1). The goal of this study was to determine the ability of rainbow trout to discriminate macronutrient independently of its taste, odour or texture, by post-ingestive process, using for this purpose encapsulated macronutrients.

Chapter 5.3.- (Objective 2). In mammals it has been described that nutrient preloads reduces food intake and modifies the subsequent macronutrient selection pattern, however, no information is available about its possible role in fish. The aim of this work was to determine the effect of orally administered macronutrient preloads of protein, fat or carbohydrates, into gelatine capsules, on the subsequent macronutrient selection, using for this purpose a food composed by carbohydrates, protein or fat packaged separately into gelatine capsules.

Chapter 5.4.- (Objective 3). Several fish species can survive for months alternating feeding and fasting periods during their natural cycle of life as consequence of prey

availability in the aquatic environment. Metabolic and morphological consequences of fasting and refeeding have been extensively studied using diet composed by the three macronutrients, however only few studies approach the study of macronutrient intake during a selective macronutrient deprivation, using granulated diets composed by two-macronutrient. Therefore, the goal of the present study was to establish the role of one or two macronutrient deprivation on energy regulation and macronutrient selection using encapsulated macronutrients, sharing their chemosensory properties at oropharyngeal level.

Chapter 5.5.- (Objective 4). The cholecystokinin (CCK), a peptide released by the gastrointestinal tract in response to food intake, has been extensively studied in the regulation of food intake in several vertebrate species, including fish. The CCK released from intestinal endocrine cells is widely considered as a satiety signal, inducing in fish a dose-response inhibition in food intake; however, to date the possible role of CCK on macronutrient selection is unknown. The aim of this work was to study the influence of CCK and its antagonist, proglumide, administered orally into gelatine capsules, on the macronutrient selection using encapsulated macronutrients.

Chapter 5.6.- (Objective 5). Brain serotonin is synthesised in neurons, whereas peripheral serotonin is synthesised and released by enterochromaffin cells in gut in response to different stimulus such as gastric distension, hyperosmotic solutions or glucose presence. It is known that serotonin reduces food intake in mammals and fish and modifies the macronutrients selection pattern in mammals; however, no information is available about its role on macronutrients selection in fish. The goal of this work was to determine the influence of oral administration of increasing doses of serotonin, into gelatine capsules, on its plasma concentration, food intake and encapsulated macronutrient selection.

Chapter 5.7.- (Objective 6). In wild fish, seasonal-dependent diet selection changes have been extensively reported. Since the pineal hormone melatonin is the final mediator of photoperiodical changes, it could be involved in the regulation of these changes. Peripheral melatonin is synthesized by the enterochromaffin cells probably in response to nutritional factors and to the feeding behaviour more than in response to photoperiod, suggesting that melatonin could be involved in the process of feeding and/or digestion. Melatonin regulates gastrointestinal motility and food intake in mammals and fish. The aim of this study was to investigate the effect of exogenous administration of melatonin on its plasma concentration, food intake and encapsulated macronutrient selection.

Chapter 5.8.- (Objective 7). Cortisol is a multifarious hormone, especially at physiological and metabolical level. In fish it has been suggested that fluctuation of the plasma cortisol is associated to photoperiod and feeding, therefore it has been observed a pronounced increase of circulating cortisol related with the feeding. In relation on the effects of cortisol on feeding the results are few and, once again, the variability of results no permit to clarify the possible role of cortisol on food intake regulation. It has been described

contradictory effects related with the dose of cortisol, mode of administration or the induction of a chronic or acute effect. The goal of this work was explore the cortisol effect, orally administrated into capsules, on food intake regulation in rainbow trout.

Chapter 5.9.- (Objective 8). Salinity is an environmental parameter that directly influences the osmoregulation and the growth, both in marine as freshwater fish. It is know that salinity modify food intake depending of fish specie, development state, season, and acclimation period, but its possible effect on macronutrient selection remain unknown. The aim of this work was to study the influence of three salinity levels, on food intake regulation and encapsulated macronutrient selection by an euryhaline specie, European sea bass.

Material y métodos

4. Material y métodos generales

En este apartado se procederá a describir el material y la metodología común a los diferentes experimentos realizados. El diseño experimental específico de cada experimento será tratado con detenimiento en el capítulo correspondiente.

4.1. Instalaciones

Para la realización de los experimentos fueron utilizados dos laboratorios: el laboratorio de Crononutrición de Peces del Departamento de Fisiología situado en la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia, diseñado para el estudio de los ritmos biológicos de alimentación y el laboratorio de Crononutrición de la Estación de Hidrobiología de la Unidad Mixta INRA-IFREMER, situada en St. Pée sur Nivelle (Francia).

4.1.1. Laboratorio de Crononutrición de la Universidad de Murcia

Dicho laboratorio está insonorizado y aislado del exterior, de manera que la iluminación y la temperatura pudieran ser controladas por los usuarios de dicho laboratorio. En su interior se emplazaron ocho cámaras (Figura 14), cada una independiente de las demás, posibilitando que la salinidad, intensidad luminosa, fotoperiodo y alimentación pudieran ser regulados independientemente en cada una de las cámaras.

Cada cámara estaba provista de un sistema de circuito cerrado de agua marina sintética, con una tasa de renovación por tanque de 200% por hora; un filtro físico (perlón + foam) que eliminaba partículas sólidas del agua, asociado a un filtro químico (carbón activo);

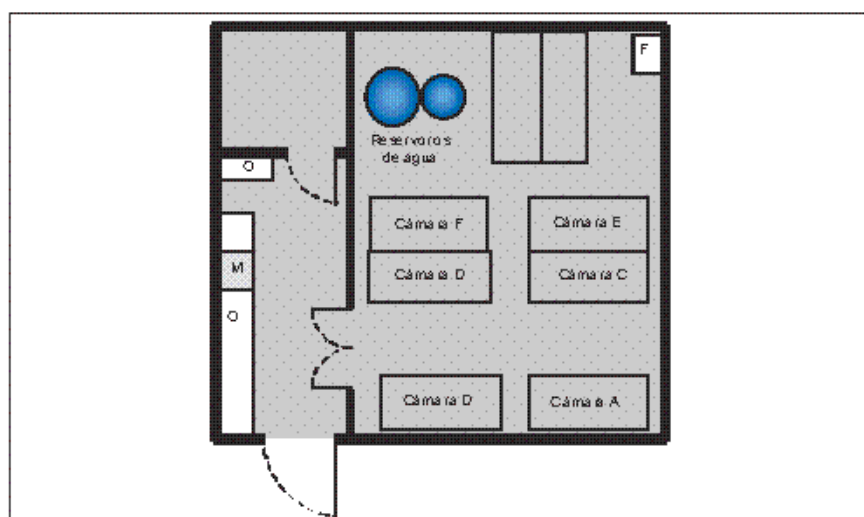


Figura 14. Esquema a escala del laboratorio de Crononutrición de Peces. Aparecen representados: en color gris, la distribución de las cámaras, cada una provista de 4 tanques; los reservorios de agua (azul oscuro); las mesas de trabajo (D); los módulos de registro informáticos (M) y los fregaderos (F).



Figura 15. Fotografías del interior de una cámara mostrando (a) los cuatro tanques y (b) el flotador donde se situaba el alimento encapsulado.

un filtro biológico (biobolas + sustrato de microoparinos y grava); un sistema de aireación, consistente en un soplador Sirocco D-2, que añadido a las diferentes cascadas que se producían en la instalación mantenían los niveles de oxígeno próximos a los de saturación, y cuatro tanques de fibra de vidrio de base tronco-cónica, de dimensiones 65 × 36 × 38 cm y 75 l de capacidad (Figura 15a). Cada tanque estaba dotado de un flotador en la superficie del agua, dispuesto para el confinamiento del alimento encapsulado (Figura 15b).

4.1.2. Laboratorio de Crononutrición de la Unidad Mixta INRA-IFREMER

Al igual que el anterior, el laboratorio fue diseñado y construido con el objetivo de insonorizarlo y aislarlo del exterior, de manera que la iluminación y la temperatura pudieran ser controladas por los usuarios de dicho laboratorio. En su interior se encontraban emplazadas 4 cámaras, alineadas en 4 baterías independientes en relación con la iluminación, y en 2 baterías independientes en relación con el suministro de agua, provistas cada una de ellas de un sistema de circuito cerrado de agua dulce y, por tanto, independientes en cuanto a temperatura y parámetros físico-químicos del agua, permitiendo la realización de experimentos independientes de manera simultánea. Cada cámara contenía en su interior 6 tanques de 100 l de capacidad.

Puesto que los laboratorios de la Unidad Mixta INRA-IFREMER sólo fueron utilizados en dos de los experimentos, el resto de las especificaciones concernientes a dichos laboratorios, peces, dieta, alimentación, etc., pueden encontrarse en los apartados de material y métodos de sus capítulos correspondientes (Experimentos 5.2 y 5.8).

4.2. Parámetros ambientales del laboratorio de Crononutrición de la Universidad de Murcia

Las condiciones ambientales se mantuvieron constantes a lo largo de todo el periodo de experimentación y consistieron en un fotoperiodo de 12 horas de oscuridad y 12 horas de iluminación (12D:12L), con encendido de la luces a las 08:00 h; temperatura del agua a $23,0 \pm 0,5$ °C y salinidad comprendida entre 0 y 27,5‰, en función del experimento. El fotoperiodo se estableció, bien mediante el módulo informático de control del fotoperiodo diseñado específicamente para este laboratorio (MCF-8, Procam Ingeniería, S.L), que permitía cambios graduados de iluminación, o bien mediante un reloj programable

modelo Orbis-DataMicro 2. La temperatura del agua se determinó y controló mediante un sistema termostatzado de enfriamiento y calentamiento del aire del laboratorio. La salinidad se determinó mediante la utilización de un refractómetro manual (Leica Microsystems Inc., Búfalo, USA). Los nitritos, el amoníaco y el pH se revisaron periódicamente mediante pruebas comerciales para acuarios (Sera).

4.3. Peces empleados

En la realización de los diferentes experimentos, se utilizaron un total de 284 lubinas, con pesos medios corporales comprendidos entre 34 y 454 gramos, cedidos por la piscifactoría Culmarex, S.A. de Águilas y por el Instituto Español de Oceanografía de Mazarrón, ambos sitios en Murcia.

4.4. Elaboración de las dietas

Dependiendo del experimento, los peces fueron alimentados con una dieta completa granulada (Capítulo 5.1), con una dieta completa encapsulada en el interior de cápsulas de gelatina dura (Capítulos 5.1, 5.8 y 5.9), o mediante macronutrientes puros individualmente encapsulados en cápsulas de gelatina (Capítulos 5.1, 5.2, 5.3 al 5.7 y 5.9). Para la elaboración del alimento se utilizaron siempre los mismos ingredientes, en diferentes proporciones. Como fuente proteica se utilizó caseína libre de vitaminas y gelatina (5:1). Como fuente de grasa se utilizó aceite de hígado de bacalao y aceite de soja (3:1), los cuales se incluían en una matriz de sílice coloidal con el objetivo de obtener una grasa sólida, con excepción de las dietas empleadas en los experimentos descritos en los capítulos 5.1 y 5.9, en los cuales no se utilizó sílice coloidal y, por tanto, se añadieron los aceites en estado líquido. La fuente de carbohidratos utilizada fue dextrina. Todas las dietas contenían suplementos vitamínicos y minerales adecuados a la especie utilizada. En las dietas utilizadas en los experimentos referidos en los capítulos 5.1 y 5.9 se utilizaron celulosa y alginato sódico como aglutinante.

La composición obtenida tras el análisis de las diferentes dietas aparece indicada en la tabla 13. Las proporciones de macronutrientes han sido expresadas como porcentajes de macronutrientes totales, omitiendo cualquier otro componente que normalmente forma parte de una dieta para peces. La humedad fue determinada mediante desecación de las muestras a 110°C durante 24 h hasta peso constante; la proteína cruda fue calculada por el método de Kjeldahl, utilizando el factor 6,25 para la conversión de nitrógeno en proteína; la grasa cruda se obtuvo por extracción con dietil éter; las cenizas por incineración a 450°C durante 24 h hasta peso constante y el extracto libre de nitrógeno (NFE) fue calculado por sustracción de P cruda + F cruda + cenizas.

A causa de la naturaleza proteica de las cápsulas, una vez que están rellenas, aproximadamente el 17-19% de su composición, expresada como materia seca, se corresponde con la proteína procedente de su pared (Tabla 13).

Los gránulos de alimento fueron obtenidos forzando el paso de la mezcla a través de una máquina granuladora a presión, procediendo posteriormente a su cortado en gránulos

de aproximadamente 3 mm de longitud que fueron secados y almacenados en un frigorífico hasta su utilización. Las dietas encapsuladas fueron realizadas por rellenado de cápsulas de gelatina dura de 0,2 ml de volumen, nº 4, (Roig Farma, Barcelona), con polvo (cápsulas de pienso completo, P, CH y F) o aceite (cápsulas de F, capítulos 5.1 y 5.9), usando para ello una máquina encapsuladora semi-automática (Tencyfarma, Miranda de Ebro). Las cápsulas proporcionadas a un tanque dado eran almacenadas refrigeradas en una bolsa común durante un tiempo mínimo de 10 días para evitar que cualquier posible contaminación externa permitiera a los peces distinguir su contenido por sus propiedades químicas.

	Granulada	Encapsulada			
	Completa	Completa	P	F	CH
<i>Ingredientes (g/kg materia seca)</i>					
Caséina	425	430	783	-	-
Gelatina	85	90	157	-	-
Aceite de hígado de bacalao	148	158	-	705	-
Aceite de soja	49	52	-	235	-
Dextrina	198	210	-	-	940
Vitaminas y Minerales*	20	20	20	20	20
CaCO ₃ /CaPO ₄	40	40	40	40	40
Celulosa	30	-	-	-	-
Alginato sódico	10	-	-	-	-
<i>Análisis de las cápsulas (% materia seca)</i>					
Materia seca	91,8	92,8	90,2	98,8	90,5
Proteína bruta	54,8	57,3	90,8	17,1	18,8
Extracto etéreo	25,7	18,7	0,8	80,7	0,7
NFE	15,4	22,0	3,3	1,1	77,4
Cenizas	4,1	4,0	5,3	1,1	3,1
Energía bruta (kJ/g)**	25,5	23,7	22,2	35,8	17,8

* Vitaminas y minerales (mg/kg dieta): Vitamina A, 20.000 (IU/kg dieta); Vitamina D, 8.000 (IU/kg dieta); Vitamina E, 240; Vitamina C, 1800; Vitamina K, 20; Vitamina B1, 50; Vitamina B2, 50; Vitamina B6, 33; Vitamina B12, 0,08; Biotina, 1,52; Ácido pantoténico 180; Ácido fólico, 15; Nicotinamida, 300; Inositol, 350; Betaina, 3500; Polipéptidos, 240; Betaglucanos, 100; Zn, 0,4; Se, 0,4; I, 10; Fe, 4; Cu, 3; Mg, 115; Co, 0,4; Met, 24; Cis, 18; Lys, 28; Arg, 12; Pha, B; Trp, 14.

** Calculado a partir del porcentaje medio de macronutrientes utilizando los siguientes coeficientes de energía: 23,8 kJ/g para proteínas; 38,9 kJ/g para grasa; y 16,7 kJ/g para carbohidratos (Miglefs y Jabling, 1989).

Tabla 13. Ingredientes y composición de las dietas tras el análisis del pienso granulado y de los cuatro tipos de cápsulas utilizadas, expresados como la media (n=4).

4.5. Diseño experimental general

En los experimentos que implicaban selección de macronutrientes puros encapsulados, a los peces se les suministró un número igual de cápsulas por macronutriente en cantidad superior a la que los peces podían consumir para cada uno de ellos. El alimento permanecía disponible para los peces flotando en la superficie del agua por un tiempo de 30 minutos (de 14:00 a 14:30 h), transcurrido el cual las cápsulas no consumidas eran recuperadas de la superficie del agua con un salabre y contadas para determinar la ingesta real

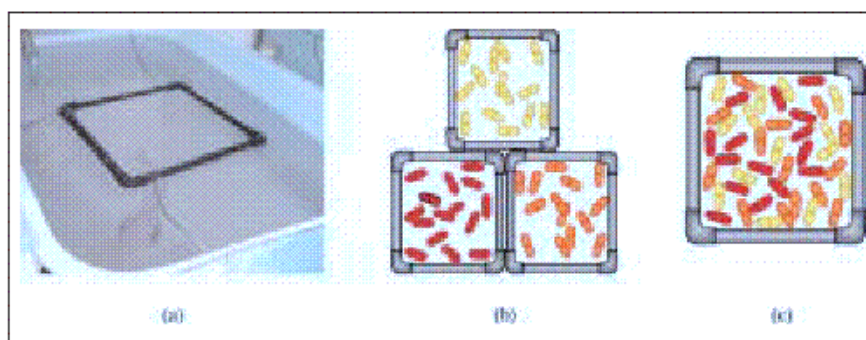


Figura 16. Fotografía de un tanque mostrando: (a) el comedero flotante donde se situaba el alimento encapsulado; (b) dibujo que muestra el triple comedero flotante utilizado en el capítulo 5.4, con las cápsulas alojadas en su interior; (c) dibujo que muestra el único flotador utilizado en los capítulos 5.1, 5.3-5.7 y 5.9.

de cada macronutriente. Las cápsulas fueron alojadas en un comedero flotante o flotador (Figura 16), para facilitar el acceso de los peces a las mismas, evitando que éstas se desplazaran hacia las paredes del tanque.

Dado que las cápsulas de macronutrientes poseían las mismas propiedades organolépticas, los macronutrientes fueron codificados mediante color, asignando a cada macronutriente un color concreto. Dicha relación color-macronutriente se mantuvo durante todas las fases experimentales en un mismo tanque, pero esta relación fue balanceada entre tanques, para evitar el efecto de posibles preferencias por el color.

En los experimentos que implican la administración de diferentes sustancias (hormonas, neuropéptidos, macronutrientes...) con el objetivo de determinar su efecto en la ingesta de alimento y el patrón de selección de macronutrientes, la sustancia era suministrada a los peces en el interior de una cápsula inicial, que poseía un color diferente al de los macronutrientes puros, para evitar posibles efectos en la posterior selección de los mismos. En todos los experimentos durante los 5 ó 10 primeros días (dependiendo de la duración del experimento) la cápsula era un placebo, conteniendo sólo pienso completo en polvo, el cual se utilizaba posteriormente como excipiente para las diferentes sustancias. La ingesta y el patrón de macronutrientes obtenidos durante esta fase placebo eran utilizados como línea base. En los 5 ó 10 días posteriores la cápsula inicial contenía la sustancia a probar a las diferentes dosis seleccionadas. Al final de las diferentes fases experimentales, se procedía a repetir la fase placebo, la cual servía como segundo control de la ingesta normal. Una vez ingerida la cápsula inicial se dejaban transcurrir 45 minutos y se suministraba el alimento a los peces, en la forma que se ha indicado con anterioridad.

4.6. Parámetros biológicos

Los parámetros utilizados para la caracterización del crecimiento y la eficacia alimentaria fueron los que se detallan a continuación:

• **Biometría:** el peso se determinó mediante un dinamómetro digital con 1 g de error, y la longitud mediante una plantilla graduada en milímetros.

• **Ganancia media de peso y longitud:** se calculó el incremento de peso y longitud para cada individuo. Cuando los peces se encontraron alojados en grupos se consideró que los peces de mayor talla se correspondían con los de mayor talla en todas las pesadas y que los más pequeños mantenían su talla relativa en las sucesivas pesadas. Posteriormente, se calculó el valor medio del incremento de peso y longitud en cada grupo.

$$GMP = \frac{(\Sigma AP)}{n} \quad GML = \frac{(\Sigma AL)}{n}$$

• **Tasa de crecimiento específica o tasa de crecimiento instantáneo en peso:** indica el aumento en peso experimentado por el pez, expresado como porcentaje de su peso corporal, al día. Expresa la evolución de la tasa de crecimiento siguiendo una curva sigmoïdal. Para su cálculo se utilizaron los valores del peso medio inicial y final.

$$SCR = \frac{\ln (\text{biomasa final (g)}) - \ln (\text{biomasa inicial (g)})}{\text{tiempo de días}}$$

• **Índice de conversión:** expresa la cantidad de alimento ingerido en gramos que invierte el pez para aumentar un gramo de peso.

$$IC = \frac{\text{alimento dispensado (g)}}{\text{incremento de biomasa (g)}}$$

4.7. Tratamiento y análisis de datos

A partir de los valores obtenidos en los diferentes estudios se calculó la media, la desviación estándar y el error estándar de la media (EEM). El alimento y la energía ingeridos fueron expresados como g por 100 g de peso corporal por día (g/100g p.c./día) y como kJ/100g p.c./día, respectivamente. La energía digestible fue estimada utilizando los siguientes coeficientes (kJ/g): 33,4 para la F; 18,8 para la P y 14,6 para los CH (Shimeno *et al.*, 1995). La energía bruta fue calculada utilizando los siguientes índices de conversión (kJ/g): 38,9 para la F; 23,6 para la P y 16,7 para los CH (Miglav y Jobling, 1989). Para suavizar la amplitud de fluctuaciones entre días, observadas en la ingesta de alimento de peces individuales, se utilizó una media móvil de tres términos.

Los resultados aparecen expresados generalmente como la media con su correspondiente error estándar. El análisis estadístico de los datos que se detalla a continuación se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS 10.0 para Windows (Copyright 1989-2001). En función de los experimentos se realizó la prueba t para muestras independientes o el análisis de la varianza unifactorial (ANOVA) y las pruebas de Tukey, Bonferroni o T de Dunnett para la comparación de las medias. El nivel de probabilidad de $P < 0,05$ fue utilizado para establecer los efectos estadísticamente significativos.

4.8. Videograbación

En el primer experimento (Capítulo 5.1), se instaló una cámara de video (Sony, Handycam CCD-TR511E) para comprobar el comportamiento de lubinas alimentadas mediante alimentos encapsulados.

Trabajo experimental



Physiology & Behavior 78 (2003) 793–803

**PHYSIOLOGY
&
BEHAVIOR**

Macronutrient selection through postingestive signals in sea bass fed on gelatine capsules

V.C. Rubio^a, F.J. Sánchez-Vázquez, J.A. Madrid^aDepartment of Physiology, Faculty of Biology, University of Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain

Received 2 September 2002; revised in revised form 28 February 2003; accepted 12 March 2003

Abstract

The role of the food sensory properties on protein (P), fat (F) and carbohydrate (CH) self selection was investigated in fish fed gelatine capsules containing pure macronutrients. A total of 40 sea bass (39.6±6.2 g initial body weight) distributed in eight 75 l tanks were used. In a sequence of experimental phases, sea bass were fed a pelleted complete diet, an encapsulated complete diet or a combination of separately encapsulated pure macronutrients. In order to induce associative learning, capsules containing a given macronutrient were paired with a particular colour. Our results demonstrate that fish are able to regulate food intake, so as to balance their energy intake, when they are fed a complete encapsulated diet and, therefore, without using the sensory properties of the diet. Moreover, sea bass learn to discriminate and select, among colour coded, pure macronutrient capsules to compose a complete and balanced diet using colour as the only external cue. The composition of selected diet was 55% P, 23% CH and 22% F in terms of macronutrient percentage. The diet sensory properties do not seem to be necessary to regulate macronutrient intake either, suggesting that an associative learning between capsule colour and content can be established through monitoring of macronutrient intake by postingestive and/or postabsorptive mechanisms. These results provide the first insight into energy and macronutrient self selection by fish fed on gelatine capsules containing separate macronutrients.

© 2003 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: Macronutrient selection; Associative learning; Gelatine capsules; Orientation; Fish; Energy regulation

1. Introduction

Food intake regulation is the main component of energy balance, and hence of body weight control. Regulatory mechanisms have been very often restricted to the issue of energy regulation, but an increasing body of evidence points to the existence of complex mechanisms involved in the regulation of macronutrient intake [1,2].

Although in nature some animals subsist on a single diet, most compose a complete diet by selecting from various food items of different nutrient composition [3,4]. This selection is not a secondary effect of the variety of food available, since when animals have many foodstuffs at hand they select them so as to make up a balanced diet adapted to their physiological needs.

Several mechanisms, involving both learning and physiological processes, have been proposed to explain the

existence of food preferences. With regard to learning processes, it has been argued that once a food item is consumed, animals learn to associate its sensory properties (taste, smell and texture) with its postingestive consequences. For example, if an animal ingests a toxic food it will develop a conditioned aversion to its flavour, whereas if the postingestive effects are positive the animal will acquire a preference for its flavour [5]. Such flavour-nutrient associations appear to be learned through individual experience influenced by parental and other social interactions [5].

Regarding physiological mechanisms, some authors have proposed different innate processes to explain the existence of specific appetites for macronutrients. Rats appear to have an innate preference for the taste of some nutrients such as sugar, maltodextrins, some types of starch, fats (F) and proteins (P) [6–8]. In addition, there are examples of neurotransmitters, such as serotonin, dopamine, neuropeptide Y and galanin, which differentially affect the consumption of F and carbohydrate (CH) [9,10].

* Corresponding author. Tel.: +34-968-364-931; fax: +34-968-363-963.

E-mail address: vicent@um.es (V.C. Rubio).

One of the mechanisms that have been proposed for macronutrient discrimination, whether through learning or innate processes, is based on oropharyngeal detection of the sensory characteristics of food. Smelling, tasting and swallowing food is the first step to evaluate its energy and qualitative composition. To date, however, no studies have been conducted to determine whether macronutrient self-selection can be achieved if the different macronutrients have identical flavour and texture. Methodological reasons, such as the lack of manufacturing technology to make diets of different composition but equal orosensory properties or the difficulty to find good animal models to try these diets, have been the determining factor for this lack of information.

A feasible methodology to provide different macronutrients (CH, F and P) with the same flavour and texture is that of packaging them into gelatine capsules. Yet, the use of such a feeding system is restricted to a few species that can swallow whole capsules without masticating and tasting its content before ingestion [11,12]. Preliminary studies conducted in our laboratory clearly indicate that European sea bass fulfils this requirement and, therefore, can be used as a suitable model for macronutrient self-selection studies using gelatine capsules [13].

Previous studies have shown the ability of some fish species, such as goldfish [14], rainbow trout [15] and European sea bass [16], to feed themselves using self-feeders that selectively deliver pure macronutrient pellets. These studies demonstrate that fish can regulate their energy intake by selecting from different macronutrient diets, composing a complete diet matched to their specific nutritional habits (carnivorous or omnivorous). The central role played by chemosensitivity in fish, however, could mask their real macronutrient preferences due to the presence of unlearned specific attractants or repellents in macronutrient diets [17]. Despite the large number of reports devoted to macronutrient self-selection, the ability of animals to discriminate and select a nutritionally balanced diet from individually encapsulated macronutrients with identical flavour and texture has never been explored.

It is conceivable that processing of the natural macronutrient physicochemical properties at the oral level could contribute to, or be necessary for, the regulation of macronutrient selection and energy intake. To evaluate this hypothesis, the present study examines the ability of sea bass, a fish that can swallow entire gelatine capsules and exhibit high oral chemosensitivity, to feed on and select among three macronutrient diets, each one containing a single macronutrient (P, F or CH). Experimental diets were packaged into colour-coded gelatine capsules (red, yellow or orange) which fish had to choose from to compose a balanced diet. Regulation of food and energy intakes, influence of capsule colour and position in which capsules were offered, evolution of macronutrient preferences and dynamics of colour-macronutrient association relearning were evaluated.

2. Methods

2.1. Animal housing

The present studies were conducted at the Chronobiology Laboratories of the University of Murcia on sea bass hatched and raised in captivity at the "Instituto Español de Oceanografía" (Mazarrón, Murcia, Spain). A total of eight groups of five fish each, with an initial body weight of 39.646.2 g (mean±S.D.), were used in the experiment. Fish were housed in 75-l tanks with a continuous supply of filtered salt water from a common recirculating system. Marine water was prepared by adding synthetic sea salt (Premium, Sena) to dechlorinated tap water until the appropriate density was reached. The tanks were placed in a controlled environmental chamber in which the ambient temperature was regulated to maintain a constant water temperature of 23.40.5 °C throughout the experiment. The tanks were illuminated 12 h a day (from 08:00 to 20:00) by means of overhead fluorescent lamps (national, 15 W) providing a mean light intensity at the water surface of 330 lx.

Sea bass were allowed to acclimatize to laboratory conditions for several weeks, a time during which they were fed a pelleted, complete diet containing all three macronutrients at a practical level (57% P, 16% CH, 27% F) and supplied once a day *ad libitum*.

2.2. Diet manufacture

Depending on the experimental phase, fish were fed either a pelleted complete diet or gelatine capsules. The same ingredients, although in different proportions, were used to manufacture all diets, whose analytical compositions are given in Table 1. Macronutrient proportions are expressed as percentages, omitting any other compounds which normally make up a fish diet. Vitamin-free casein and gelatine (5:1) were included as P source, fish oil and soybean oil (3:1) as F source and dextrin as CH source. All diets included mixtures of vitamins and minerals, as well as sodium alginate and cellulose as binder and filler, respectively. Pellets were made by forcing the mixture through a gastric press and then cutting it into approximately 3-mm lengths that were dried and stored in a freezer until used.

Encapsulated diets were made by filling 0.2-ml gelatine capsules (Roig Farma, Barcelona, Spain), No. 4, with either

Table 1
Capsule composition by proximate analysis

	Complete	P	CH	F
Crude protein (% DM)	57.3	90.8	18.8	77.1
Ether extract (% DM)	16.7	2.6	0.7	78.7
NFE (% DM)	21.6	1.3	77.3	2.9
Ash (% DM)	4.4	5.3	3.2	1.3
Moisture (%)	7.3	9.9	9.8	0.9

powder (P and CH capsules) or oil (F capsules), using an automatic encapsulation machine (Tencylatma, Spain). All capsules were supplemented with vitamin and mineral complexes. Because capsules are made mainly of gelatine, once they are filled, approximately 17–19% of their dry composition corresponds to the P content of their wall (see Table 1). All macronutrient capsules that would be used in a given tank were stored in a common bag, so that they would share any external contamination if not fish could use it to distinguish their composition. Diet moisture was determined by drying samples for 24 h at 110 °C to constant weight, crude P was calculated by Kjeldahl ($N \times 6.25\%$), crude F by diethyl ether extraction, ash by heating at 450 °C for 24 h and nitrogen free extract (NFE) as the remainder of crude P+crude F+ash.

2.3. Experimental design

The experiment lasted for 110 days arranged in six experimental phases as shown in Fig. 1. The independent variables were: encapsulation, capsule location in the tanks and capsule colour and macronutrient composition.

As a first step, we evaluated whether sea bass were able to regulate food intake when fed an encapsulated diet, and whether they showed any preference for a particular capsule colour, by comparing the intake of a pelleted complete diet (Phase 1) with the same diet packaged into gelatine capsules of different colours (Phase 2). During Phase 1, fish were fed once a day for 12 days, with pellets located inside a container placed at the bottom of the tank from 12:00 to 12:30 h. Food intake was calculated by weighing the remaining feed after drying. In Phase 2, fish received the same complete diet but packaged into gelatine capsules for 19 days. Every day at 12:00 p.m., they were offered 30–60 capsules distributed into three sets of 10–20 floating cap-

sules of each colour (red, orange and yellow) according to their biomass evolution. Each colour was randomly confined into a different floating container as indicated in Fig. 1. After 30 min, the remaining capsules were removed and counted.

In order to test the ability of fish to discriminate and differentially ingest macronutrients individually packaged into capsules (Phase 3), fish were fed with colour-coded capsules containing either P, F or CH. The same colour–macronutrient relationship was maintained in a given tank throughout all experimental phases (except in Phase 5), but this relationship was balanced between tanks. To control for the possible influence of the capsules' position in the floating containers, every 10 days they were rotated clockwise one position at a time until a full rotation was completed.

Phase 4 was designed to analyse the ability of fish to discriminate macronutrient capsules when they are all presented together in a single position. For 14 days, fish were offered the three colour macronutrient capsules all mixed into the same floating container.

In order to examine whether fish were able to use external cues, other than capsule colour, to identify their macronutrient content, the dynamics of capsule selection was studied after switching the colours associated to each macronutrient (Phase 5). During 21 days fish were fed the same macronutrient diets but each one packed into a different colour capsule than in previous experimental phases, so that former P capsules now contained CH, F capsules were filled with P and former CH capsules now contained F (Fig. 1).

Finally, fish were submitted to a new control phase in which they were fed the complete diet packed into gelatine capsules of all three colours mixed in the same floating container (Phase 6).

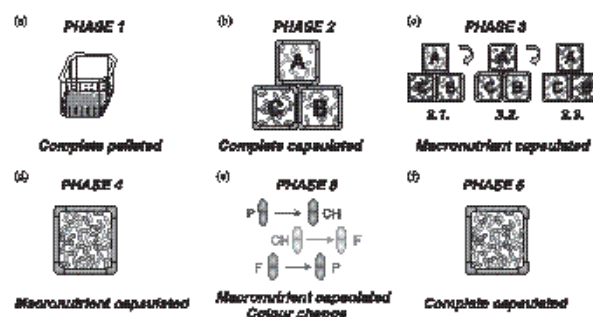


Fig. 1. Schematic illustration of the experimental phases in which the experiment was divided according to the feeding conditions: a complete pelleted diet (a), a complete diet encapsulated into three different colour capsules placed in separate (b) or the same container (d), colour-coded individually encapsulated macronutrients placed in separate (c) or the same container (e) and encapsulated macronutrient after having changed the colour–macronutrient relationship (e). In Phase 3 (c), containers were rotated one place at a time every 10 days to control for position.

Throughout the experimental period, fish were weighed at the beginning of each experimental phase.

2.4. Data analysis

Food intake and digestible energy (DE) were expressed as g/100 g b.w./day and kJ/100 g b.w./day, respectively. The DE of diets was estimated using the following values (kJ/g): 33.4 for F, 18.8 for P and 14.6 for CH [18]. A three-term moving average was used before the analysis in order to smooth the wide between-day amplitude fluctuations observed in individual fish food intake. Mean daily food and energy intake differences for the pelleted versus encapsulated complete diet were statistically compared by an independent samples *t* test. Observations on macronutrient intake were analyzed using an ANOVA, with capsule colour, position and macronutrient content as factors. Tukey's test was used to make pairwise comparisons between means. Probability levels of $P < 0.05$ were used to judge whether effects were statistically significant.

3. Results

Naive fish started to ingest gelatine capsules of different colours the very first day there were offered to them. Sea bass exhibit a typical predatory behaviour consisting in the rapid ingestion of entire capsules. Videotape

recording of sea bass feeding behaviour revealed that fish swallowed whole capsules without breaking its covering. The rate of capsule intake progressively increased until the fourth day, when it reached a similar level to that of the pelleted diet. From then on and up to the end of the experiment, the number of capsules ingested only exhibited small fluctuations. Considering that the encapsulated diet used in Phase 2 lacked the organosensory properties of the pelleted diet, weight and/or energy consumption differences might have been expected. Yet, encapsulation into gelatine capsules did not significantly modify daily food intake, whether in terms of weight ($P = 0.13$), where the mean of intake for Phases 1 and 2, expressed as g/100 g b.w., was 1.09 and 1.04, respectively, or energy ($P = 0.10$) (Fig. 2).

Since diet encapsulation masks the texture and chemosensory properties of the diet by delivering the capsule content directly into the stomach [12], fish lose the most important external signals to evaluate nutrient quality and density. Thus, they have to be provided alternative external cues, paired to the capsule macronutrient content (unconditioned stimulus, US), which may be used as a conditioned stimulus (CS). In these experiments we initially use two different CS: capsule colour and position in the tank. To rule out the possible existence of unlearned preferences for a particular colour, we evaluated the intake percentages of different colour capsules filled with complete diet and supplied in either three separate positions (Phase 2) or a common position (Phase 6). As shown in Fig. 3, no

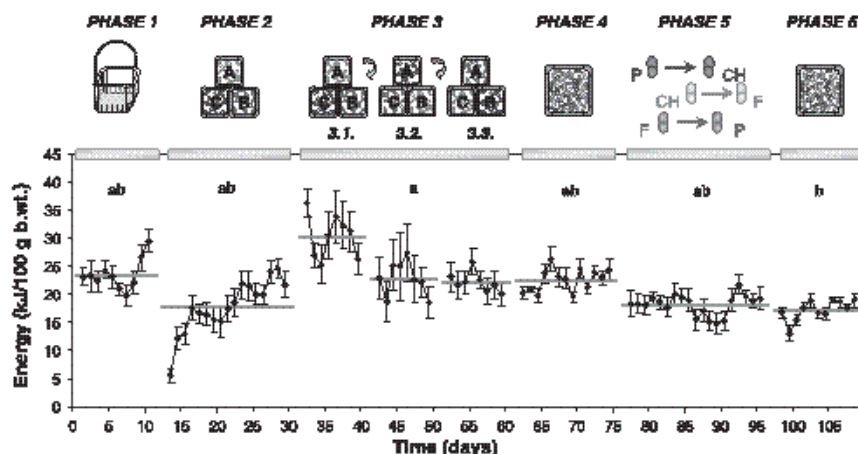


Fig. 2. Average daily energy intake of sea bass fed a complete pelleted diet followed by a series of encapsulated diets under different conditions (see Fig. 1 for details on experimental phases). Values represent the mean $\pm$ SE of eight fish groups. Different superscripts indicate significantly different values (ANOVA, $P < 0.05$).

Y.C. Rubin et al. / Physiology & Behavior 78 (2003) 707–803

799

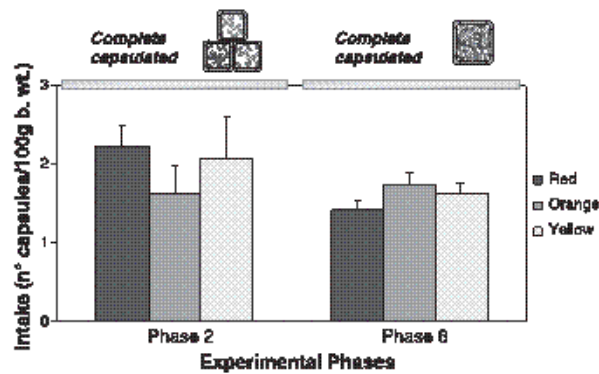


Fig. 3. Influence of colour on the daily intake of gelatine capsules containing a complete diet (Phases 2 and 6). Values represent the mean $\pm$ SE of eight fish groups. No statistically significant differences were found.

statistically significant differences were found in terms of fish preference for any given colour [$F(2,23)=1.73$, $P=.21$ in Phase 2 and $F(2,23)=2.45$, $P=.10$ in Phase 6].

During Phases 2 and 3, capsule content was also paired to a second CS, its position in the floating containers. Position A (closest to the water inlet) was the preferred position, whereas no statistical differences were detected between positions B and C (Fig. 4). These results were obtained in Phase 2, in which all capsules contained the same complete diet [$F(2,23)=8.248$, $P=.004$], and also in Phase 3, where each position was paired to a pure macro-

nutrient, balancing the position–macronutrient association between all tanks [$F(2,23)=6.64$, $P=.079$]. Since fish displayed a preference for position A, in Phase 3, and to prevent a masking effect on macronutrient selection, containers were rotated clockwise one position at a time every 10 days.

Naive fish fed on gelatine capsules containing separate macronutrients progressively increased their intake of P-containing capsules, a tendency matched by a simultaneous decrease of F-containing capsules, and very small changes in the ingestion of CH capsules (Fig. 5, Phase 3.1). After the

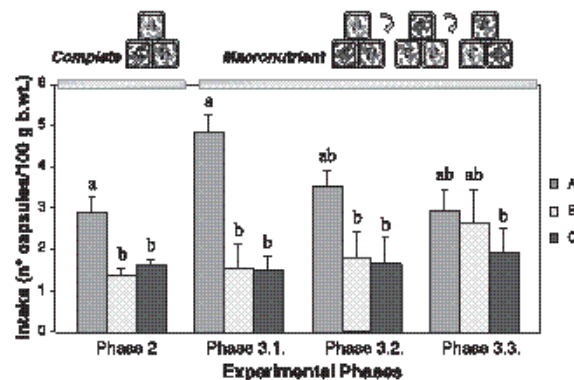


Fig. 4. Effect of capsule position (A = near the water inlet, B, C = near the wall of the tank) on the intake of capsules containing either a complete diet (Phase 2) or single macronutrients in all three retained positions (Phase 3). Values represent the mean $\pm$ SE of eight fish groups. Different superscripts indicate significant differences within the same phase. $P < .05$ (ANOVA).

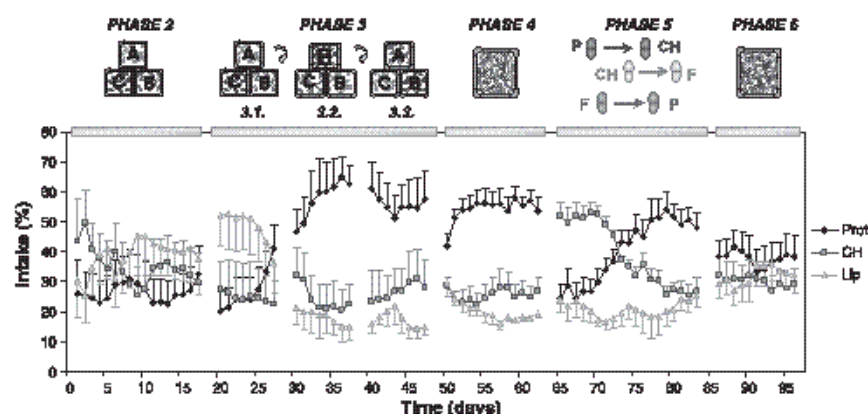


Fig. 3. Evolution of macronutrient intake in fish fed gelatine capsules containing P, F or CH. The illustrations on top of the graph represent the experimental phases. In Phases 2 and 6, capsules were filled with a complete diet, whereas in all other experimental phases they contained single macronutrients. Values represent the mean $\pm$ S.E.M. of eight fish groups.

first container rotation, fish continued increasing their ingestion of P capsules until it reached a steady level of about 60%, whereas CH and F capsule intake remained at a level of around 20% and 15%, respectively (Fig. 3, Phase 3.2). Once the steady state was reached, a second rotation did not induce any significant macronutrient preference change (Fig. 3, Phase 3.3).

To avoid a possible masking effect of capsule position and determine whether fish are still able to discriminate among capsules based only on their colour, in Phase 4 all macronutrient capsules were supplied mixed in a single container (Fig. 3). During the first 2–3 days, fish were apparently unable to discriminate between macronutrients, but in a few days their intake levels reached values similar to those of the previous phase, with macronutrient ingestion levels displaying statistically significant differences among themselves [$F(2,23)=24.39$, $P<0.001$].

Should fish exhibit a very high oral sensitivity to chemical substances present in the food [17], distinguishing macronutrient capsules could possibly be due to external contamination with their internal content, rather than colour. To test this possibility, in Phase 5 the colours paired to each macronutrient in previous phases were rearranged. As Fig. 3 shows, fish started ingesting about 60% of CH (former P) capsules and low levels of P (former F) and F (former CH) capsules, as it was expected from their previous content. Within one week, however, this pattern progressively changed, and fish exhibited a tendency to increase P and decrease CH, with minor changes in F, until they reached the same macronutrient intake pattern displayed in Phase 4. Statistically significant

macronutrient intake differences were found one week after the colour change [$F(2,23)=7.32$, $P=0.008$].

Finally, fish were returned to the three colour capsules (Phase 6, Fig. 3) filled with complete diet, and as it was the case for Phase 2, no preference for a particular colour was detected.

From the above experiments, it seems clear that fish are able to discriminate and select from different macronutrient capsules to make up their own complete diet. Considering all experimental phases in which fish were fed separate macronutrient capsules (Phases 3, 4 and second half of Phase 5), P was the main macronutrient chosen by fish (49% of total DB), followed by F and CH (33% and 18% DB, respectively).

4. Discussion

The present results clearly show that sea bass can regulate their macronutrient intake even when they are fed macronutrient diets with the same sensory properties at the oropharyngeal level. Thus, fish were able to discriminate and evaluate the quality of encapsulated diets through postlingestive processes (i.e. chemosensory detection at gastrointestinal levels) and/or postabsorptive mechanisms. This information can be used by the fish to develop an associative learning between the colour and nutrient content of gelatine capsules.

As Booth and Thibault [19] have stated, to demonstrate the existence of nutrient selection paradigms, at least two versions of each macronutrient that are altogether

sensorily distinct must be tested. However, the difficulty of this type of experiments, which arises from the intrinsically different organoleptic properties of macronutrients, can be avoided furnishing diets with the same external texture/chemical composition, e.g. using gelatine capsules.

There are two reasons for using a fish as an animal model to study the role of food organoleptic properties on energy and macronutrient regulation using gelatine capsules. Firstly, teleost fish have multiple chemosensory systems, including taste, smell, chemical common sense and isolated chemosensory cells, which attest to the extraordinary importance of chemical senses in this animal group [17]; secondly, many fish such as European sea bass, turbot or rainbow trout usually swallow particulate food without chewing, a prerequisite for using gelatine capsules [11–13].

It has been generally accepted that animals learn to associate the organoleptic properties of the diet with its nutritional composition. Thus, when a selective appetite for a nutrient is elicited, animals select food items that are especially rich in that particular macronutrient, using the chemical, visual and mechanosensory properties of food as cues. Both innate and learned mechanisms have been put forward to explain the existence of such a discriminating ability. In some animals, the existence of an unlearned specific appetite for some nutrients has been proposed. Some fish respond to very small amounts of L-amino acids in their water supply using their skin and barbel receptors [20], and this unlearned preference for flavours justifies the use of attractants to supplement commercial animal diets.

An alternative explanation for the exhibition of a preference for specific types of food items by animals may be associative learning, a phenomenon widely reported in many different animal species. Simpson and White [21] demonstrated that locusts develop learned associations between plant-derived odours and the P content of foods. In the same insect, Raubenheimer and Tucker [22] reported the existence of associative learning in response to pairing visual cues with P and CH consumption. A similar nutrient-specific learning has also been shown in rats, which learn to associate odours [23] and food texture [24] with specific macronutrients. These examples of learning can be considered as a typical form of classical (Pavlovian) conditioning, with the type of macronutrient acting as the US and the particular sensory characteristic (odour, taste, etc.) to which it is paired, as the CS [5].

To demonstrate the existence of associative learning between food colour and nutrient composition, we used pure macronutrients separately packaged into gelatine capsules. This experimental procedure ensures that macronutrients are delivered through a postoral route, which eliminates nutrient flavour as a possible US. Gelatine capsules have been previously used by Ruohonen et al. [11] to feed rainbow trout, demonstrating that capsule

dissolution occurs in the stomach in less than 20 min at 5–20 °C [12].

Obviously, if all perceptual differences between diets were eliminated, animals could not resort to any external cue for diet discrimination and selection. In our experiments, we used two external cues: capsule position and colour. Concerning position, animals displayed a strong tendency to select capsules from a particular position irrespective of their composition, a potentially masking effect that we avoided by rotating the containers (Phase 3) or supplying all capsules mixed in a single container (Phases 4–6). The latter procedure (Phases 4, 5) did not impair the ability of fish to discriminate between colour-coded macronutrient capsules. With regard to colour, fish did not show any colour preference when all gelatine capsules were filled with the same complete diet (Phase 2).

Previous studies have shown that animals can adjust their food intake to maintain a constant level of energy intake when faced with food nutritional composition changes, including dietary dilution with nonnutritive compounds or food splitting into three macronutrient diets [14,15,25]. To our knowledge, however, no attempt has been made to demonstrate the existence of such regulation when all food items present identical organoleptic properties. In such circumstances, fish fed on capsules containing a mixed diet reach an energy intake level similar to that of the previous ingestion of a nonencapsulated diet. These results suggest that information from oropharyngeal receptors is not the only sensory information involved in energy intake regulation and, in addition, that these other mechanisms are sufficient for such regulation to occur. Regulation of energy intake from three separate diets, each one containing a pure macronutrient, is a more difficult challenge. This ability was first demonstrated by Sanchez-Vázquez et al. [14,15] in goldfish and rainbow trout offered the possibility of selecting among three different macronutrient diets by means of self-feeders. Again, our results demonstrate that the energy regulation from separate macronutrient sources can be achieved in the absence of information from oropharyngeal receptors.

Aside from energy regulation, there exists the problem of macronutrient intake regulation. Macronutrient selection has been widely studied in mammals ever since the studies of Richter et al. [1] in rats. Since then, the ability of mammals and birds to compose a complete diet from macronutrient sources has been widely demonstrated [2,5,7,10,19,23]. The existence of selective appetites for macronutrients has also been shown in several fish species fed on pelleted diets [14–16] but, so far, no studies have addressed macronutrient selection using encapsulated diets. As it was the case with energy regulation, European sea bass is able to select encapsulated macronutrients without using oropharyngeal receptors to evaluate the composition of the ingested diet. This appears to be an acquired ability, because it takes about 15 days for fish to reach a steady-state level of macronutrient intake. Capsule selection is

based on colour–macronutrient pairing rather than position, since very soon after moving all capsules to a common position, fish are able to regain their previous levels of macronutrient selection.

That fish use capsule colours to identify their contents is supported by the fact that after changing the colour paired to each macronutrient, fish continue to ingest capsules in proportions according to their previous colour label. In our experiments, this was the case for the first 5 days following the colour change, but afterwards macronutrient selection progressively started to shift, and within 15 days fish had regained their previous macronutrient selection levels (Fig. 5). This temporal profile is similar to that displayed by fish when they received encapsulated macronutrients for the first time, indicating that colour, and not external contamination of capsules with their internal contents, is the cue used by fish to discriminate between capsules.

The final diet composition selected by fish from encapsulated macronutrients (49% P, 33% F and 18% CH) is very similar to a previously reported pelleted diet (54% P, 32% F and 14% CH) self-designed by this species using self-feeders [16], indicating that the diet organoleptic properties are not necessary for macronutrient intake regulation in order to compose a complete diet adapted to the particular nutritional needs of the animals.

Taken together these results suggest that sea bass develop an associative learning between the colour (CS) and macronutrient content (US) of gelatine capsules, the latter being delivered directly into the stomach. One possibility is that macronutrient release into the stomach, and its subsequent passing into the intestine, may be detected by gastrointestinal receptors that activate nervous and/or endocrine pathways to inform brain centres on the nutritive properties of the intake. It is also possible that the postabsorptive effects of ingesting an unbalanced diet somehow prompt brain centres, through still unknown mechanisms, to select different colour capsules.

In summary, these results confirm the ability of fish to regulate energy and macronutrient intake, and they are the first evidence of the ability of an animal species to discriminate the macronutrient composition of encapsulated feed using only its colour as conditioned stimulus.

Acknowledgements

This research was supported by grants from the "Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT)" projects MAR98-0446 and AGL2001-0698 to J.A. Madrid, and by the "Consejería de Trabajo y Política Social, Fondo Social Europeo" and "Fundación Séneca" (Integrated Operative Program for CARM 2000–2006 of FSB to V.C. Rubio). We are also grateful to the "Instituto Español de Oceanografía de Mazarrón" for kindly providing the animals. The authors

thank Rui Sá for his valuable criticisms and comments of the manuscript.

References

- [1] Richter CP, Holt LE, Baclare B. Nutritional requirements for normal growth and reproduction in rats studied by the self-selection method. *Am J Physiol* 1938;122:734–44.
- [2] Berthoud HR, Seeley RJ. Neural and metabolic control of macronutrient intake. Boca Raton: CRC Press; 2000.
- [3] Carlson NR. Ingestive behavior. In: Carlson NR, editor. *Physiology of behavior*. Boston: Allyn and Bacon; 1994. p. 393–429.
- [4] Kaiser MJ, Hughes RM. Factors affecting the behavioural mediators of diet selection in fishes. *Adv Behav Physiol* 1993;23:103–18.
- [5] Sclafani A. Macronutrient-conditioned flavor preferences. In: Berthoud HR, Seeley RJ, editors. *Neural and metabolic control of macronutrient intake*. Boca Raton: CRC Press; 2000. p. 93–106.
- [6] Adreoni K, Vigorelli M, Sclafani A. Fat appetite in rats: the response of infant and adult rats to nutritive and nonnutritive oil emulsions. *Appetite* 1990;15:171–88.
- [7] Deutsch JA, Moore BO, Houtchens SC. Unlearned species-specific appetite for protein. *Physiol Behav* 1989;46:619–24.
- [8] Sclafani A. Sweet and sugar tastes in rodents: an update. *Brain Res Bull* 1991;27:383–86.
- [9] Lebowitz SF, Husbelt BG. Behavioral neuroscience and obesity. In: Bray G, Bouchard C, James PT, editors. *The handbook of obesity*. New York: Marcel Dekker; 1999. p. 313–39.
- [10] Lebowitz SF. Macronutrients and brain peptides: what they do and how they respond. In: Berthoud HR, Seeley RJ, editors. *Neural and metabolic control of macronutrient intake*. Boca Raton: CRC Press; 2000. p. 389–406.
- [11] Ruckert K, Grove DJ, McIlroy JT. The amount of food ingested in a single meal by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed dry and wet diets. *J Fish Biol* 1997;51:93–103.
- [12] Ruckert K, Grove DJ. In situ study of gastric emptying using X-radiography and microcapsules. *Aquac Res* 2001;32:491–3.
- [13] Rubio VC, Sánchez-Vázquez FJ, Madrid JA. Macronutrient self-selection in European sea bass using microencapsulated nutrients. Fourth and Final Workshop of COST 377 action on Voluntary Food Intake in Fish. Reykjavik 2001:44.
- [14] Sánchez-Vázquez FJ, Yamamoto T, Akuyama T, Madrid JA, Tabata M. Selection of macronutrient by goldfish operating self-feeders. *Physiol Behav* 1998;63:211–8.
- [15] Sánchez-Vázquez FJ, Yamamoto T, Akuyama T, Madrid JA, Tabata M. Macronutrient self-selection through demand-leaders in rainbow trout. *Physiol Behav* 1999;66:43–51.
- [16] Arienda A, Sánchez-Vázquez FJ, Zattera S, Madrid JA. Self-design of diets by means of self-feeders: validation of procedures. *J Physiol Biochem* 2000;36:153–66.
- [17] Lamb CF. Gustation and feeding behaviour. In: Houlihan D, Bouquard T, Jobling M, editors. *Food intake in fish*. Great Britain: Blackwell Science; 2001. p. 109–30.
- [18] Shimoto S, Kheyyah D, Shikata T. Metabolic response to dietary lipid to protein ratios in common carp. *Fish Sci* 1993;61:977–80.
- [19] Beeth D, Thibault L. Macronutrient-specific hunger and satiety and their neural bases. Insights from pre- and post-ingestive effects of eating particular foodstuffs. In: Berthoud HR, Seeley RJ, editors. *Neural and metabolic control of macronutrient intake*. Boca Raton: CRC Press; 2000. p. 61–91.
- [20] Wigen S, Caprio J. Receptor sites for amino acids in the brain taste systems of the channel catfish. *J Comp Physiol (A)* 1991;168:201–11.
- [21] Simpson SJ, White PR. Associative learning and food feeding. *Adv*

- direct for a "learned hunger" for protein. *Anim. Behav.* 1999;40:506–13.
- [22] Raubenheimer D, Tuckie D. Associative learning by taste: pairing of visual cues with consumption of protein and carbohydrate. *Anim. Behav.* 1999;54:1449–59.
- [23] Baker B, Beeth DA, Duggan JP, Gibson EL. Protein appetite determined: learned specificity of protein cue preferred to protein diet in adult rats. *Nutr. Res.* 1987;7:481–6.
- [24] Beeth D, Baker BJ. DL-Fenfluramine challenge to nutrient-specific natural preference conditioned by concurrent presentation of two diets. *Behav. Neurosci.* 1999;114:226–9.
- [25] Martin RJ, White BD, Halsey MG. The regulation of body weight. *Am. Sci.* 1991;79:338–41.

5.1. Selección de macronutrientes a través de señales post-ingestivas en la lubina alimentada con cápsulas de gelatina

Physiology & Behavior, 78, 795-803, 2003

Justificación

La regulación de la ingesta de alimento es el principal componente del balance energético y, consecuentemente, del control del peso corporal. Se conoce la capacidad de los peces para regular su ingesta energética a partir de fuentes separadas de macronutrientes, pero los mecanismos implicados en este proceso selectivo permanecen sin esclarecer. En el presente trabajo se describe una metodología, basada en la encapsulación de macronutrientes, que permite abordar la selección de proteína, grasa y carbohidratos, evitando la influencia de las propiedades organolépticas de los mismos en su selección. Se ha investigado, así mismo, el efecto de la posición y color de las cápsulas en la selección de macronutrientes.

Material y métodos

Se utilizaron un total de 40 lubinas, alojadas en grupos de 5 individuos en tanques de 75 l, provistos de un circuito cerrado de agua salada artificial. La temperatura, fotoperiodo y salinidad se mantuvieron constantes. En sucesivas fases experimentales las lubinas se alimentaron con una dieta completa granulada, una dieta completa encapsulada o macronutrientes puros encapsulados individualmente. Con el fin de favorecer un aprendizaje asociativo, se asoció un color concreto a las cápsulas que contenían un macronutriente dado, variando esta relación para cada grupo.

Resultados y discusión

Los peces fueron capaces de regular su ingesta de alimento, así como de compensar su ingesta energética, cuando fueron alimentados con una dieta completa encapsulada, carente de las propiedades orosensoriales de una dieta clásica. Además, aprendieron a discriminar entre cápsulas de macronutrientes puros, codificadas mediante un color, para componer una dieta completa balanceada, utilizando el color como única señal externa. La composición de la dieta seleccionada, expresada como porcentaje de macronutrientes, fue 55% proteína, 23% carbohidratos y 22% grasa. Las propiedades orosensoriales no parecen ser necesarias para regular la ingesta de macronutrientes, sugiriendo que se puede establecer un aprendizaje asociativo entre el color de la cápsula y su contenido por mecanismos post-ingestivos y/o post-absortivos.

Conclusión

Estos resultados confirman la capacidad de los peces para regular su ingesta energética y la ingesta de macronutrientes, y proporcionan la primera evidencia de la capacidad de una especie animal para discriminar la composición de macronutrientes de un alimento, utilizando sólo su color como estímulo condicionado.

Inability of rainbow trout to select encapsulated macronutrient

Teleost fish are able to compose a complete and balanced diet according to their feeding habits (carnivorous, omnivorous...). European sea bass recognize and select a diet with similar composition: both using granulated macronutrient diets (with different chemosensory properties) or encapsulated diets (with similar chemosensory properties) labelled with different colours, showing that the olfactory properties of the diet seem not to be necessary to regulate macronutrient intake. The capacity of rainbow trout to be fed by gelatine capsules makes of this specie a good candidate for studies related with encapsulated macronutrient selection. Therefore, the goal of the present work was to study the ability of rainbow trout to select among three pure macronutrient capsules, determining the regulation of food and energy intakes and the influence of capsules colour. Rainbow trout swallow the complete capsule, without chewing, displaying a preference to select yellow capsules independently of the capsules content, complete diet or macronutrient; however, rainbow trout was unable to discriminate the macronutrient content and to select a balanced diet, selecting roughly the same proportion of capsules of each macronutrient, 35 as P, 35 as CH and 31 as F. The incapacity of rainbow trout to learn to discriminate among macronutrient can be a consequence of the long periods required for the digestion of the wall of gelatine capsules, never less than 4 hours in fish fasted for 48 h or more than 7 h in fish fasted for 24 h.

Feeding behaviour; food intake; macronutrient selection; society; rainbow trout.

IN NATURE some animals subsist only eating one type of food, while most compose a complete diet by selecting from various food items of different nutrient composition (4, 7). This selection is not a consequence of the variety of food available, since when animals have many foodstuffs at hand they select them so as to make up a balanced diet adapted to their physiological needs, carnivorous, herbivorous or omnivorous, with the different nutrients that they need. In teleost fish, macronutrients self-selection has been started to study recently, showing their ability to compose a complete and balanced diet according to their feeding habits (carnivorous, omnivorous...) (1, 20, 27). European sea bass recognize and select a diet with similar composition; both using granulated macronutrient diets (with different chemosensory properties) or encapsulated diets (with similar chemosensory properties) labelled with different colours (15, 16, 17). The olfactory properties of the diet seem not to be necessary to regulate macronutrient intake. Nevertheless the macronutrient specific selection only can happen if consumed foods posses some chemical or physical property that can be detected when are ingested (25).

Feeding behavior is a complex mechanism, composed by consecutive phases that begin with the perception

of the food presence signal and finish with the decision by the animal to intake or to reject the food (8,9). In fish, all senses participate in the feeding behavior: vision, audition, olfaction, electroreception and mechanoreception (8).

As previously was stated, sea bass (15, 16, 17) and sharpsnout seabream (P. Almada, personal communication) are able of select a complete and balanced diet from pure macronutrients separately packaged into gelatine capsules, preventing to associate the organoleptic properties of the macronutrient, flavour (taste and smell) and texture, with the macronutrient contained in the capsules (15, 16, 17). The only cues available to determine its macronutrient content are the colour, the possible position of feeders, or the intraprandial interoception. Food selection as a result of its macronutrient content by internal senses stimulation (postprandial), only it is possible in species with a feeding period enough large for allow the stimulation of specific receptors in the gut, or permit that the digestion products or circulating hormones arrive to the tissues, soon enough to allow the decision of continue or stop the feeding (25). In the related study conducted in sea bass and sharpsnout seabream the feeding period was too short (30 minutes) to allow the intraprandial interoception in a particular day, but an alternative explanation may be an associative learning, a phenomenon widely reported in many different animal species, as insect, rats, ... (14, 23). For example, rats exhibit a nutrient-specific learning, associating odours (2) and food texture (3) with specific macronutrients. This associative behavior can be considered as a typical form of classical (Pavlovian) conditioning, with the type of macronutrient acting as the US and the particular sensory characteristic (odour, taste, etc.) to which it is paired, as the CS (21).

Previously have been reported that rainbow trout can be fed by gelatine capsules (19), demonstrating that capsule disintegration occurs in the stomach in less than 20 min at 5-20°C (18), making of this specie a good candidate for studies related with encapsulated macronutrient selection. Therefore, the goal of the present work was to study the ability of rainbow trout to select among three pure macronutrient capsules, determining the regulation of food and energy intakes and the influence of capsules colour.

METHODS

Animals. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were kept individually in 100 l tanks equipped with a freshwater closed circuit. Tanks were isolated in chambers with controlled environmental parameters. The chambers were assembled in the Chronobiology Laboratory, sound proofed and isolated from the outside or in the Digestibility

Laboratory both belong to the Unité Mixte INRA-IFREMER (St. Pée sur Nivelle, France). The ambient temperature was regulated to keep the water temperature constant at $15.6 \pm 0.4^\circ\text{C}$ or $12.3 \pm 2.3^\circ\text{C}$, respectively.

Experimental diets. Fish were allowed to acclimatize to the laboratory conditions for several weeks. During this period they were fed *ad libitum* once a day with a complete diet (CD), containing the three macronutrients in pure state (P, CH and F), mixed inside gelatine capsules. The encapsulated feed was prepared by filling gelatine capsules n° 4, 0.2 ml (Raig Farma, S.A., Barcelona, Spain) with powdered macronutrients, using a semi-automatic encapsulator (Tecniforma, Miranda de Ebro, Spain). During the experimental period a three choice macronutrient paradigm as described in previous papers was used (Rubio et al., 2003, 2004). Fish have to self select from three capsules (type, each containing a single macronutrient source (or P or CH or F) supplemented with vitamins and minerals. The F sources used were cod liver oil and soya oil (3:1). Protein was provided by vitamin free casein and gelatine (5:1) and dextrin was the CH source. The capsules supplied to a given tank were stored in a single bag for at least 10 days to avoid that same external contamination might allow the fish to distinguish their content by their external chemical properties.

Experimental design. The study consisted of two experiments. The first one deals on the ability of rainbow trout to select encapsulated macronutrients, and the second one with the capsules digestibility time.

Selection of encapsulated macronutrients. To establish the ability of rainbow trout to select a balanced diet from encapsulated macronutrient, 24 fish of 138 ± 14 g (mean $\pm$ SD) of initial BW were individually housed in 100 l tanks. As a first step, the preference for a particular capsule colour and the existence of a true macronutrient selection were evaluated. As a first step, fish received the complete diet packaged into gelatine capsules for 10 days. Every day they were offered 30-60 capsules distributed into three sets of 10-20 floating capsules of each colour (red, orange and yellow) according to their biomass evaluation. After 30 min, the remaining capsules were removed and counted. In order to test the ability of fish to discriminate and differentially ingest macronutrients individually packaged into capsules, fish were fed with colour coded capsules containing P, F or CH for 17 days. The same colour-macronutrient relationship was maintained in a given tank, but this relationship was balanced between tanks to avoid a possible colour effect.

Capsules digestibility time. To determine the delay between the ingestion of a capsule and the time required for its complete crushed, 48 rainbow trout were divided in two experimental groups: fasted ($n=16$) and fed *ad libitum* ($n=32$), and then subjected to forced feeding of one capsule (different colour as previous) 48 h later of establish the groups. At different times: 5, 6, 7 and 8 hours in fasted fish and 1, 4, 7, 8, 9, 10, 11 and 12 hours after forced feeding in fed fish ($n=4$), the digestion of the test capsule was verified.

Data analysis. Food intake was expressed as g/100g BW per day and gross energy as kJ/100g BW per day. The gross energy intake was calculated using the following energy coefficients: 23.6 kJ/g for P; 38.9 kJ/g for F; and 16.7 kJ/g for CH (13). The results were presented as the mean and its corresponding standard error, and were statistically analysed using ANOVA, and the Tukey test ($p < 0.05$) for the

comparison of paired means.

RESULTS

Selection of encapsulated macronutrients. Rainbow trout ingest the capsule complete, without chewing, showing its capacity to be fed through gelatine capsules. The mean of the daily food ingested ration was around 2.7% of their BW, although some individuals exhibited a daily food intake ration of even 8.4% of its BW. The food intake rate exhibit a great variability day by day, with rates that fluctuated between 0% and 8.4% of the BW in a particular fish. Figure 1 shows the percentage of days in which a range of food intake was observed. Most of 77% of days of experimental period, the food size was higher than 3%.

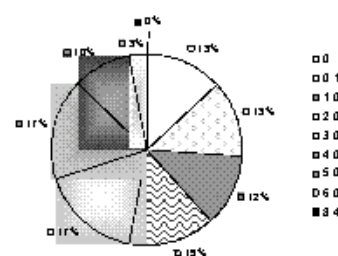
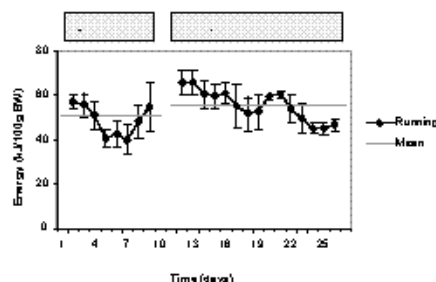


Figure 1. Daily food intake rate expressed as the percentage of days in which a range of selection was observed.

The number of capsules and the energy consumed was stable, independently of the capsules content, complete diet or single macronutrients packaged separately (Figure 2). As figure 3 shows, rainbow trout exhibited a preference for yellow capsules, independently of their content ($[F(2,71)]=6.446$, $P=0.003$) to complete diet and ($[F(2,71)]=38.877$, $P=0.000$) to single macronutrient). Rainbow trout failed to discriminate and select gelatine capsules according with its internal composition (Figure 4)



selecting roughly the same proportion of capsules of

each macronutrient, 35% as P, 35% as CH and 31% as F.

Figure 2. Average daily energy intake of rainbow trout fed a complete, encapsulated diet followed by encapsulated macronutrients. The illustrations on top of the graph represent the experimental phases. Values represent the running average of three days and the S.E.M. of 24 individual fish. No statistically significant differences were found.

Capsules digestibility time. The time required to found capsules totally crushed in the stomach of rainbow trout was variable. In fish fed 24 h before of test capsule administration, several animals had broken the capsule 9 h after whereas other animals had the capsule totally entire 11 or 12 h later (Figure 5). In these latest cases the stomach presented a volume 8-10-fold increased by the capsules consumed during the previous day. The stomach appeared full of indigested capsules in the 81% of the fish fed 24-36 h before. In fasted fish, 5 h after the forced feeding the capsules appears enough crushed to allow the absorption of their content (Figure 6).

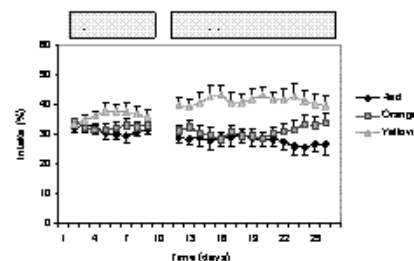


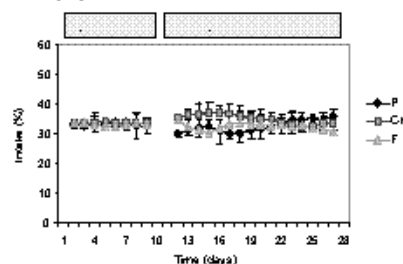
Figure 3. Influence of colour on the daily intake of gelatine capsules containing a complete diet followed by encapsulated macronutrients. The illustrations on top of the graph represent the experimental phases. Values represent the running average of three days and the S.E.M. of 24 individual fish.

DISCUSSION

Previously it has been reported the rainbow trout capacity to fed through gelatine capsules (19), this finding is supported by the present results, since rainbow trout ingests the entire capsule, without chewing. The mean of the daily food ingested ration was around 2.7% of their B.W., a ration that matches prior results obtained in self-feeding studies in this

specie (10), however some individuals exhibited a daily food intake ration of even 8.4% of its B.W., producing a huge stomach distension and the presence, in the 81% of fish, of stomach full of indigested capsules 24-36 h after the last meal. Food size was higher than 3% and 4% of B.W in the 47% and 30% of the days respectively, a ration only found exceptionally in previous papers (10, 22, 26). This high food intake can be explained by the hyperphagia observed in rainbow trout housed individually compared to fish held in groups (10), or by the inability of trout to recognise capsules as food, since the long times required for the digestion of the wall of capsules prevent that the chemical signals induced by macronutrients can be generated. The presence of specific intestinal receptors, which share the characteristics with taste receptors, suggest that incoming nutrients could be differentiated in the intestine (6), interacting with intestinal receptors and sending signals that produce food intake reduction and prolong satiety (11, 12).

Figure 4. Evolution of macronutrients intake in fish fed gelatine capsules containing a complete diet followed by encapsulated macronutrient, P, F or CH. The illustrations on top of the graph represent the experimental phases. Values represent the running average of three days and the S.E.M. of 24 individual fish. No statistically significant differences were found.



In addition to digestive chemoreception, it has been described the presence of mechanoreceptors sensing continuously the degree of stomach distension. When the stomach is distended by food, neural connections are activated informing feeding brain centres, which, in turn, stop feeding (24). The observed results in rainbow trout are not consistent with the presence of

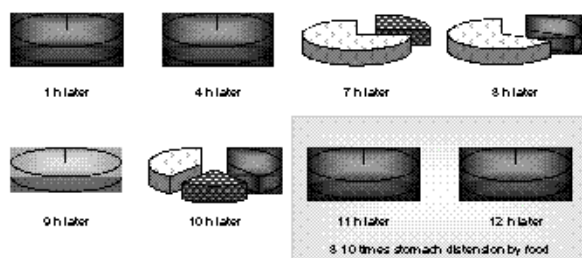


Figure 5. Time required to the digestion of gelatine capsules in fish fed 24 h before of test capsule administration. Values are the mean of 4 fish for each time.

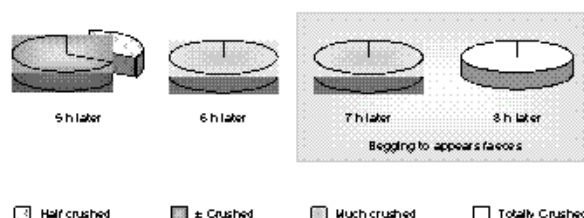


Figure 6. Time required to the digestion of gelatine capsules in fish fasted 24 h before of sea capsule administration. Values are the mean of 4 rainbow trout for each time.

such mechanoreceptors in this species, being the high genetic selection to which rainbow trout has been subjected with the aim to improve food intake and growth performance, one of the possible reasons.

Probably as consequence of this retarded opening of the capsules, rainbow trout was unable to select from capsules containing pure macronutrients to design a balanced diet. Macronutrient specific selection only can happen if consumed foods possess some organoleptic property that can be detected when are ingested, at oropharyngeal level or by internal senses stimulation at postingestive and/or postabsorptive level (25). Since the encapsulation prevents the detection of macronutrient at oropharyngeal level, then the detection have to success by interoception coupled to an associative learning. This associative learning has been previously described in sea bass (15, 16, 17) and sharpshout seabream (P. Almada, personal communication), however in the present study rainbow trout was unable to display it, showing a similar percentage selection for all macronutrients that would have occurred if the ingestion of each type of capsule had been random. Despite the general inability of trout to select encapsulated macronutrients, few individuals can select a diet with high protein selection according to their nutritional carnivorous habits. New experiments are necessary to clarify the reasons by exceptionally some fish can discriminate encapsulated macronutrients.

In sea bass 20 minutes seem to be enough to the digestion of capsules. As it has been previously published plasma melatonin or serotonin levels increase 20 min after the ingestion of a capsule containing melatonin or serotonin in fish fed 24 h before (16, 17). In rainbow trout it has been described that capsule disintegration occurs in the stomach in less than 20 min at 5-20°C (18), or as much 1 h later at 12 °C (5) suggesting that this specie could be a good candidate for studies using gelatine capsules to provide meals with the same physical and organoleptic properties (18), nevertheless in the present study fish fed 24 h before of the capsules digestibility test showed to need more than 9 h to disintegrate the capsule, making very difficult the establishment of any relation between the capsules ingestion and the postingestive and/or postabsorptive signals derived of this intake. No clear explanation is founded to explain

such discrepancy, although the environmental conditions, genetic strain, stomach filling or the chemical composition of capsules can be argued. The disintegration of the capsules need the presence of active digestive proteases, which in turn are dependent on the temperature and on the stomach food content, however, the levels of stomach proteases in the present work were not determined.

Another aspect studied, related with self-selection in rainbow trout, was the influence of the capsule colour in the capsules selection. In a previous study conducted in sea bass was determined that this fish not show any colour preference among red, yellow and orange (15). However, in the present study, rainbow trout display a preference by yellow colour, showing the importance to accomplish previous studies on colour preferences before design studies on self-selection using the colour as external cue.

In summary, rainbow trout was unable to discriminate the macronutrient content of gelatine capsules, probably as a consequence of the long periods required for the digestion of the wall of gelatine capsules in this species.

This research was supported by grants from the MCYT (project AGL2001 0698) to J.A. Madrid, EU (Contracted Action QSCA 2001 989) to F.J. Sánchez-Vázquez and by the "Consejería de Trabajo y Política Social, Fondo Social Europeo" and "Fundación Séneca" (Integral Operative Program for CARM 2000 2006 of FSE to V.C. Rubio). The authors wish to acknowledge to the people of Nutrition Laboratory of the Unité Mixte INRA-IFREMER (St. Pierre Nivelle) for their technical and kind support during the experiments.

REFERENCES

1. Aranda, A., Sánchez-Vázquez, F.J., Zamora, S. and Madrid, J.A. Self design of diets by means of self feeders: validation of procedures. *J. Physiol. Biochem.* 56: 55-66, 2000.
2. Baker, B., Booth, D.A., Duggan, J.P. and Gibson, E.L. Protein appetite demonstrated: learned specificity of protein cue preference to protein need in adult rats. *Nutr. Res.* 7: 481-486, 1987.
3. Booth, D. and Baker, B.J. DL Phenylalanine challenge to nutrient specific (usual) preference conditioned by concurrent presentation of two diets. *Behav. Neurosci.* 104: 226-229, 1990.
4. Carlson, N.R. Ingestive behavior: eating. In: *Physiology of behavior*, edited by N.R. Carlson. Boston: Allyn and Bacon, 1998, p. 377-408.
5. Collin, A. and Boujard, T. Oral administration of cholecystokinin receptor antagonists increase feed intake in rainbow trout. *J. Fish Biol.* 58: 716-724, 2001.
6. Höfer, D., Püschel, B. and Drenckhahn, D. Taste receptor like cells in the rat gut identified by expression of α -guadulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 6631-6634, 1995.

- 1996.
7. Kaiser, M.J. and Hughes, R.N. Factors affecting the behavioural mechanisms of diet selection in fishes. *Mar. Behav. Physiol.* 23: 105-118, 1993.
8. Kasumyan, A.O. Gustatory reception and feeding behavior in fish. *J. Ichthyol.* 37: 72-86, 1997.
9. Lamb, C.F. Cusation and feeding behaviour. In: *Food intake in fish*, edited by D. Houlihan, T. Boujard and M. Jobling. Crea, Britain: Blackwell Science, 2001, p. 108-130.
10. Landkes, P.J. Demand feeding behaviour of rainbow trout. *Aquaculture* 7: 11-25, 1976.
11. Meyer, J.H., Hlinka, M., Tabrizi, Y., DiMaso, N. and Raybould, H.E. Chemical specificities and intestinal distributions of nutrient driven satiety. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 275: R1293-R1307, 1998.
12. Meyer, J.H., Hlinka, M., Khalili, A., Raybould, H.E. and Tsao, P. Role of small intestine in caloric compensations to oil premixes in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 275: R1320-R1333, 1998.
13. Miglavs, I. and Jobling, M. The effects of feeding regime on proximate body composition and patterns of energy deposition in juvenile Arctic char. *Salvelinus alpinus*. *J. Fish Biol.* 35: 1-11, 1989.
14. Raubenheimer, D. and Tucker, D. Associative learning by locusts: pairing of visual cues with consumption of protein and carbohydrate. *Anim. Behav.* 54: 1449-1459, 1997.
15. Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. and Madrid, J.A. Macronutrient selection through post-ingestive signals in sea bass fed on gelatine capsules. *Physiol. Behav.* 78: 795-803, 2003.
16. Rubio, V.C., Boluda-Navarro, D., Sánchez-Vázquez, F.J. and Madrid, J.A. Serotonin affects the quantity and the quality of macronutrient selection in European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *L. World Aquaculture* 2003, Salvador da Bahia, Brazil, 2003, p. 656.
17. Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. and Madrid, J.A. Oral administration of melatonin reduces food intake and modifies macronutrient selection in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. Pwcol Res.* 2004 (in press).
18. Ruohonen, K. and Grove, D.J. In situ study of gastric emptying using X radiography and macrocapsules. *Aquac. Res.* 32: 491-495, 2001.
19. Ruohonen, K., Grove, D.J. and McIlroy, J.T. The amount of food ingested in a single meal by rainbow trout offered chopped herring, dry and wet diets. *J. Fish Biol.* 51: 93-105, 1997.
20. Sánchez-Vázquez, F.J., Yamamoto, T., Akiyama, T., Madrid, J.A., and Tabata, M. Macronutrient self-selection through demand feeders in rainbow trout. *Physiol. Behav.* 66: 45-51, 1999.
21. Scialini, A. Macronutrient conditioned flavor preferences. In: *Neural and metabolic control of macronutrient intake*, edited by H.R. Berthoud and R.J. Seeley. Boca Raton: CRC Press, 2000, p. 93-106.
22. Shima, T., Suzuki, N., Yamamoto, T. y Furuta, H. A comparative study of self feeder and automatic feeder: effects on the growth performance of rainbow trout. *J. Aquacult. Res.* 32 (Suppl. 1): 142-146, 2001.
23. Simpson, S.J. and White, P.R. Associative learning and locus feeding: evidence for a 'learned hunger' for protein. *Anim. Behav.* 40: 506-513, 1990.
24. Stricker, E.M. Specific appetites and homeostatic systems. In: *Neural and metabolic control of macronutrient intake*, edited by H.R. Berthoud and R.J. Seeley. Boca Raton: CRC Press, 2000, p. 361-387.
25. Thibault, L. and Booth, D.A. Macronutrient specific dietary selection in rodents and its neural bases. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23: 457-528, 1999.
26. Thiesen, D.L., Campbell, C.L. and Tyler, R.T. Utilization of 'hindgutters' isolates as a palatability enhancer in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets containing canola meal or air classified pea protein. *Aquacult. Nutr.* 9: 1-10, 2003.
27. Yamamoto, T., Shima, T., Furuta, H. and Suzuki, N. Effect of water temperature and short-term fasting on macronutrient self-selection by common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 220: 655-666, 2003.

5.2. Incapacidad de la trucha arco iris para seleccionar macronutrientes encapsulados

Justificación

En la naturaleza algunos animales subsisten alimentándose con un único tipo de alimento, mientras que la mayoría componen una dieta completa seleccionando a partir de varios tipos de alimentos de diferente composición en nutrientes. Pero esta selección no es una consecuencia de la disponibilidad de alimento, ya que, cuando pueden seleccionar entre diferentes alimentos, componen una dieta acorde con sus necesidades nutricionales, carnívoros, omnívoros o herbívoros. Los peces teleósteos son capaces de componer una dieta completa balanceada a partir de macronutrientes provistos (granulados) o carentes (encapsulados) de las características inherentes a ese macronutriente. La capacidad de la trucha arco iris para alimentarse mediante cápsulas de gelatina hace de dicha especie una buena candidata para la realización de estudios relacionados con la selección de macronutrientes encapsulados, por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar dicha capacidad, así como su regulación de la ingesta de alimento y energía y la posible influencia del color de la cápsula en la selección de macronutrientes.

Material y métodos

Se utilizaron 72 truchas arco iris, alojadas individualmente en tanques de 100 l, provistos de un circuito cerrado de agua dulce. La temperatura y fotoperiodo se mantuvieron constantes. Veinticuatro de las truchas se alimentaron con una dieta completa encapsulada o macronutrientes puros encapsulados individualmente, para determinar la selección de macronutrientes. Con el fin de favorecer un aprendizaje asociativo, los macronutrientes se marcaron asociándoles un color concreto en cada tanque. Los peces restantes fueron utilizados para determinar el tiempo de digestibilidad de las cápsulas de gelatina.

Resultados y discusión

La trucha ingiere la cápsula completa, sin masticarla, mostrando una preferencia por las cápsulas de color amarillo independientemente de su contenido, dieta completa o macronutrientes puros; sin embargo, fue incapaz de discriminar el macronutriente contenido y de seleccionar una dieta balanceada, seleccionando la misma proporción de cápsulas de cada macronutriente, 35% proteína, 35% carbohidratos y 31% grasa. La incapacidad de la trucha arco iris para aprender a discriminar entre macronutrientes podría ser una consecuencia de los largos periodos requeridos para la digestión de la pared de las cápsulas de gelatina, nunca inferior a 4 h en animales ayunados 48h y superior a 7 h en peces alimentados 24 h antes de la administración forzada de una cápsula.

Conclusión

En resumen, la trucha arco iris fue incapaz de discriminar entre macronutrientes contenidos en cápsulas de gelatina, probablemente como consecuencia de los largos periodos de digestión de la cubierta de gelatina de la cápsula en esta especie.

Influence of nutrient preload on encapsulated macronutrient selection in European sea bass.

V.C. RUBIO, F.J. SÁNCHEZ-VÁZQUEZ AND J.A. MADRID

This chapter has been submitted to American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology

The sea bass is a teleost that is able to regulate its energy intake by selecting from pure macronutrient sources, although the regulatory mechanisms involved in this selection are unknown. Nutrient preloads are known to reduce food intake and modify macronutrient selection patterns in mammals, but no information is available of its effects in fish. The aim of the present work was to determine the effect of orally administered macronutrient preloads of protein (P), fat (F), or carbohydrate (CH) on the subsequent macronutrient selection, using for the purpose feed consisting of CH, P, or F packaged separately in gelatin capsules. The macronutrient preloads left the total food intake unaltered, but caused differential changes in the pattern of macronutrient selection. The CH preload increased the selection of CH (39%) and decreased that of P (20%), independently of the fish's previous nutritional preferences. The F preload induced an F increase (32%) and a P decrease (18%) in P preferring fish, but not in F preferring fish in which the macronutrient selection pattern remained unaffected. The P preload stimulated F selection by 42% in P preferring fish, but left the macronutrient selection pattern unchanged in F preferring fish. In conclusion, oral macronutrient preloads affected the pattern of macronutrient selection in fish, acting by post-ingestive mechanisms. The effect was influenced by the fish's previous nutritional preference and/or status, which could depend on its metabolic capacity.

Feeding behaviour; food intake; macronutrient selection; macronutrient preloads; fish.

NUMEROUS STUDIES have provided evidence that nutrients entering the intestine can have a rapid effect on the sensation of hunger (13,14) or satiety (17). Furthermore, nutrients in the intestine could interact with a food's orosensorial properties affecting satiation (1), metabolic rate (40), and food selection (26). Nutrient preload is defined as a nutritive substance that is administered to animals prior to feeding access. The route of administration may be oral, intragastric, intestinal, or intravenous infusion. In mammals, there have been extensive studies of how nutrient preloads affect food intake (8, 31, 38, 41) and macronutrient selection (4, 9, 19), but the different actions observed make it difficult to draw any consistent conclusion. The post-ingestive actions on food intake are usually considered to be inhibitory (satiation) in line with the classical negative-feedback model in which a particular nutrient interacts with a specific receptor, thereby reducing the intake of that nutrient but not of

the others (12). A nutrient preload sometimes, however, suppresses the intake of no nutrients (7, 27) or of all nutrients (4). And there have been recent descriptions of examples of positive post-ingestive actions of a preload, with increased food acceptance and broadened dietary preferences (32, 33).

Preloads have been described as acting at either the orosensorial or the post-ingestive levels (12): when a preload is ingested, at least part of the effect could be the result of its sensory properties in the oropharynx, and when it is infused the effect must be due to post-ingestive mechanisms. Moreover, these two levels of action seem to be linked by the development of learnt associations between the orosensorial properties of a particular nutrient and its post-absorptive effects (3, 33, 35).

The presence of specific intestinal receptors, which share characteristics with taste receptors, suggests that incoming nutrients may be differentiated in the intestine (16). The intestinal receptors could interact with nutrients along the length of the intestine, sending out signals that would provoke a reduction of food intake and prolong satiety (21, 22).

Some fish are known to have the capacity to choose a complete diet (containing the three macronutrients) from separate sources of macronutrients. In particular, teleosts can regulate their energy intake by selecting from different granulated macronutrient diets (with different chemosensory properties) (2, 30, 44) or from colour-coded, encapsulated, pure macronutrients (with the same chemosensory properties) (28, 29), composing a complete diet in accord with their specific nutritional habits, whether carnivorous or omnivorous (2, 28, 29, 30, 44). The mechanisms involved in this regulation of macronutrient intake, and the possible role of nutrient preloads, remain unknown, however.

The objective of the present study was therefore to determine the influence, through post-ingestive mechanisms, of macronutrient (protein, carbohydrate, and fat) preloads on the regulation of food intake and on the selection of pure macronutrients in fish.

METHODS

Animals. Twelve European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) provided by the CULMAREX S.A. fish farm (Águilas, Murcia, Spain), of 183 ± 36 g in initial BW (mean $\pm$ SD), were kept individually in 75 l tanks equipped with a

closed circuit of artificially seawater (SBRA premium sea salt, Heinsberg, Germany). The tanks were isolated in chambers, with controlled environmental parameters, placed in the Chronobiology Laboratory of the University of Murcia, sound proofed and isolated from the outside. The photoperiod was set at 12:12 h light/dark cycle with lights on at 08:00 h by means of a timer (Data Orbits, Madrid, Spain) that controlled 15W fluorescent lamps. The illumination at the water surface was around 350 lux. The ambient temperature was regulated to keep the water temperature constant at $23.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Water parameters were monitored daily to ensure the welfare of the fish.

Experimental diets. Fish were acclimated to the laboratory conditions for several weeks. During this acclimation period they were fed *ad libitum* once a day with a complete diet (CD), containing the mixed three pure macronutrients (P, CH, and F) presented in gelatin capsules (Table 1). The encapsulated feed was prepared by filling 0.2 ml of 4 gelatin capsules (Rang Farma, S.A., Spain) with powdered macronutrients, using a semi-automatic encapsulator (Tecnifarma, Miranda de Ebro, Spain). During the experimental period, a three choice macronutrient paradigm was used as described in previous work (28, 29). Briefly, sea bass self select from three capsule type, each containing a single macronutrient source: protein (P), carbohydrate (CH), or fat (F) supplemented with a vitamin and mineral complex (Table 1). The sources were: P, vitamin free casein and gelatin (5:1); F, cod liver and soya oils (3:1); and CH, dextrin. The analytical composition of the capsules is given in Table 1. The assay techniques used were: moisture, by drying the samples at 110°C for 24 h to constant weight; proteins, by the Kjeldahl method ($N \times 6.25$); fats, by diethyl ether extraction; ash, by calcining at 450°C for 24 h; and the nitrogen free extract (NFE), calculated by subtraction of P + F + ash. The capsules supplied to a given tank were stored in a single bag for at least 10 days to avoid any external contamination allowing the fish to distinguish their content by their external chemical properties.

Table 1. Ingredients and proximate analysis calculated from the assay of the macronutrients of the four kinds of capsules, expressed as mean ($n=4$).

	CD	P	F	CH
<i>Ingredients of capsules' content (g/kg dry weight)</i>				
Casein	430	783		
Gelatin	90	157		
Cod liver oil	158		705	
Soya oil	52		235	
Dextrin	210			940
Vitamin/Mineral mix	20	20	20	20
CaCO ₃ /CaPO ₄	40	40	40	40
<i>Proximate analysis of the capsules (% dry matter)</i>				
Dry matter	92.6	90.2	98.8	90.5
Gross protein	57.3	90.8	17.1	18.8
Ether extract	16.7	0.6	80.7	0.7
NFE	22.0	3.3	1.1	77.4
Ash	4.0	5.3	1.1	3.1
Gross energy (kJ g ⁻¹) ^a	23.7	22.2	35.6	17.6
Weight(g)	0.168	0.127	0.218	0.209

^aCalculated from the macronutrient percentage mean using the following energy coefficients: 23.6 kJ g⁻¹ for P; 38.9 kJ g⁻¹ for F; and 16.7 kJ g⁻¹ for CH (23).

Experimental design. The study consisted of three consecutive experiments conducted on the effect of macronutrient oral preloads with the same chemosensory properties at the oropharyngeal level on food intake, macronutrient intake, and macronutrient selection.

Preload administration. To determine the influence of P preloads on food intake and macronutrient selection, each fish received a single P capsule at 13:15 h for 10 consecutive days. Forty five minutes after the P preload capsule ingestion, the fish were fed with colour coded capsules containing P, F, or CH. The same colour macronutrient relationship was maintained in a given tank throughout the experiment, but was balanced between tanks to avoid any possible colour effect. Each fish was provided with an equal number of capsules for each macronutrient and the quantity offered was always greater than the fish could ingest. After 30 minutes (from 14:00 to 14:30 h), the remaining capsules were removed and counted to determine the real intake of each macronutrient. On days 1-10, fish received an initial capsule (placebo I) containing a complete diet. On days 11-20, they received a capsule containing the P preload. At the end of the experiment, on days 21-30, the initial capsule was again placebo (placebo II). To avoid interference with the conditioning process, the colour of the placebo and preload capsule was different from that of the capsules containing macronutrients.

The macronutrient preferences of sea bass for F or P were characterized by the percentage of baseline energy consumed as F or P, using a modification of the criterion used in mammals (30), i.e., $\geq 40\%$ as F = fat preferring fish, $\geq 40\%$ as P = protein preferring fish.

F preload administration. The specifications were the same as in the P preload experiment, but providing the fish with a single F capsule as the F preload.

CH preload administration. As in the P preload protocol. In this experiment two fish with very low intake were removed and not considered for the results of the present experiment, so that 10 fish were used in the CH preload experiment. The corresponding mean initial body weight was 182 ± 39 g (mean $\pm$ SD).

Data analysis. Food intake was expressed as g/100g BW per day. The gross energy intake was calculated using the following energy coefficients: 23.6 kJ/g for P; 38.9 kJ/g for F; and 16.7 kJ/g for CH (17). The results were presented as means and the corresponding standard errors, and were analysed statistically by an ANOVA and the Tukey test ($p < 0.05$) for the comparison of paired means.

RESULTS

Effect of oral P preloads on food intake and macronutrient selection. The average composition of the diet selected during the first placebo phase, expressed in terms of energy intake, was 38% as P, 44% as F, and 18% as CH ($n=12$) (Table 2). However, in the P-preferring fish ($n=5$), the composition was 46% as P; 34% as F, and 20% as CH, and in the F-preferring fish ($n=7$), it was 33% as P, 51% as F, and 16% as CH.

The prior intake of a gelatin capsule containing P did not significantly modify the average total food intake, macronutrient intake, or macronutrient selection pattern (percentages of macronutrients selected) (Table 3). However, by preference classes, the P preload increased the F selection by 42% over the first placebo phase in the P-prefering fish [$F(2,12) = 5.900$, $P = 0.016$] (Fig. 1a), while the macronutrient selection remained unaffected in the F-prefering fish (Fig. 1b).

Table 2. Composition of the selected diet (in terms of energy) during the first placebo phase of each experiment, and approximate proportion of macronutrient selected in each placebo phase.

	Energy of selected diet (%)			Proportion		
	P	F	CH	P	F	CH
Exp. P preload	38	44	18	2.1	2.4	1.0
Exp. F preload	42	41	17	2.5	2.4	1.0
Exp. CH preload	43	40	17	2.5	2.4	1.0

The proportion CH would have occurred if the ingestion of each type of capsule had been random would have been 1.6P:2.5F:1.0CH.

With respect to the dynamics of the macronutrient selection (Fig. 2) expressed as percentages of macronutrient energy intake, during the first 2 days of the P-preload phase the P selection increased and the F selection decreased relative to the placebo-I phase. From day 3 onwards, however, the P selection declined steadily, matched by a simultaneous increase in the F selection, but only very slight changes in the CH selection. When the P preload capsule was substituted with a placebo capsule in the placebo-II phase, the selection rapidly returned to the placebo-I pattern.

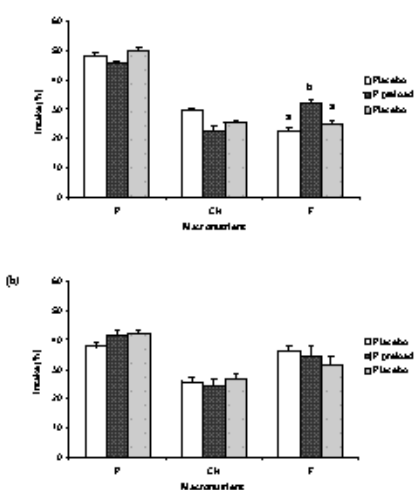


Figure 1. Relationship between P preload and selection of macronutrients, expressed as percentage of macronutrients intake in (a) P-prefering fish ($n=3$) and (b) F-prefering fish ($n=7$). Results are expressed as the mean $\pm$ SEM. The different superscripts represent statistically significant differences, $P < 0.05$ (ANOVA).

Effect of oral F preloads on food intake and macronutrient selection. The composition of the diet selected during the placebo-I phase was 42% as P, 41% as F, and 17% as CH ($n=12$) (Table 2). In the P-prefering fish ($n=7$), the proportions were 47% as P, 34% as F, and 19% as CH, and in the F-prefering fish ($n=5$), 34% as P, 52% as F, and 14% as CH.

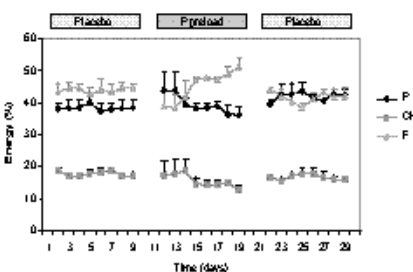


Figure 2. Evolution of the percentage of macronutrient energy intake following the administration of a P preload capsule or a placebo. Values represent the moving average $\pm$ SEM of three consecutive days ($n=12$).

The F preload significantly affected the macronutrient selection pattern, reducing P intake by 18% and increasing F intake by 32% (Table 4). There were no changes in total macronutrient intake, however. By preference classes, in the P-prefering fish the macronutrient selection pattern was similar to the average for all the fish, with P selection reduced by 21% and F selection increased by 56% (Fig. 3a), whereas in the F-prefering fish the macronutrient selection pattern was unaffected (Fig. 3b).

Table 3. Influence of P preload on total food, macronutrient intake ($g/100g BW^{-1} day^{-1}$), and macronutrient selection (%) in sea bass ($n=12$). The results, expressed as mean $\pm$ SEM, were calculated on the basis of the preload capsule composition.

	Placebo I	P preload	Placebo II	P
Total intake	1.6 ± 0.2	1.7 ± 0.2	1.6 ± 0.1	0.914
P intake	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.645
CH intake	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.602
F intake	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.840
P selection	42 ± 2	43 ± 2	45 ± 2	0.502
CH selection	27 ± 1	23 ± 2	26 ± 2	0.335
F selection	31 ± 2	33 ± 3	29 ± 3	0.463

The evolution of the macronutrient selection, expressed as percentages of macronutrient energy intake, as a consequence of the F preload (Fig. 4) showed high levels of F and low levels of P and CH selection during the first days of the preload period, followed by a decline in F selection and a rise in P and CH selection until a steady state was reached. In the placebo-II phase, on the first day there was an increase in P and a decrease in F selection, with the macronutrient selection pattern being similar to that in the placebo-I phase.

Effect of oral CH preloads on food intake and macronutrient selection. The proportions of macronutrients chosen during the first placebo phase bass were 43% as P, 40% as F, and 17% as CH (n=10) (Table 2). In the P-prefering fish (n=5), they were 49% as P, 33% as F, and 18% as CH, and in the F-prefering fish (n=5), 37% as P, 47% as F, and 16% as CH.

Table 4. Influence of F preload on total food, macronutrient intake (g 100g BW⁻¹ day⁻¹), and macronutrient selection (%) in sea bass (n=12). The results, expressed as mean $\pm$ SEM, were calculated on the basis of the preload capsule composition.

	Placebo I	F preload	Placebo II	P
Total intake	1.8 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.1	0.884
P intake	0.7 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	0.454
CH intake	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.0	0.953
F intake	0.5 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.656
P selection	45 $\pm$ 2 ^a	37 $\pm$ 2 ^b	46 $\pm$ 2 ^{ab}	0.003
CH selection	26 $\pm$ 2	25 $\pm$ 1	27 $\pm$ 1	0.747
F selection	29 $\pm$ 3 ^a	38 $\pm$ 2 ^b	27 $\pm$ 2 ^c	0.008

Means with different superscripts indicate significant differences between treatments.

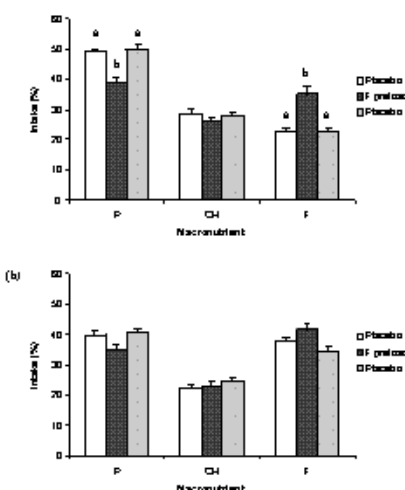


Figure 3. Relationship between F preload and selection of macronutrients, expressed as percentage of macronutrient intake in (a) P preferring fish (n=7) and (b) F preferring fish (n=5). Results are expressed as the mean $\pm$ SEM. The different superscripts represent statistically significant differences, P<0.05 (ANOVA).

On average for all the fish (n=10), the total food and single macronutrient intakes were unaffected by the CH preload. Considered as percentages, however, the contribution of the P selection was reduced by 20%, and the CH selection was increased by 39% (Table 5). This same new macronutrient selection pattern was observed when the data were analysed by nutritional preference class (Fig. 5a,b).

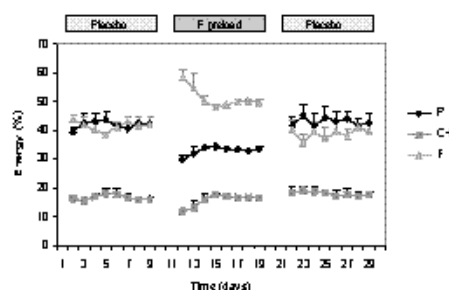


Figure 4. Evolution of the percentage of macronutrient energy intake following the administration of an F preload capsule or a placebo. Values represent the moving average $\pm$ SEM of three consecutive days (n=12).

The dynamics of the macronutrient selection was unstable from day to day (Fig. 6), with high levels of CH selection and low levels of P selection. When the CH preload capsule was substituted with the placebo capsule in the placebo-II phase, the fish immediately presented a macronutrient selection pattern similar to that observed in the placebo-I phase.

Table 5. Influence of CH preload on total food, macronutrient intake (g 100g BW⁻¹ day⁻¹), and macronutrient selection (%) in sea bass (n=10). The results, expressed as mean $\pm$ SEM, were calculated on the basis of the preload capsule composition.

	Placebo I	F preload	Placebo II	P
Total intake	1.7 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.2	0.544
P intake	0.7 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	0.361
CH intake	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.982
F intake	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.0	0.490
P selection	46 $\pm$ 2 ^a	37 $\pm$ 2 ^b	43 $\pm$ 2 ^{ab}	0.020
CH selection	26 $\pm$ 1 ^a	36 $\pm$ 2 ^b	27 $\pm$ 1 ^a	0.000
F selection	27 $\pm$ 2	26 $\pm$ 3	30 $\pm$ 2	0.701

Means with different superscripts indicate significant differences between treatments.

DISCUSSION

The European sea bass, in confirmation of earlier findings (28, 29), was found to be able to regulate their macronutrient selection, composing a complete diet in accord with their nutritional preferences from three sets of macronutrient capsules (P, CH, F). Since all three capsule types had the same chemosensory properties at the oropharyngeal level, so that there was no interference from flavour or texture, the fish had to learn an association between the colour and the content of the capsules by means of post-ingestive and/or post-absorptive mechanisms (28). The composition of the diet selected during the different placebo-I phases (Table 2) differed significantly from the 1.6P: 2.5F: 1CH proportion that would have resulted from random ingestion of each type of capsule according to the respective energy conversion coefficients (23).

The encapsulated presentation of the macronutrient preloads in this study, by avoiding the external orosensorial cues of the corresponding macronutrient, emulated the effect of intragastric preloads but without the drawbacks of surgical manipulation. Any preload effects must therefore have been mediated by post-ingestive processes, given that oropharyngeal effects—the other level of preload action (12)—had been obviated.

are expressed as the mean $\pm$ SEM. The different superscripts represent statistically significant differences, $P < 0.05$ (ANOVA).

None of the macronutrient preloads induced a change in total or single macronutrient intake in the sea bass. Only the percentages of macronutrient selection were affected. In mammals, however, while some studies have found that total food intake is reduced by F (4, 8, 21, 38) or CH (4, 21, 31, 38) preloads, others have found it to be left unmodified by oral (8) or intravenous (9) CH preloads, and by intragastric F preloads (31). Similar contradictory results in mammals have been obtained for the macronutrient intake. The effect of a nutrient preload has generally been explained by a classical negative-feedback model, in which the preload of a particular nutrient inhibits the subsequent intake of that nutrient but not of the others (12). This explanation is clearly too simple, however, since there is a great variability in the response to a particular nutrient preload. For example, there are reports that a CH preload reduces CH intake and changes the P and/or F intake (4, 19, 39), and others that it has no effect on CH intake (9, 34). Sometimes the nutrient preload reduces the intake of all nutrients (4), and sometimes it suppresses the intake of no nutrient (7, 9, 27, 34). These inconsistencies could reflect methodological differences in the route of nutrient administration, the species involved, the amount or the nature of the preload, the delay between preload and feeding, the preload administration time, etc.

Under the present experimental conditions, the effects on the sea bass of macronutrient preloads seem to contradict the negative-feedback model, since the F and CH preloads stimulated the selection percentage of P and CH, respectively, showing that they possibly act as appetizers. Both these preload types reduced the percentage of P in the diet, probably as compensation to maintain the energy intake (data not shown), since in carnivorous fish such as sea bass P turnover is the major contributor to energy metabolism (24). On the contrary, however, a P preload failed to induce any change in macronutrient selection. This could be due to the experimental procedure used, because the P-preload capsule had only 0.019 g more protein than placebos I or II which was probably insufficient to lead to a consistent change in the pattern of macronutrient selection.

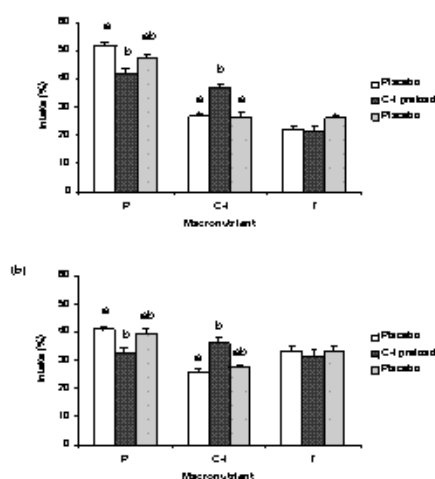


Figure 5. Relationship between CH preload and selection of macronutrients, expressed as percentage of macronutrient intake in (a) P preferring fish (n=5) and (b) F preferring fish (n=5). Results

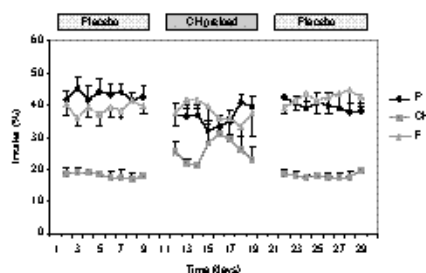


Figure 6. Evolution of the percentage of macronutrient energy intake following the administration of a CH preload capsule or a placebo. Values represent the moving average $\pm$ SEM of three consecutive days ($n=10$).

In rats, serotonin has been observed to have a differential effect on macronutrient preferences depending on the previously determined macronutrient preferences of the animals, whether F-preferring or CH-preferring (36). Using a similar procedure, we divided the fish into two groups, P- and F-preferring fish. We chose to use F instead of CH as one of the nutritional criteria because carnivorous fish have a reduced capacity to use CH as an energy source (42, 43) and to regulate glucose metabolism (25), so that CH is considered to be a secondary nutrient in these species (24).

The re-analysis of the results according to this new criterion showed a differential effect of the P and F preloads. The P preload increased F selection in the P-preferring fish, but had no detectable effect in the F-preferring fish. Similarly, the effect of F preload on the macronutrient selection of the entire group of fish was found to be the result of the changes in the selection by the P-preferring fish, with no significant effect being detected in the F-preferring fish. It therefore seems that macronutrient preloads act selectively on macronutrient selection in sea bass, depending on the fish's prior nutritional preferences and/or requirements which may in turn be related to their metabolic capacity. In mammals, the oral or intraduodenal infusion of glucose stimulates the secretion of GLP-1, GIP, insulin, and CCK (11, 15, 18), the oral or intraduodenal administration of fats raises the plasma levels of GLP-1 and CCK (5, 11, 15), and oral amino acid administration increases the secretion of GLP-1 (15). Food intake at the central or gastrointestinal level is regulated by several hormones and neuropeptides, some of which are nutrient specific (6). The reduction of food intake produced by a P preload is completely abolished by blocking the CCK-A receptor, while there is no effect when the preloads are amino acids, CH, or F (37, 38). The central administration of GLP-1 reduces food intake after a CH preload, but has no effect after a P preload (10). In fish, however, such possible nutrient-specific effects from the action of neuropeptides or hormones released by the preload remain unexplored, and further studies are needed to clarify the topic.

In sum, macronutrient preloads administered to sea bass orally in the form of gelatin capsules affect macronutrient selection by post-ingestive mechanisms, without the mediation of chemosensory cues at the

oropharyngeal level. The effect is influenced by the fish's prior nutritional preference and/or status, which could in turn depend on their metabolic capacity.

This research was supported by grants from the "Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT)" project AGL2001-0698 to J.A. Madrid, EU (Contract Action QSCA 2001-989 to F.J. Sánchez-Vázquez), and by the "Consejería de Trabajo y Política Social, Fondo Social Europeo" and "Fundación Séneca" (Integral Operative Program for CARM 2000-2006 of FSE to Y.C. Rubio). The authors wish to thank M. Carmen Martín Jiménez and other staff of CULMAREX, SA for supplying the sea bass and for their kind support and assistance during the experiment.

REFERENCES

- Antin, J., Gibbs, J., and Smith, G.P. Inezinal satiety requires pre-gastric food stimulation. *Physiol. Behav.* 18: 421-425, 1977.
- Aranda, A., Sánchez-Vázquez, F.J., Zamora, S., and Madrid, J.A. Self design of diets by means of self feeders: validation of procedures. *J. Physiol. Biochem.* 56: 55-66, 2000.
- Baker, B., Booth, D.A., Duggan, J.P., and Gibson, E.L. Protein appetite demonstrated: learned specificity of protein cue preference to protein in adult rats. *Neur. Res.* 7: 481-486, 1987.
- Bartness, T.J., and Rowland, N., 1983. Dietary self selection in normal and diabetic rats after gastric loads of pure macronutrients. *Physiol. Behav.* 31: 546-554, 1983.
- Boyd, K.A., O'donovan, D.C., Doran, S., Wishart, J., Chapman, J.M., Horowitz, M., and Feinle, C. High fat diet effects on gut motility, hormone, and appetite responses to duodenal lipid in healthy men. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 284: G188-G196, 2003.
- Buchan, A.M. Nutrient sensing and signaling mechanisms in the gut III. Endocrine cell recognition of luminal nutrients. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 277: G1103-G1107, 1999.
- Burggraf, K.K., Willing, A. E. and Koopmans, H. S. The effects of glucose or lipid infused intravenously or intragastrically on voluntary food intake in the rat. *Physiol. Behav.* 61: 787-793, 1997.
- Burton-Freeman, B., Gleason, D.W., and Schneeman, B.O. Meal pattern analysis to investigate the satiating potential of fat, carbohydrate, and protein in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 275: R1916-R1922, 1997.
- Chapman, J.M., Coble, E.A., Wittert, C.A., Morley, J.E., and Horowitz, M., 1998. Effect of intravenous glucose and euglycemic insulin infusions on short-term appetite and food intake. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 274: R596-R603, 1998.
- Choi, Y.-H., and Anderson, G.H. An interaction between hypothalamic glucagon like peptide I and macronutrient composition determines food intake in rats. *J. Neurosci.* 13: 1819-1825, 2001.
- Feinle, C., Chapman, J.M., Wishart, J., and Horowitz, M. Plasma glucagon like peptide I (GLP I) responses to duodenal fat and glucose infusions in lean and obese men. *Papadopoulos* 23: 1491-1495, 2002.
- Foster, L.A. The effects of nutrient preloads on subsequent macronutrient selection in animal models. In: *Neural and Metabolic Control of Macronutrient Intake*, edited by H. R. Berthoud and R.J. Seeley. Boca Raton: CRC Press LLC, 2000, p. 117-128.
- Foster, L.A., Nakamura, K., Greenberg, D., and Nargren, R. Inezinal fat differentially suppresses sham feeding of different gustatory stimuli. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 270: R1122-R1125, 1996.
- Greenberg, D., Smith, G.P., and Gibbs, J. Intraduodenal infusions of fat elicit satiety in sham feeding rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 259: R110-R118, 1990.
- Herrmann, C., Göke, R., Richter, C., Fohmann, H.C., Arnold, R., and Göke, B. Glucagon like peptide I and glucose dependent insulin releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion* 56: 117-126, 1995.
- Höller, D., Plüschel, B., and Drenckhahn, D. Taste receptor like cells in the rat identified by expression of *guaducan*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 6631-6634, 1996.
- Lavin, J.H., and Read, N.W. The effect on hunger and satiety of slowing the absorption of glucose: relationship with gastric

- emptying and postprandial blood glucose and insulin responses. *Appetite* 25: 89-96, 1995.
18. Lavin, J.H., Willert, C., Andrews, J., Yeap, B., Wishart, J.M., Morris, H.A., Morley, J.E., Horowitz, M. and Read, N.W. Interaction of insulin, glucagon like peptide 1, gastric inhibitory polypeptide, and appetite in response to intraduodenal carbohydrate. *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 591-598, 1998.
 19. Li, E.T.S. and Anderson, G.H. Meal composition influences subsequent food selection in the young rat. *Physiol. Behav.* 29: 779-783, 1982.
 20. Matsuno, A.Y. and Thibault, L. Effect of sucrose and fructose macronutrient diets on feeding behavior in rats. *Physiol. Behav.* 58: 1277-1280, 1995.
 21. Meyer, J.H., Hlinka, M., Tabrizi, Y., DiMaso, N. and Raybould, H.E. Chemical specificities and intestinal distributions of nutrients driven satiety. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 275: R1293-R1307, 1998.
 22. Meyer, J.H., Hlinka, M., Khalil, A., Raybould, H.E. and Tso, P. Role of small intestine in caloric compensations to oil premeals in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 275: R1320-R1333, 1998.
 23. Migbav, I. and Jabling, M. The effects of feeding regime on proximate body composition and patterns of energy deposition in juvenile Arctic char, *Salvelinus alpinus*. *J. Fish Biol.* 35: 1-11, 1989.
 24. Møntonen, T.P. Growth and metabolism. In: *The Physiology of Fishes*, edited by D.H. Evans. Boca Raton: CRC Press, Boca Raton, 1998, p. 65-97.
 25. Palmer, T.N. and Ryman, B.E. Studies on oral glucose intolerance in fish. *J. Fish Biol.* 4: 311-319, 1972.
 26. Perez, C., Ackroff, K. and Scalfani, A. Carbohydrate and protein conditioned flavor preferences: effects of nutrients preloads. *Physiol. Behav.* 59: 467-474, 1996.
 27. Rolls, B.J., Hetherington, M. and Burley, V.J. The specificity of satiety: the influence of foods of different macronutrient content on the development of satiety. *Physiol. Behav.* 43: 145-153, 1988.
 28. Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. and Madrid, J.A. Macronutrient selection through postprandial signals in sea bass fed on gelatine capsules. *Physiol. Behav.* 78: 795-803, 2003.
 29. Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. and Madrid, J.A. Oral administration of melatonin reduces food intake and modifies macronutrient selection in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *J. Pseud. Res.* 2004 (in press).
 30. Sánchez-Vázquez, F.J., Yamamoto, T., Akiyama, T., Madrid, J.A., and Tabata, M. Macronutrient self-selection through demand feeders in rainbow trout. *Physiol. Behav.* 66: 45-51, 1999.
 31. Schwartz, G.J., Salorio, C.F., Skoglund, C. and Moran, T.H. Gut vagal afferent lesions increase meal size but do not block gastric preload induced feeding suppression. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 274: R1623-R1629, 1999.
 32. Scalfani, A. Learned controls of ingestive behavior. *Appetite* 29: 153-158, 1997.
 33. Scalfani, A., Cardieri, C., Tucker, K., Blusk, D. and Ackroff, K. Intragastric glucose but not fructose conditions robust flavor preferences in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 265: R320-R325, 1993.
 34. Shide, D.J., Caballero, B., Reidelberger, R. and Rolls, B.J. Accurate energy compensation for intragastric and oral nutrients in lean males. *Am. J. Clin. Nutr.* 61: 754-764, 1995.
 35. Simpson, S.J. and White, P.R. Associative learning and locus feeding: evidence for a "learned hunger" for protein. *Anim. Behav.* 40: 506-513, 1990.
 36. Smith, B.K., York, D.A. and Bray, G.A. Activation of hypothalamic serotonergic receptors reduced intake of dietary fat and protein but not carbohydrate. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 277: R802-R811, 1999.
 37. Trigazis, L., Ortmann, A. y Anderson, G.H. Effect of a cholecystokinin A receptor blocker on protein induced food intake suppression in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 272: R1826-R1833, 1997.
 38. Trigazis, L., Vaccarino, F.J., Greenwood, C.E. and Anderson, G.H. CCK A receptor antagonists have selective effects on nutrient induced food intake suppression in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 276: R323-R330, 1999.
 39. Van Zeggeren, A. and Li, E.T.S. Food intake and choice in lean and obese Zucker rats after intragastric carbohydrate preloads. *J. Nutr.* 120: 309-316, 1990.
 40. Wang, J.F. and Koopmans, H.S. Alterations of energy and substrate metabolism in rats with large and sustained changes in daily food intake. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 269: R1475-R1480, 1995.
 41. Warwick, Z.S., McGuire, C.M., Bowen, K.J. and Synowski, S.J. Behavioral components of high fat diet hyperphagia: meal size and postprandial satiety. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278: R196-R200, 2000.
 42. Washburn, B.S., Bruss, M.L., Avery, E.H. and Freedland, R.A. Effects of exogenous on whole animal and tissue glucose use in female and male rainbow trout. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 265: R1241-R1247, 1992.
 43. Wilson, R.P. Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture* 124: 67-80, 1994.
 44. Yamamoto, T., Shima, T., Furuta, H. and Suzuki, N. Effect of water temperature and short-term fasting on macronutrient self-selection by common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 220: 635-646, 2003.

5.3. Influencia de la precarga de un nutriente en la selección de macronutrientes encapsulados en la lubina

Artículo enviado al *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* (mayo-2004).

Justificación

La lubina es un pez teleosteo capaz de regular su ingesta energética seleccionando a partir de fuentes puras de macronutrientes, aunque los mecanismos reguladores implicados en esta selección se desconocen. En mamíferos la ingesta previa de un nutriente antes de una comida (precarga) reduce la ingesta de alimento y modifica el patrón de selección de macronutrientes, sin embargo, no hay información sobre el papel que pueden desempeñar en peces. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la administración oral de precargas de macronutrientes (proteína, grasa o carbohidratos), en el interior de cápsulas de gelatina, en la posterior selección de macronutrientes encapsulados.

Material y métodos

Se utilizaron un total de 12 lubinas, alojadas individualmente en tanques de 75 l, provistos de un circuito cerrado de agua salada artificial. Los parámetros ambientales se mantuvieron constantes a lo largo de todo el periodo experimental. A los peces se les suministró una cápsula conteniendo la precarga de macronutrientes y 45 minutos después se les alimentó mediante macronutrientes puros encapsulados. Los peces se dividieron en dos grupos de acuerdo con sus preferencias previas por proteína o grasa, utilizando como criterio que los porcentajes de energía consumidos como proteína o grasa fuesen superiores al 40%.

Resultados y discusión

Las precargas de macronutrientes no modificaron la ingesta total de alimento, sin embargo, indujeron un cambio en el patrón de selección de macronutrientes. La precarga de carbohidratos produjo un aumento de la ingesta de carbohidratos (39%) y una disminución de la selección de proteína (20%), independientemente de las preferencias nutricionales previas del pez. La precarga de grasa indujo un aumento de la ingesta de grasa (32%) y una disminución de la P (18%) en los peces con una preferencia nutricional por la proteína, pero no en los peces que preferían alimentarse con grasa, en los cuales el patrón de selección de macronutrientes permaneció inalterado. La precarga de proteína sólo estimuló la selección de grasa (42%) en los peces que mostraron preferencia por proteína,

manteniendo constante el patrón de selección de macronutrientes en los peces con preferencia por grasa.

Conclusión

La administración oral de precargas de macronutrientes modifica el patrón de selección de macronutrientes en peces, actuando a través de mecanismos postingestivos. El efecto producido está influido por sus preferencias nutricionales previas y/o su estatus fisiológico, los cuales pueden depender de su capacidad metabólica.

Fish macronutrient selection through post-ingestive signals: effect of selective macronutrient deprivation.

V.C. RUBIO, F.J. SÁNCHEZ-VÁZQUEZ AND J.A. MADRID

This chapter has been submitted to American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology

Recent reports describe teleosts as being able to regulate energy intake by selecting from pure macronutrient sources, although the regulatory mechanisms involved in this selection remain unknown. The aim of the present work was to determine the effect of selective macronutrient deprivation on energy regulation and macronutrient selection, using for this purpose carbohydrate (CH), protein (P), and fat (F) packaged separately in gelatin capsules. Twenty-four individually housed sea bass were subjected to two experiments: (a) two macronutrient deprivation (TMD), and (b) one macronutrient deprivation (OMD). In TMD, fish were fed sequentially with P, CH, or F, and in OMD, they were fed sequentially with two separately packaged macronutrients (P and CH, CH and F, or P and F). There was a rapid reduction of macronutrient intake in TMD, reaching 80% inhibition after 4, 5, and 7 days of P, CH, and F intake, respectively. In OMD, the energy intake was significantly reduced during selective F deprivation, but not with P or CH deprivation. Although the fish were being fed with only two macronutrients, the relative proportions of these macronutrients in each selective deprivation phase were the same as the baseline. These results show that in deprivation studies fish need at least F plus one other macronutrient to regulate their energy intake, and that their macronutrient selection is stable even when one is absent. In summary, fish seem to regulate energy and macronutrient selection through post-ingestive mechanisms probably involving chemosensory detection in the gut, and/or post-absorptive mechanisms.

Feeding behaviour; food intake; macronutrient selection; macronutrient deprivation; fish.

PHYSIOLOGICAL MECHANISMS controlling energy balance in fish have concentrated most of the attention of experimental studies with the aim of contributing to the design of new diets adapted to the particular physiological conditions of fish. Selection of macronutrients has recently been demonstrated in several fish species by means of self-feeding techniques, giving the fish different macronutrients in the form of granulated feed (with different chemosensory properties) (2, 3, 17, 18, 23, 24), or pure macronutrients in colour-coded gelatin capsules (with identical chemosensory properties) (15, 16). The results showed teleosts to be capable of composing a complete diet in accord with their specific nutritional habits, whether carnivorous or omnivorous, and of regulating their energy intake by macronutrient

selection. The mechanisms involved in this regulation of macronutrient intake remain unknown, however.

The "dietary wisdom" paradigm set out by Curt Richter (13) is based on the premise that animals will select a diet that will optimally restore any metabolic imbalance that may have resulted from an energy challenge. According to this paradigm, the food types or macronutrients selected would reflect the nutritional requirements for the animal's previous physiological status to be restored. To date two main hypotheses have been proposed to explain macronutrient self-selection: (i) associative learning, and (ii) unlearned specific appetites. The first hypothesis is that animals learn an association between the ingestion of some substance and its post-ingestive consequences. The second hypothesis is that there exist unlearned specific appetites in mammals, at least. Rats appear to have an innate preference for the taste of certain nutrients including sugar, maltodextrins, some types of starch, fats, and proteins (1, 5, 20). Independently of the mechanism, whether learnt or innate, animals have to discriminate the macronutrient content of food before ingestion. To this end, they use the flavour, texture, and colour of food as external cues to its energy and qualitative composition (15).

Recently, fish have been described as being able to select a balanced diet by choosing among three pure macronutrients packaged in gelatin capsules (15), so that recognition of chemosensory properties of the feed at the oropharyngeal level does not seem to be a pre-requisite for the regulation of macronutrient intake, suggesting that an associative learning between capsule colour and content may take place through the evaluation of macronutrient intake by post-ingestive and/or post-absorptive mechanisms. Indeed, the observed stability of the pattern of macronutrient selection (15, 16) is remarkable, given the absence of texture or flavour cues.

Several fish species can survive for months without food, alternating feeding and fasting periods during their natural life cycle (10) in response to prey availability. It is generally accepted that during fasting the glycogen and fat deposits are the first to be mobilized (4, 19, 21). When both deposits are exhausted, protein is mobilized from several stores, principally from skeletal muscle (for a review, see ref. 10). In the case of sea bass, the transition from the mobilization of energy stores (fat and glycogen) to

structural stores (protein) occurs at around 50 days of starvation (7).

The metabolic and morphological consequences of fasting and re-feeding have been extensively studied in fish using a diet consisting of the three macronutrients (for a review, see ref. 10). Only a few studies have considered macronutrient intake after total (3, 22, 24) or selective (12, 22) macronutrient deprivation, in all cases using granulated diets consisting of a pair of macronutrients. Moreover, to the best of our knowledge, there have been no studies in fish of the influence of selective macronutrient deprivation on the macronutrient selection pattern using a three macronutrient choice protocol.

The objective of the present study was therefore to determine the influence of selective macronutrient deprivation on energy intake and on the pattern of macronutrient selection, using encapsulated macronutrients.

METHODS

Animals. Twenty four European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) provided by the CULMAREX S.A. fish farm (Aguilas, Murcia, Spain), of 243 ± 48 g in initial BW (mean $\pm$ SD), were kept individually in 75 l tanks equipped with a closed circuit of artificial seawater (SBR4 premium seawalt, Heinsberg, Germany). The tanks were isolated in chambers, with controlled environmental parameters, in the Chronobiology Laboratory of the University of Murcia, sound proofed and isolated from the outside. The photoperiod was set at 12:12 h light/dark cycle with lights on at 08:00 h by means of a timer (Data Orbis, Madrid, Spain) that controlled 15W fluorescent lamps. The illumination at the water surface was around 350 lux. The ambient temperature was regulated to keep the water temperature constant at $23.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Water parameters were measured daily and maintained at values ensuring the welfare of the fish.

Experimental diets. Fish were acclimated to the laboratory conditions for several weeks. During this period they were fed *ad libitum* once a day with a complete diet (with all three macronutrients) presented as gelatin capsules each containing pure macronutrients (Table 1). The encapsulated feed was prepared by filling 0.2 ml n° 4 gelatin capsules (Raig Farma, S.A., Barcelona, Spain) with powdered macronutrients, using a semi-automatic encapsulator (Tecniforma, Miranda de Ebro, Spain). During the experimental period, a three choice macronutrient paradigm was used as described in previous work (15, 16). Briefly, sea bass self select from three capsule types, each containing a single macronutrient source: protein (P), carbohydrate (CH), or fat (F) supplemented with a vitamin and mineral complex (Table 1). The sources were: P, vitamin free casein and gelatin (5:1); F, cod liver and soya oils (3:1); and CH, dextrin. The analytical composition of the capsules is given in Table 1. The assay techniques used were: moisture, by drying the samples at 110°C for 24 h to constant weight; proteins, by the Kjeldahl method ($\text{N} \times 6.25$); fat, by diethyl ether extraction; ash, by calcining at 450°C for 24 h; and the nitrogen free extract (NFE), calculated by subtraction of P +

F + ash. The capsules supplied to a given tank were stored in a single bag for at least 10 days to avoid any external contamination allowing the fish to distinguish their content by their external chemical properties. The capsules were colour coded according to their P, F, or CH content. The same colour-macronutrient relationship was maintained in a given tank throughout the experiment, but was balanced between tanks to avoid any possible colour effect. Each fish was provided with an equal number of capsules for each macronutrient, and the quantity offered was always greater than the fish could ingest. After 30 minutes (from 14:00 to 14:30 h), the remaining capsules were removed and counted to determine the real intake of each macronutrient.

Table 1. Ingredients and proximate analysis calculated from the assay of the macronutrients of the four kinds of capsules, expressed as mean ($n=4$).

	CD	P	F	CH
<i>Ingredients of capsules' content (g/kg dry weight)</i>				
Casein	430	783		
Gelatin	90	157		
Cod liver oil	158		705	
Soya oil	52		235	
Dextrin	210			940
Vitamin/Mineral mix	20	20	20	20
$\text{CaCO}_3/\text{CaPO}_4$	40	40	40	40

Proximate analysis of the capsules (% dry matter)

Dry matter	92.6	90.2	98.8	90.5
Gross protein	57.3	90.8	17.1	18.8
Bcher extract	16.7	0.6	80.7	0.7
NFE	22.0	3.3	1.1	77.4
Ash	4.0	5.3	1.1	3.1
Gross energy (kJ/g) ^a	23.7	22.2	35.6	17.6

^aCalculated from the macronutrient percentage mean using the following energy coefficients: 23.6 kJ/g for P; 38.9 kJ/g for F; and 16.7 kJ/g for CH (9).

Experimental design. Twenty four European sea bass maintained individually, were subjected to two experiments: (a) two macronutrient deprivation, and (b) one macronutrient deprivation.

Effect of two macronutrient deprivation (TMD). To determine the period that sea bass are able to feed with a single macronutrient source, each fish was provided sequentially with protein (P), carbohydrate (CH), or fat (F) capsules in excess. The control phase was used as the baseline, and, to ensure the fish's welfare, when the capsule intake inhibition reached 80% of the baseline, the deprivation period was concluded.

Effect of one macronutrient deprivation (OMD). To determine the effect of deprivation of one macronutrient on the intake of the other two, each fish was provided in excess with P, CH, and F capsules for 3 weeks (control); P and CH capsules (F deprivation) for 4 weeks; CH and F capsules (P deprivation) for 2 weeks; P and F capsules (CH deprivation) for 4 weeks; and, finally, P, CH, and F capsules (control 2) for 3 weeks. The period of P deprivation was only two weeks to ensure the fish's well being.

Data analysis. The gross energy intake was calculated using the following energy coefficients: 23.6 kJ/g for P; 38.9 kJ/g for F; and 16.7 kJ/g for CH (9). The results were

presented as the mean and its corresponding standard error. Mean daily food intake differences, for the number of capsules ingested of the different macronutrients, were compared statistically by a dependent samples *t* test. A three term moving average was used in order to smooth the wide amplitude fluctuations between days, observed in individual fish energy intake. The mean energy intake data were analysed by an ANOVA and the Tukey test for the comparison of paired means. Probability levels of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

TMD. The composition of the diet selected during the control phase, expressed in terms of energy intake, was 37% as P, 44% as F, and 19% as CH ($n=24$).

Sea bass fed a single macronutrient gradually reduced their intake (Figure 1). Fish deprived of both F and CH were not able to feed only on P, and reached 84% reduction in the number of P capsules ingested by the fourth day. Fish deprived of P and F showed a rapid reduction in CH intake from the first day onwards, to reach 80% inhibition by the fifth day. Similarly, fish deprived of P and CH reduced their ingestion of F capsules by 42% on the first day, reaching 84% reduction by the seventh day.

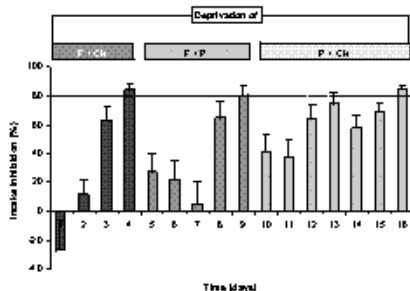


Figure 1. Evolution of the effect of two macronutrient deprivation (indicated by the horizontal bar at the top of graph) on food intake, expressed as percentage inhibition of the number of capsules ingested. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of 24 fish.

OMD. In terms of energy intake, the composition of the diet selected during the control period (baseline) was 34% as P, 48% as F, and 18% as CH ($n=24$).

The selective F deprivation induced a rapid and significant inhibition of energy intake (Figure 2). The percentage of energy ingested as P and CH was significantly lower (around 42%) than the baseline ($P=0.000$). As was the case in the control period, the percentage of P capsules selected was significantly greater than that of CH capsules [$T(28)=11.468$, $P=0.000$]. The pattern of P and CH selection was more stable than the baseline P and CH pattern

(recalculated for the removal of the F capsules, Figure 3).

Although P deprivation produced an inhibition of more than 30% in the total number of capsules ingested on the first day, the stability of the total energy intake was similar to that of the baseline (Figure 2). Significantly more F capsules were ingested than CH capsules [$T(14)=2.604$, $P=0.022$]. Similarly to the F deprivation case, the evolution of macronutrient selection was very stable (Figure 3), with percentages of F and CH selection that matched the percentages obtained in the baseline recalculated for the removal of the P capsules.

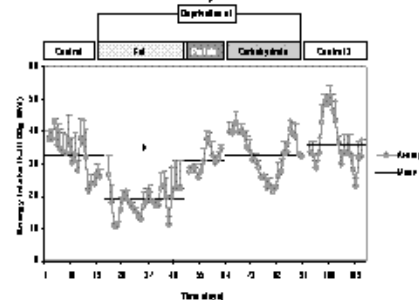


Figure 2. Daily energy selection pattern in terms of the total energy intake throughout the experimental phases (control; selective F, P, and CH deprivation; and control 2). Results are expressed as the moving average of three consecutive days $\pm$ SEM ($n=24$). The solid line represents the mean value obtained for each experimental phase. The different superscripts represent statistically significant differences, $P < 0.05$ (ANOVA).

In CH deprivation, significantly more P capsules were ingested than F capsules [$T(28)=8.762$, $P=0.000$]. Although overall the total energy intake during selective CH deprivation was at the same level as the baseline, it fluctuated widely (Figure 2). There were significant differences between P and F selection throughout this period (Figure 3). During the first 6 days of CH deprivation, a significantly greater percentage of F capsules was selected than the baseline (recalculated for the removal of the CH capsules) and the remainder of the CH deprivation period [$F=2.48$, $P=0.949$, $P=0.000$]. In the case of the P capsule selection, the differences were not statistically significant.

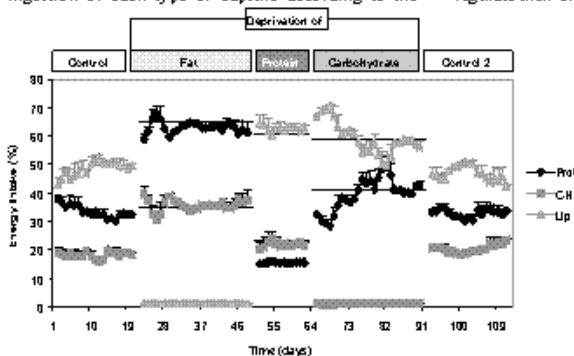
In the second control period, the total energy level and the macronutrient selection matched the baseline (control) from the first day (Figures 2, 3), with no compensatory intake of any macronutrient.

DISCUSSION

The present results have confirmed earlier findings (15, 16) that European sea bass are able to regulate their macronutrient selection, composing a complete diet in accord with their carnivorous nutritional preferences from three sets of macronutrient capsules (P, CH, F). All three capsule types had the same chemosensory properties at the oropharyngeal level, so that there were no flavour or texture clues to their macronutrient content. The fish therefore had to learn an association between the colour and the content of the capsules by means of post-ingestive and/or post-absorptive mechanisms (15). The relative composition of the diets selected during the two control phases (2.0P: 2.3F: 1CH in TMD, and 1.9P: 2.7F: 1CH in OMD) differed significantly from the 1.6P: 2.5F: 1CH proportion that would have resulted from random ingestion of each type of capsule according to the

new type of food renews their appetite, an effect that seems to be dependent on the food's organoleptic qualities (8, 14). In the present TMD experiments, a similar phenomenon was observed, although spread over several days. Feeding inhibition occurred progressively when the fish were fed a single macronutrient, independently of its nature. When the macronutrient was changed, there initially appeared a transient recovery of feed intake, followed by a progressive inhibition in the following days. This progressive aversion to a single type of macronutrient could be the result of a learnt association between the ingestion of a particular type of capsule and the negative effects on the fish's metabolism of the imbalance in macronutrient intake. The immediate change to a new nutrient could allow this imbalance to be compensated by a transient increase in intake.

As was found in earlier experiments, fish are able to regulate their energy intake by selecting from capsules



respective energy conversion coefficients (9). These control proportions corresponded to a final composition of the selected diet of 37% P, 44% F, and 19% CH (n=24) in the TMD experiment, and 34% P, 48% F, and 18% CH (n=24) in the OMD experiment, suggesting that recognition of the organoleptic properties of nutrients is not essential for macronutrient intake regulation.

As sea bass is considered to be carnivorous, its incapacity to feed from CH or F capsules only was to be expected. The reduction of around 80% after 4 days feeding on P capsules only was surprising, however, indicating that other macronutrients besides P are necessary to maintain the fish's appetite. The slightly longer time required to reach 80% inhibition in the CH and F ingestion than in the P ingestion could have been due to the proteinic nature of the gelatin wall of the capsules, which was 16-19% of the total capsule weight.

Mammals, including humans, fed a single type of food develop a sensory-specific satiety: when they cease to feed because of satiation, the presentation of a

containing separate pure macronutrients (15, 16). This was confirmed by the results of the OMD experiment which additionally demonstrated that the energy regulation was maintained when the fish were fed on P and F, or CH and F capsules, but not on P and CH capsules. Sea bass therefore seem to need at least F plus one other macronutrient to regulate their energy intake, in agreement with the findings of Vivas et al. (22) that sea bass presented nutrients in the form of granulated diets failed to regulate energy intake if F was not available. The reason may be that since F has the highest digestible energy density, a restriction in its intake would have to be compensated by a substantial increase in the volume of P and CH to maintain the level of energy intake.

Protein intake plays a key role in food intake regulation in carnivorous fish. Whereas in the aforementioned study using granulated feed consisting of a pair of macronutrients (22) sea bass consumed no CH and F in the absence of P (the selective restriction of protein indeed led to total fasting), in the present experiment, the fish maintained their energy intake

when fed only CH and F capsules. Therefore could be two reasons for this apparent contradiction between the results of the two experiments: (i) differences in the methodology employed, granulated diets (with different organoleptic properties) in front of encapsulated diets (with similar organoleptic properties), and/or (ii) the impossibility of producing total protein deprivation using encapsulated macronutrients because of the proteinic nature of the capsule wall, in which the amount of protein (gelatin), although of low quality, could be enough to allow the fish to continue regulating their energy intake.

Different methods based on macronutrient dissociation of the diet of sea bass have shown that the fish's selection of a balanced from pure macronutrients is remarkably stable (2, 3, 15, 16, 22). This great stability was also manifest in the OMD experiment. Indeed, the relative proportions of macronutrient selection remained very stable even when the fish were fed with only two macronutrients in each experimental phase. These results show that the fish are capable of distinguishing and selecting each of the three macronutrients contained in gelatin capsules. Only in the CH deprivation period did there appear a certain instability in the initial intake of P and F, with an increase in the percentage of F and a decrease in that of P relative to what would have been expected from the baseline values. These transient effects could be related to changes in insulin secretion induced by the CH deprivation. In a recent study (12) of CH deprived sea bass, the energy retention and P efficiency ratio were unaffected, but there was an increase in feeding efficiency and a decrease in growth. While the hepatosomatic index, hepatic glycogen, and lipid content declined with the selective CH fasting, the muscle lipid content remained unaffected, suggesting that dietary digestible CH enhanced the *de novo* synthesis and deposition in the liver of lipids (6, 11, 12). The plasma glucose levels of the CH deprived fish were similar to those of fish fed diets including CH, indicating that sea bass have a major capacity for gluconeogenesis from amino acids (12). These facts, together with the lack of stability in the evolution of the selection of P and F in the present study during the period of selective CH deprivation, seem to suggest that CH plays a major role in maintaining the energy balance and regulating macronutrient selection, at least in the very short term (a few days), although further studies will be needed to elucidate this point.

In sum, the present results provide evidence that, in macronutrient deprivation studies, fish seem to regulate energy with the intake of F plus at least one other macronutrient (CH or P), and maintain the stability of macronutrient selection through post-ingestive mechanisms probably involving chemosensory detection in the gut, and/or post-absorptive mechanisms.

This research was supported by grants from the "Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT)" project AGL2001 0698 to J.A. Madrid, EU (Contracted Action QSCA 2001 989 to F.J. Sánchez-Vázquez), and by the "Consejería de Trabajo y Política Social, Fondo Social Europeo" and "Fundación Séneca" (Integral Operative Program for CARM 2000 2006 of FSE to V.C. Rubio). The authors wish to thank M. Carmen Martín Jiménez and other staff of CULMAREX, S.A. for supplying the sea bass and for their kind support and assistance during the experiments.

REFERENCES

1. Ackroff, K., Vigorito, M. and Scalfani, A. Fat appetite in rats: the response of infant and adult rats to nutritive and nonnutritive oil emulsions. *Appetite* 15: 171-188, 1990.
2. Aranda, A., Sánchez-Vázquez, F.J., Zamora, S. and Madrid, J.A. Self design of diets by means of self feeders: validation of procedures. *J. Physiol. Biochem.* 56: 55-66, 2000.
3. Aranda, A., Sánchez-Vázquez, F.J. and Madrid, J.A. Effect of short term fasting on macronutrient self selection in sea bass. *Physiol. Behav.* 75: 105-109, 2001.
4. Cook, J.T., Sutterlin, A.M. and McNiven, M.A. Effect of food deprivation on oxygen consumption and body composition of growth enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 188: 47-63, 2000.
5. Deutsch, J.A., Moore, B.O. and Heinrichs, S.C. Unlearned specific appetite for protein. *Physiol. Behav.* 46: 619-624, 1989.
6. Dias, J., Alvarez, M.J., Díez, A., Arsel, J., Corraze, C., Baulista, J.M. and Kaushik, S.J. Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein:energy in juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 161: 169-186, 1998.
7. Echovarria, C., Martínez-Beltrán, M. and Zamora, S. Evolution of biometric indices and plasma metabolites during prolonged starvation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 118A: 111-125, 1997.
8. Le Magnen, J. Hypershagie provoquée chez le rat blanc par l'alévation du mécanisme de sauté péristaltique. *C. R. Soc. Biol.* 147: 1753-1757, 1956.
9. Miglavs, I. and Jabling, M. The effects of feeding regime on proximate body composition and patterns of energy deposition in juvenile Arctic char, *Salvelinus alpinus*. *J. Fish Biol.* 35: 1-11, 1989.
10. Navarro, I. and Gutiérrez, J. Fasting and starvation. In: *Biochemistry and molecular biology of fishes*, edited by P.W. Hocherika and T.P. Moorman. Amsterdam: Elsevier, 1995, vol. A, p. 393-434.
11. Peres, H., Gonçalves, P. and Oliva-Teles, A. Glucose tolerance in seabream (*Sparus aurata*) and in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 179: 415-432, 1999.
12. Peres, H. and Oliva-Teles, A. Utilization of raw and gelatinized starch by European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 205: 287-299, 2002.
13. Rikhter C.P. A behavioristic study of the activity of the rat. *Comp. Psychol. Monog.* 1: 1-54, 1922.
14. Rolls, B.J., Rowe, E.A., Rolls, E.T., Kingston, B., Meegan, A. and Gunary, R. Variety in a meal enhances food intake in man. *Physiol. Behav.* 26: 215-221, 1981.
15. Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. and Madrid, J.A. Macronutrient selection through post-ingestive signals in sea bass fed on gelatin capsules. *Physiol. Behav.* 78: 795-803, 2003.
16. Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. and Madrid, J.A. Oral administration of melatonin reduces food intake and modifies macronutrient selection in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. Physiol. Res.* 2004 (in press).
17. Sánchez-Vázquez, F.J., Yamamoto, T., Akiyama, T., Madrid, J.A. and Tabata, M. Selection of macronutrients by goldfish operating self feeders. *Physiol. Behav.* 65: 211-218, 1998.
18. Sánchez-Vázquez, F.J., Yamamoto, T., Akiyama, T., Madrid, J.A., and Tabata, M. Macronutrient self selection through demand feeders in rainbow trout. *Physiol. Behav.* 66: 45-51, 1999.
19. Sargent, J., Henderson, R.J. y Tachon, D.R. The lipids. In: *Fish Nutrition*, edited by J.E. Halver. London: Academic Press, 1989, pp. 154-209.
20. Scalfani, A. Starch and sugar tastes in rodents: an update. *Brom Res. Bull.* 27: 383-386, 1991.

21. Shearer, K.D. Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. *Aquaculture* 119: 65-88, 1994.
22. Vivas, M., Sánchez-Vázquez, F.J., García García, B. and Madrid, J.A. Macronutrient self selection in European sea bass in response to dietary protein or fat restriction. *Aquac. Res.* 34: 271-280, 2003.
23. Yamamoto, T., Shima, T., Furuta, H., Shirahishi, M., Sánchez-Vázquez, F.J. and Tabata, M. Influence of decreasing water temperature and shortening of the light phase on macronutrient self selection by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and common carp *Cyprinus carpio*. *Fish. Sci.* 67: 420-429, 2001.
24. Yamamoto, T., Shima, T., Furuta, H. and Suzuki, N. Effect of water temperature and short term fasting on macronutrient self selection by common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 220: 655-666, 2003.

54. Selección de macronutrientes en los peces a través de señales post-ingestivas: efecto de la privación selectiva de macronutrientes

Artículo enviado al *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* (mayo-2004).

Justificación

Los mecanismos fisiológicos que controlan el balance energético en peces han concentrado numerosos estudios experimentales, ayudando en el diseño de nuevas dietas adaptadas a las condiciones fisiológicas del pez. Los peces regulan su ingesta energética a partir de fuentes separadas de macronutrientes, pero los mecanismos implicados en esta selección se desconocen.

En la actualidad se sigue aceptando el paradigma enunciado por Curt Richter en 1922, basado en la premisa de que los animales seleccionarán una dieta que restaure óptimamente un posible desequilibrio energético resultante de un desbalance energético. El objetivo de este estudio fue determinar la influencia de la privación selectiva de macronutrientes en el patrón de macronutrientes seleccionados, utilizando para ello macronutrientes puros contenidos en el interior de cápsulas de gelatina, dotados de las mismas propiedades quimiosensoriales.

Material y métodos

Se utilizaron un total de 24 lubinas, alojadas individualmente en tanques de 75 l, provistos de un circuito cerrado de agua salada artificial. Los parámetros ambientales (temperatura, fotoperiodo y salinidad) se mantuvieron constantes. El estudio constó de dos experimentos diferentes: (a) privación de 2 macronutrientes (TMD), y (b) de un macronutriente (OMD). En TMD los animales fueron alimentados sucesivamente con proteína (P), carbohidratos (CH) o grasa (F), mientras que en OMD los peces fueron alimentados secuencialmente con pares de macronutrientes (P y CH; CH y F, P y F) encapsulados individualmente.

Resultados y discusión

TMD. Aparece una rápida y pronunciada inhibición de la ingesta alcanzando el 80% de inhibición a las 4, 5 y 7 días de alimentación con P, CH y F respectivamente.

OMD. La ingesta energética se redujo significativamente durante la privación de F, pero no durante la privación de P o CH. Pese a que los peces son capaces de alimentar-

se sólo con dos macronutrientes, la proporción relativa de macronutrientes en cada fase de privación selectiva permaneció inalterada respecto de la línea base.

Conclusión

Los peces necesitan al menos dos macronutrientes, incluyendo en todos los casos la F, para regular su ingesta energética, siendo su selección de macronutrientes muy estable aun en ausencia de un macronutriente. Parece que dicha regulación tiene lugar a través de mecanismos postingestivos, utilizando para ello la detección quimiosensorial en el tracto gastrointestinal y/o mecanismos postabsortivos.

Role of cholecystokinin and its antagonist proglumide on macronutrient selection in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.)

V.C. RUBIO, F.J. SÁNCHEZ-VÁZQUEZ AND J.A. MADRID

This chapter has been submitted to *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*

Teleost fish, and sea bass in particular, are able to adjust their energy intake when they feed on pure macronutrient sources, but the mechanisms regulating macronutrient selection are still unknown. Since cholecystokinin (CCK) has been reported to modify macronutrient selection patterns in mammals, we explored the effect of CCK administered orally to European sea bass on their selection of separately encapsulated macronutrients. CCK doses of 0.05, 0.15 and 0.25 mg/kg BW administered into gelatine capsules produced a significant dose dependent inhibition of total food intake (15, 23 and 45%, respectively) by evenly reducing the ingestion of all macronutrients and, therefore, without affecting their relative proportions in the diet. Oral administration of proglumide, a non specific CCK receptor antagonist, at doses of 5, 15 and 25 mg/kg BW, induced a dose related total food intake increase by 2, 17 and 44%, respectively, without changes in the macronutrient selection pattern. Coadministration of proglumide (25 mg/kg BW) and CCK (0.25 mg/kg BW) in a single prefeed capsule blocked the effects observed with CCK alone. In conclusion, orally administered CCK induced an anorectic effect on both total food and single macronutrients intake, an effect that is counteracted by the CCK antagonist proglumide.

CCK, food intake, macronutrient selection, proglumide, satiety.

CHOLECYSTOKININ is a mammalian brain-gut peptide synthesized and released by endocrine cells from the gastrointestinal tract in response to the presence of food (dietary lipids and peptides) in the gut (33, 44, 51). In mammals, cholecystokinin (CCK) directly inhibits food intake by inducing satiety and reducing meal size (49), and also indirectly by binding to gut receptors that send a vagal afferent signal to the hypothalamus (8). CCK inhibits gastric emptying by reducing gut motility, induces gastrointestinal vasodilatation and gall bladder contraction, and stimulates gastric acid and pancreatic secretion (5, 10, 19, 26). CCK is also produced during feeding in several brain areas, where it acts as a neurohormone to reduce food intake (6, 43).

Two different CCK receptor subtypes, CCK-A and CCK-B, have been identified in mammals. CCK-A receptors predominate in peripheral tissues, where they mediate peripheral satiety. CCK-B receptors, on the other hand, are especially abundant in the central nervous system, mediating satiety at brain level (17). Proglumide is a non-specific CCK receptor antagonist that binds to both receptor subtypes (21), and has been shown to inhibit CCK effects at both gastrointestinal and CNS levels (9, 17).

In fish, CCK has been involved in gastrointestinal regulation, with effects being reported on gut motility

(gastric emptying), gall bladder contraction, and gastric acid and pancreatic secretion (1, 16, 35). CCK binding sites have been found in a number of brain areas, including hypothalamus, telencephalon and pituitary (22, 23, 32, 37), and also in gut (22, 25, 46) and pancreas (15). Peripheral or central administration of CCK-8 to goldfish strongly inhibits food intake, acting as a satiety signal at both levels (22). In some fish species, the central nervous system appears to be the major site of action, whereas in others CCK seems to act predominantly at peripheral level (14). Oral administration of CCK-A receptor antagonists to rainbow trout has been reported to increase food intake, presumably abolishing the peripheral inhibitory effect of CCK (18), whereas intracerebroventricular and intraperitoneal administration of proglumide has been shown to block both central and peripheral satiety effects in goldfish (47). In rats, peripherally (3, 27, 30) or centrally (45) administered CCK has been described to reduce the intake of all macronutrients, and also modifies the macronutrient selection pattern, suggesting that it may play a role in macronutrient intake regulation.

Fish are known to be able to compose a complete diet from separate sources of macronutrients (protein, carbohydrate and fat). Thus, in demand-feeding experiments, several fish species select a diet in line with their specific nutritional habits, whether carnivorous or omnivorous, from separate incomplete granulated diets containing different macronutrient proportions (2, 41, 42, 50). This ability to select a complete diet has been recently confirmed using macronutrients packaged into gelatine capsules (39, 40), and thereby without interference from the flavor and texture intrinsic to granulated diets.

Encapsulation is a technique that also allows accurate administration of drugs and other substances to fish without the handling stress associated with classical administration methods such as injection (18, 40), which allows studying feeding behavior during long periods (40). Using this methodology it has been recently shown that fish macronutrient selection patterns can be modified by oral administration of melatonin (40), however, the physiological mechanisms regulating macronutrient selection are still unknown.

The goal of the present work was to analyze the effects of oral administration of gelatine capsules containing increasing doses of CCK and proglumide on European sea bass food intake regulation and selection of pure encapsulated macronutrients.

METHODS

Animals. European sea bass (*Oreochromis labrax*, L.) provided by CULMAREX S.A. fish farm (Aguilas, Murcia, Spain), were individually kept in 75 l tanks equipped with a closed circuit of artificial seawater (SBR4 premium sea salt, Heinsberg, Germany). The tanks were isolated into chambers, with controlled environmental parameters, placed in the Chronobiology Laboratory of the University of Murcia, soundproofed and isolated from the outside. The ambient temperature was regulated to maintain the water temperature constant at $23.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. The photoperiod was set at 12:12 h light/dark cycle with lights on at 08:00 h by means of a timer (Data Orbis, Madrid, Spain) that controlled a series of 15 W fluorescent lamps providing 350 lux at the water surface. Water parameters were daily measured and controlled to ensure fish welfare.

Experimental diets. Several weeks were allowed for fish acclimation to laboratory conditions. During this period they were fed *ad libitum* once a day on pure macronutrients contained into gelatine capsules. The encapsulated feed was prepared by filling n° 4, 0.2 ml gelatine capsules (Roug Farma, S.A., Barcelona, Spain) with powdered macronutrients using a semi-automatic encapsulator (Tecnifarma, Miranda de Ebro, Spain). A three choice diet paradigm was used, that enable fish to select from three different types of capsules, each one containing a single macronutrient source (protein, carbohydrate or fat) supplemented with vitamins and minerals. The macronutrient sources used were fish and soybean oil (3:1) as fat (F); vitamin free casein and gelatine (5:1) as protein (P), and dextrin as carbohydrate (CH) source. Analytical compositions for the different capsules are given in Table 1. The assay techniques used were: moisture, by drying the samples at 110°C for 24 h to constant weight; proteins, by the Kjeldahl method ($\text{N} \times 6.25$); lipids, by diethyl ether extraction; ash, by heating at 450°C for 24 h; and nitrogen free extract (NFE) by subtraction of protein + lipids + ash. All capsules supplied to a given tank were stored in a single bag for at least 10 days to avoid that some external contamination might allow the fish to distinguish their content by their external chemical properties.

Table 1. Ingredients and proximate analysis calculated from the assay of the macronutrients of the four kinds of capsules, expressed as mean ($n=4$).

	CD	P	F	CH
<i>Ingredients of capsules' content (g/kg dry weight)</i>				
Casein	430	783		
Gelatin	90	157		
Cod liver oil	158		705	
Soya oil	52		235	
Dextrin	210			940
Vitamin Mineral mix	20	20	20	20
$\text{CaCO}_3/\text{CuPO}_4$	40	40	40	40
<i>Proximate analysis of the capsules (% dry matter)</i>				
Dry matter	92.6	90.2	98.8	90.5
Gross protein	57.3	90.8	17.1	18.8
Ether extract	16.7	0.6	80.7	0.7
NFE	22.0	3.3	1.1	77.4
Ash	4.0	5.3	1.1	3.1
Gross energy (kJ g^{-1}) ^a	23.7	22.2	35.6	17.6

CD, complete diet.

^aCalculated from the macronutrient percentage mean using the following energy coefficients: 23.6 kJ/g for P, 38.9 kJ/g for F, and 16.7 kJ/g for CH (31).

Experimental design. The study consisted of three consecutive experiments addressing the effects of CCK, pramlumide, and co-administered CCK and pramlumide, on fish food intake and macronutrient selection.

CCK administration. For the analysis of the effect of CCK alone (CCK-8s, Sigma, Steinheim, Germany) on food intake and macronutrient selection, 12 individually housed sea bass of 234 ± 41 g in body weight (mean $\pm$ SD) were used. On days 1-5, they were given an initial capsule which was a placebo containing only the excipient (powdered complete feed, composed by the three macronutrient) and hence a CCK dose of 0 mg/kg BW. On days 6-10, their initial capsule contained 0.05 mg/kg BW of CCK; on days 11-15, 0.15 mg/kg BW; and on days 16-20, 0.25 mg/kg BW. Finally on days 21-25, their initial capsule was again a placebo. This initial capsule was of a different colour from those containing the pure macronutrients. Forty five minutes after the ingestion of this initial capsule (placebo or CCK), each sea bass was provided with colour coded macronutrient containing capsules. These were equal in number for each macronutrient, and the quantity provided was always greater than the fish could ingest. After 30 min (from 14:00 to 14:30 h), the remaining capsules were removed and counted to determine the real intake of each macronutrient. The capsules were placed in a single floating feeder. The colour coding for the macronutrient content of the capsules was maintained unchanged throughout the experiment for each individual, but was different between individuals. With this design, any effect of position or colour of the capsules on the selection of macronutrient was avoided.

Pramlumide administration. For the determination of the effects of pramlumide alone, 12 individually housed sea bass of 305 ± 46 g in body weight (mean $\pm$ SD) were administered with increasing doses (5, 15, and 25 mg/kg BW) of pramlumide sodium salt (Sigma, Steinheim, Germany) using the same protocol as for the previous experiment.

CCK and pramlumide coadministration. A subsequent experiment of similar design in 12 individual fish of 388 ± 66 g (mean $\pm$ SD) examined the effects of the highest dose of pramlumide (25 mg/kg BW) on the anorectic response of the highest dose of CCK (0.25 mg/kg BW).

Data analysis. Food intake is expressed as g/100g BW per day. The gross energy intake was calculated using the following energy coefficients: 23.6 kJ/g for P, 38.9 kJ/g for F, and 16.7 kJ/g for CH (31). The results are presented as the mean with the corresponding standard error, and were analyzed using one way ANOVA followed by Dunnett's test for post hoc determination of significant differences from control ($P < 0.05$).

RESULTS

CCK administration. In terms of energy, the diet selected by sea bass during the first placebo phase was made of 37% P, 45% F, and 18% CH (Table 2). Oral CCK-8s administration significantly inhibited total food intake in a dose-dependent manner. Thus, CCK

doses of 0.05, 0.15, and 0.25 mg/kg BW reduced food intake by 15, 23, and 45%, respectively (Figure 1a), with respect to the first placebo baseline [$F(4,50) = 5.47$, $P = 0.001$]. As Figure 2a shows, CCK reduced the ingestion of all macronutrients to a similar extent. The highest dose (0.25 mg/kg BW), for example,

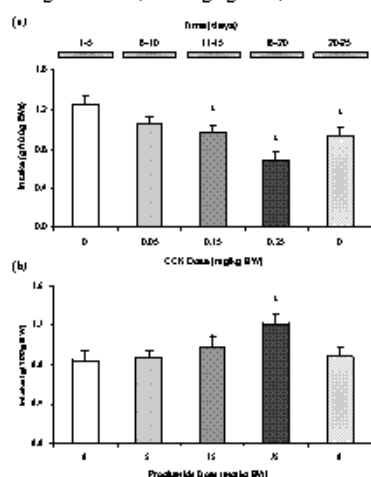
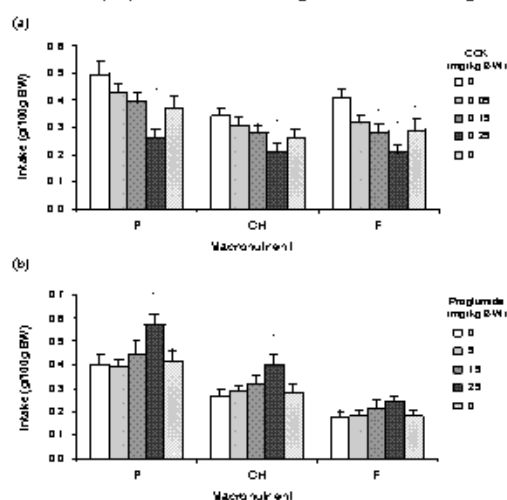


Figure 1. Effect of the oral administration of increasing doses of (a) CCK (0, 0.05, 0.15 and 0.25 mg/kg BW) and (b) proglumide (0, 5, 15 and 25 mg/kg BW) on total food intake expressed as amount (g/100g BW per day). Each CCK dose was administered during 5 consecutive days, at the end of the experiment a new dose of 0 mg/kg BW (placebo) was used during 5 days as control. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM ($n=12$ fish per dose). The superscripts represent statistically significant differences respect baseline, $P < 0.05$ (ANOVA).

Figure 2. Relationship between (a) CCK or (b) proglumide dose and the selection of macronutrients, expressed as total intake (g/100g BW per day). The specifications were the same than in Fig. 1. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM ($n=12$ fish per dose). The superscripts represent statistically significant differences respect baseline, $P < 0.05$ (ANOVA).



significantly inhibited fat intake by 49% ($P < 0.005$), protein intake by 47% ($P < 0.005$), and CH intake by 39% ($P < 0.05$). That macronutrient composition remains unaffected by CCK administration is confirmed by Figure 3a, showing the percentage of each macronutrient on the diet selected by fish.

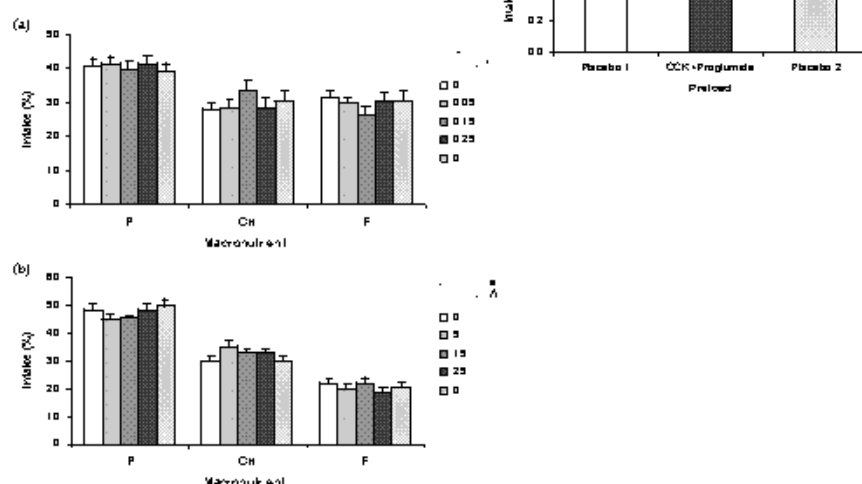
Proglumide administration. The mean energy composition of the diet selected by sea bass during the first placebo phase was 46% P, 33% F, and 21% CH (Table 2). Oral administration of proglumide (5, 15 and 25 mg/kg BW) induced a dose-related food intake increase of 2, 17 and 44%, respectively (Fig. 1b), over the first placebo baseline [$F(4,50) = 3.00$, $P = 0.027$], increasing significantly the intake of P by 43% ($P < 0.05$) and CH by 52% ($P < 0.05$) with the 25 mg/kg BW dose (Fig. 2b). However, as occurred with CCK, the pattern of macronutrient selection was unaffected by proglumide (Fig. 3b).

CCK and proglumide coadministration. The mean energy composition of the diet selected by sea bass during the first placebo phase was 43% P, 36% F, and 21% CH (Table 2). Oral proglumide (25 mg/kg BW), coadministered with CCK (0.25 mg/kg BW) into a single preload capsule, prevented the effect of CCK on total food (Fig. 4) and macronutrient intake (Fig. 5a), with no effect on the macronutrient selection pattern (Fig. 5b).

DISCUSSION

Macronutrient encapsulation appears to be a valuable tool for analyzing regulation of macronutrient self-selection in fish without interference from the external chemosensory properties inherent to a granulated diet. Using this

methodology, sea bass are able to select a complete diet, which matches its carnivorous habits, from pure macronutrient sources incorporated into separate colour-coded gelatine capsules. This is accomplished by associative learning between capsule macronutrient



content and colour through post-ingestive and/or post-absorptive mechanisms (39, 40). Previously has been reported that total food intake is not modified when fish are fed pure macronutrient capsules or capsules contained a complete diet; however the proportions of each type of macronutrient capsule was different (39). The energy composition and macronutrient proportion of the diets selected during the initial placebo phases for all three experiments is shown in Table 2. The approximate macronutrient proportions differ significantly from the 1.6P: 2.5F: 1.0CH proportion that would have occurred if the ingestion of all capsules had been random.

Figure 4. Effect of oral coadministration of CCK (0.25 mg/kg BW) and proglumide (25 mg/kg BW) on food intake. Each treatment was administered during 5 consecutive days. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of 12 fish. No statistically significant differences were found between CCK + proglumide versus placebo administration.

Fish food intake may be highly variable from one day to the next (4, 24, 36, 39), and it is also reduced by handling stress (7), which could lead to erroneous interpretation of the results in experiments involving invasive techniques of drug administration and/or short-term evaluation of food intake. The present work has shown the feasibility of administering encapsulated drugs over 5-day periods, which minimizes the effects of both stress and normal day-to-day variability.

In fish, CCK is involved on feeding regulation through gastrointestinal mechanism. Since peripheral injections of CCK-8 are known to substantially reduce food intake in goldfish (22, 47), some authors have suggested a possible action, at least partial, on gut contractility and/or gastric emptying (22). In support of this hypothesis, administration of exogenous CCK to fish has been reported to delay gastric emptying, reduce stomach motility and induce pyloric sphincter contraction (35). In addition to these peripheral effects, it has been described a wide distribution of CCK/gastrin immunoreactive fibers and perikarya in the brain and pituitary of fish (22), suggesting a role for CCK/gastrin peptides in the central regulation of feeding behavior (22, 37, 38).

In goldfish, central or peripheral administration of CCK-8s induces substantial food intake inhibition (22, 47), whereas peripheral administration of non-sulphated CCK-8 induces a less effective food intake reduction (22). In addition, meal intake stimulates the synthesis and release of CCK, producing a transitory postprandial increase of CCK mRNA levels and increasing CCK gene expression in the brain, suggesting that synthesis and release of CCK triggered by a meal could be involved in the inhibitory central action of this peptide on food intake (38).

In some fish species, these widespread effects of CCK seem to be mediated predominantly by a peripheral satiety mechanism, whereas in others, the

central nervous system appears to be the main site of action (14). In the present experiments, oral CCK-8s caused a dose-dependent inhibition of total food intake. In principle, this anorexigenic effect of CCK on food intake could be mediated at peripheral or central level. In mammals, nutrients (11, 28, 29, 44), as well as central (6, 12) and/or systemic (6) injections of exogenous CCK are associated with increased CCK plasma levels; nevertheless if these effects occurred also in fish remains unknown.

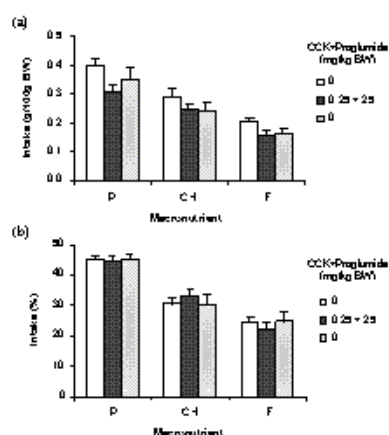


Figure 5. Effect of oral coadministration of CCK (0.25 mg/kg BW) and proglumide (25 mg/kg BW) on macronutrient selection, expressed as (a) macronutrient intake (g/100g BW per day) and (b) macronutrient percentage. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of 12 fish. No statistically significant differences were found between CCK-proglumide versus placebo administration.

Proglumide is a non-specific CCK receptor antagonist, binding to both receptor subtypes (21), that has been shown to inhibit the effects of CCK on both gastrointestinal tract and central nervous system in mammals (9, 17) and fish (47). Oral proglumide induced a dose-related total food intake increase with respect to the placebo baseline, thus abolishing the inhibitory action of endogenous CCK on food intake. Oral co-administration of proglumide with CCK abolished the inhibitory effect of exogenous CCK on food intake. Therefore, in sea bass, proglumide prevents the satiating effect of endogenous and exogenous CCK, as it has been reported for mammals and goldfish (9, 17, 47).

The reduction induced in total food intake by CCK is produced as consequence of the decrease in a similar proportion of the intake of all macronutrients; consequently, the macronutrient selection pattern was not modified by CCK. Proglumide antagonized the effect of both endogenous and exogenous CCK on macronutrient intake without modifying the

macronutrient selection pattern. This high stability in the proportion of macronutrient selected after the activation of CCK receptors was not observed in mammals (3, 27, 30, 45). For example, in rats CCK has been reported a lack of effect on P intake (27), and also to produce a sustained P intake reduction up to six hours after the injection (30). These widespread CCK effects on the macronutrient selection pattern, with different actions on the same species, suggest the interference of other uncontrolled external factors, such as previous meals, feeding time, etc., that must be taken into account. The lack of CCK effect on fish macronutrient selection percentages may be related to the methodology used in these fish experiments. The encapsulation of macronutrients avoids the interference of chemosensory properties of nutrients at oropharyngeal level in macronutrient selection and it has been suggested that CCK is involved in the chemosensory food perception by gustatory and olfactory systems (38). This last is supported by the fact that CCK changes sucrose palatability, producing a satiety effect in rats (13) and by the presence of many CCK binding sites and high CCK-like immunoreactivity levels in facial and vagal lobes, olfactory bulbs and tracts, as well as several telencephalic areas of fish (22, 23).

In conclusion, orally administered CCK has an anorexigenic effect on both total food and all macronutrients intake, these effects being counteracted by the CCK antagonist proglumide. The mechanisms involved have yet to be clarified in fish.

This research was supported by grants from the "Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT)" (project AGL2001 0608 to J.A. Madrid), EU (Contract Action QSCA 2001 989 to F.J. Sánchez-Vázquez) and by the "Consejería de Trabajo y Política Social, Fondo Social Europeo" and "Fundación Séneca" (Integral Operative Program for CARM 2000 2006 of TSE to V.C. Rubio). The authors wish to acknowledge to M. Carmen Martín Jiménez and other staff from CULMAREX, S.A. for supplying the animals and for their kind support and assistance during the experiments.

REFERENCES

1. Aldman, G., Grove, D.J. and Holmgren, S. Duodenal acidification and intra arterial injection of CCKs increase gallbladder motility in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocr.* 86: 20-25, 1992.
2. Aranda, A., Sánchez-Vázquez, F.J. and Madrid, J.A. Self design of fish diets by means of self feeders: validation of procedures. *J. Physiol. Biochem.* 56: 155-166, 2000.
3. Avery, D.D. and Livovsky, M. Peripheral injections of bombesin and cholecystokinin affect dietary self selection in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 25: 7-11, 1986.
4. Azzaydi, M., Madrid, J.A., Zamora, S., Sánchez-Vázquez, F.J. and Martínez, P.J. 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, 1998.
5. Beglinger, C. Effect of cholecystokinin on gastric motility in humans. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Physiol.* 271: 219-225, 1996.
6. Blevins, J.E., Stanley, B.G. and Reidelberger, R.D. Brain regions where cholecystokinin suppresses feeding in rats. *Brain Res.* 860: 1-10, 2000.

7. Boujard, T., Dugy, X., Genner, D., Gasset, C. and Grig, G. Description of a modular, low cost, scale meter for the study of feeding behavior and food preferences in fish. *Physiol. Behav.* 52: 1101-1106, 1992.
8. Broberger, C. and Hökfelt, T. Hypothalamic and vagal neuropeptide circuitries regulating food intake. *Physiol. Behav.* 74: 669-682, 2001.
9. Corp, E.S., Curtis, M., Gibb, J. and Smith, C.P. The effect of centrally administered CCK receptor antagonists on food intake in rats. *Physiol. Behav.* 61: 823-827, 1997.
10. Covasa, M. and Ritter, R.C. Adaptation to high fat diets reduces inhibition of gastric emptying by CCK and intestinal oleate. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278: R166-R170, 2000.
11. Covasa, M., Marcuson, J.K. and Ritter, R.C. Diminished satiation in rats exposed to elevated levels of endogenous or exogenous cholecystokinin. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280: R231-R237, 2001.
12. Crawley, J. and Corwin, R.L. Biological actions of cholecystokinin. *Peptides* 15: 731-755, 1994.
13. Cross-Mellor, S.K., Kent, W.D.T., Osenkopp, K.-P. and Kavaliers, M. Differential effects of hypopolysaccharide and cholecystokinin on sucrose intake and palatability. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 277: R705-R715, 1999.
14. De Pedro, M. and Björnsson, B.T. Regulation of food intake by neuropeptides and hormones. In: *Food Intake in Fish*, edited by D. Houlihan, T. Boujard and M. Jobling. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2001, p. 289-296.
15. Ellorson, C.D., Carneiro, N.M., Killian, J.D., Comley, C. and Sheridan, M.A. Cholecystokinin, neuropeptide Y and galanin modulate the release of pancreatic somatostatin 25 and somatostatin 14 in vivo. *Regul. Peptides* 105: 11-12, 1996.
16. Einarsen, S., Jönsson, A.C. and Davies, P.S. Seasonal variation in cortisol activity in juvenile Atlantic salmon upper and lower modal groups. *J. Fish Biol.* 51: 1209-1218, 1997.
17. Gardner, J.D. and Jensen, R.T. Cholecystokinin receptor antagonists. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 246: G471-G476, 1984.
18. Gellineau, A. and Boujard, T. Oral administration of cholecystokinin receptor antagonists increase feed intake in rainbow trout. *J. Fish Biol.* 58: 716-724, 2001.
19. Granger, D.N., Richardson, P.D.F., Krietsis, P.R. and Mortillaro, N.A. Intestinal blood flow. *Gastroenterology* 78: 837-843, 1980.
20. Gutwiler, J.-P., Drewe, J., Kellerer, S., Hildebrand, P., Krauthelm, A. and Beglinger, C. Interaction between CCK and a peripheral reduction of food intake is mediated by CCK A receptors in humans. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279: R189-R195, 2000.
21. Hahn, W.F., Jensen, R.T., Lemp, C.F. and Gardner, J.D. Proglumide and benzamide: members of a different class of cholecystokinin receptor antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6204-6208, 1981.
22. Himick, B.A. and Peter, R.E. CCK/gastrin like immunoreactivity in brain and gut, and CCK suppression of feeding in goldfish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 267: R841-R851, 1994.
23. Himick, B.A., Vigna, S.R. and Peter, R.E. Characterization of cholecystokinin binding sites in goldfish brain and pituitary. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 271: R137-R143, 1996.
24. Juell, J.E., Furevik, D.M. and Bjørndal, Å. Demand feeding in salmon farming by hydroacoustic food detection. *Aquacult. Eng.* 12: 155-167, 1993.
25. Killian, A.J., Holmgren, S., Jönsson, A.-C., Dekker, K. and Groth, J. Neuropeptide Y, substance P, gastrin, cholecystokinin, and bombesin in the intestine of the tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and the goldfish (*Carassius auratus*): immunohistochemical detection and effects on electrophysiological characteristics. *Gen. Comp. Endocrinol.* 88: 351-363, 1992.
26. Li, Y., Hao, Y. and Ouyang, C. High affinity CCK A receptors on the vagus nerve mediate CCK stimulated pancreatic secretion in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 273: G679-G685, 1997.
27. Mamoun, A.H., Bergstrom, J. and Sodersten, P. Cholecystokinin octapeptide inhibits carbohydrate but not protein intake. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 273: R972-R980, 1997.
28. Maltzinger, D., Gutwiler, J.-P., Drewe, J., Orban, A., Engel, R., D'Amato, M., Ravati, L. and Beglinger, C. Inhibition of food intake in response to intestinal lipid is mediated by cholecystokinin in humans. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 277: R1718-R1724, 1999.
29. Maltzinger, D., Degen, L., Drewe, J., Meuli, J., Duebendorfer, R., Ruckstuhl, M., D'Amato, M., Ravati, L. and Beglinger, C. The role of long chain fatty acids in regulating food intake and cholecystokinin release in humans. *Gastroenterology* 118: 688-693, 2000.
30. McCoy, J.G., Stump, B. and Avery, D.D. Intake of individual macronutrients following IP injections of BBS and CCK in rats. *Peptides* 11: 221-225, 1990.
31. Miglavs, I. and Jobling, M. The effects of feeding regime on proximate body composition and patterns of energy deposition in juvenile Arctic char, *Salvelinus alpinus*. *J. Fish Biol.* 35: 1-11, 1989.
32. Moons, L., Ballen, T.F. and Vandesande, F. Comparative distribution of substance P (SP) and cholecystokinin (CCK) binding sites and immunoreactivity in the brain of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Peptides* 13: 37-46, 1992.
33. Moran, T.H. Cholecystokinin and satiety: current perspectives. *Nutrition* 16: 858-865, 2000.
34. Moran, T.H., Kalz, L.F., Plata-Salamán, C.R. and Schwartz, G.J. Disordered food intake and obesity in rats lacking cholecystokinin A receptors. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 274: R618-R625, 1998.
35. Olsson, C., Aldman, C., Larsson, A. and Holmgren, S. Cholecystokinin affects gastric emptying and stomach motility in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 202: 161-170, 1999.
36. Papadimitriou, M. and Boujard, T. 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, 1996.
37. Peyon, P., Lin, X., Himick, B.A. and Peter, R.E. Molecular cloning and expression of cDNA encoding brain preprocholecystokinin in goldfish. *Peptides* 19: 199-210, 1998.
38. Peyon, P., Said, H., Lin, X. and Peter, R.E. Regional variation in cholecystokinin gene expression in goldfish brain. *Mol. Brain Res.* 74: 190-196, 1999.
39. Rubio, Y.C., Sánchez-Vázquez, F.J. and Madrid, J.A. Macronutrient selection through post-ingestive signals in sea bass fed on gelatin capsules. *Physiol. Behav.* 78: 795-803, 2000.
40. Rubio, Y.C., Sánchez-Vázquez, F.J. and Madrid, J.A. Oral administration of melatonin reduces food intake and modifies macronutrient selection in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. Pineal Res.* 2004 (in press).
41. Sánchez-Vázquez, F.J., Yamamoto, T., Akiyama, T., Madrid, J.A. and Tabata, M. Selection of macronutrients by goldfish operating self feeders. *Physiol. Behav.* 65: 211-218, 1998.
42. Sánchez-Vázquez, F.J., Yamamoto, T., Akiyama, T., Madrid, J.A. and Tabata, M. Macronutrient self selection through demand feeders in rainbow trout. *Physiol. Behav.* 66: 45-51, 1999.
43. Schick, R.R., Yalish, T.L. and Go, V.L.W. An intragastric meal releases the putative satiety factor cholecystokinin from hypothalamic neurons in rats. *Brain Res.* 370: 349-353, 1986.
44. Spannagel, A.M., Nakano, I., Tawil, T., Chey, W.Y., Liddle, R.A. and Green, G.M. Adaptation to fat markedly increases pancreatic secretory response to intraduodenal fat in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 270: G128-G135, 1996.
45. Thibault, L., Nagai, K., Hashida, A., Yanaiharu, N. and Nakagawa, H. Satiety due to CCK 8 derivative infusion into VMH is related to specific macronutrient selection. *Physiol. Behav.* 47: 911-915, 1990.
46. Vigna, S.R., Fisher, B.L., Morgan, J.L.M. and Rosenquist, C.L. Distribution and molecular heterogeneity of cholecystokinin like immunoreactive peptides in the brain and gut of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.* 82C: 143-146, 1985.
47. Volkoff, H., Eykholbakh, A.J. and Peter, R.E. Role of leptin in the control of feeding of goldfish *Carassius auratus*: interactions with cholecystokinin, neuropeptide Y and orexin A, and modulation by fasting. *Brain Res.* 972: 90-100, 2003.
48. Wolfowitz, O.M., Corti, B., Weingartner, H., Baccaria, L., Thompson, K., and Liddle, R.A. Hunger in humans induced by MK 329: a specific peripheral type cholecystokinin receptor antagonist. *Biol. Psychiatry* 28: 169-173, 1990.
49. Wollman, T. and Reidberger, R. Role of cholecystokinin in the anorexia produced by duodenal delivery of peptide in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 276: R1701-R1709, 1999.
50. Yamamoto, T., Shima, T., Furuta, H. and Suzuki, N. Effect of water temperature and short term fasting on macronutrient self selection by common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 220: 655-666, 2003.
51. Yok, D.P., Brenner, L. and Ritter, R.C. CCK receptor antagonists attenuate suppression of sham feeding by intestinal

5.5. Papel de la colecistoquinina y su antagonista proglumide en la selección de macronutrientes en la lubina (*Dicentrarchus labrax*, L.)

Artículo enviado al *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* (mayo-2004).

Justificación

La colecistoquinina (CCK) es un péptido que inhibe la ingesta de alimento en mamíferos y peces y modifica la selección de macronutrientes en mamíferos. Hasta el momento, los mecanismos por los cuales la lubina es capaz de regular su ingesta energética y su patrón de selección de macronutrientes se desconocen. Por ello, examinamos el efecto de la administración oral de CCK y de su antagonista proglumide en la posterior selección de macronutrientes por la lubina.

Material y métodos

Se utilizaron 36 lubinas, alojadas individualmente en tanques de 75 l, provistos de un circuito cerrado de agua salada artificial, y mantenidas en condiciones medioambientales constantes. A 24 lubinas se les administraron dosis crecientes de CCK-8s (0,05, 0,15 y 0,25 mg kg⁻¹ del peso corporal) o de proglumide (5, 15 y 25 mg kg⁻¹ del peso corporal), en el interior de cápsulas de gelatina. A las 12 lubinas restantes se les administró simultáneamente una dosis de 0,25 mg kg⁻¹ p.c. de CCK y 25 mg kg⁻¹ de p.c. de proglumide. Transcurridos 45 minutos desde la ingesta de dichas sustancias, los peces fueron alimentados mediante macronutrientes puros encapsulados separadamente.

Resultados y discusión

La CCK produjo una reducción dosis-dependiente de la ingesta total de alimento del 15, 23 y 45%, respectivamente, modificando la ingesta de macronutrientes. La dosis de 0,15 mg kg⁻¹ originó una inhibición del 30% en la ingesta de grasa, mientras que la dosis de 0,25 mg kg⁻¹ redujo la ingesta de todos los macronutrientes (49% grasa, 47% proteína y 39% carbohidratos). Sin embargo, no fueron observados efectos significativos en el porcentaje de macronutrientes seleccionados para ninguna dosis de CCK-8s. La administración oral de proglumide, un antagonista no específico de los receptores de la CCK, indujo un aumento significativo dosis-dependiente de la ingesta total de alimento del 2, 17 y 44%, respectivamente, sin cambios en el patrón de selección de macronutrientes. La co-administración de CCK y proglumide bloqueó el efecto inhibitor de la ingesta de alimento producido por la CCK.

Conclusión

La administración oral de CCK induce un efecto anorexígeno tanto en la ingesta total de alimento como en la ingesta de todos los macronutrientes en la lubina, siendo este efecto revertido por un antagonista de la CCK, el proglumide.

Serotonin affects the quantity and the quality of macronutrient selection in European sea bass *Dicentrarchus labrax* L.

V.C. RUBIO, F.J. SÁNCHEZ-VÁZQUEZ AND J.A. MADRID

This chapter has been submitted to *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*

Teleost fish are able to regulate their energy intake selecting from pure macronutrients sources, but the regulatory mechanisms involved in macronutrients selection remain unknown. It is known that serotonin (5-HT) reduces food intake in mammals and fish and modifies the macronutrients selection pattern in mammals; however, no information is available about its role on macronutrients selection in fish. The aim of this work is to determine the effect of orally administered 5-HT (0.1, 0.5 and 2.5 mg kg BW⁻¹) into gelatine capsules on the subsequent macronutrient selection, using for this purpose gelatine capsules including carbohydrates or protein or lipids separately. The ingested 5-HT was released into the plasma of the fish, reaching a level two times greater than the controls, 45 minutes after the ingestion of a capsule containing 2.5 mg kg BW⁻¹ of 5-HT. The indoleamine (0.1, 0.5 and 2.5 mg kg BW⁻¹) produced a dose related reduction in total food intake of 31, 49 and 37% respectively, respect to the baseline, modifying the macronutrient selection pattern. The percentage of fat selected was significantly reduced whereas the percentage of protein significantly increased after the administration of 2.5 mg kg BW⁻¹ of 5-HT, but no changes were observed in the proportion of carbohydrate selected for any 5-HT doses. In conclusion, oral administration of 5-HT affected both the amount of food intake and the pattern of macronutrients selected. This is the first evidence supporting a role of 5-HT as a neurohumoral mediator involved in the selection of macronutrients in fish.

Feeding behaviour; food intake; macronutrient selection; satiety; serotonin.

BRAIN SEROTONIN is synthesized in neurons where it is stored in dense vesicles on the presynaptic membrane (16), whereas peripheral serotonin is synthesised and released by enterochromaffin cells in gut mucous (11, 19) in response to different stimulus such as gastric distension, hyperosmotic solutions or glucose presence (19). Brain serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) is involved in the regulation of feeding behaviour and body weight in mammals. The stimulation of 5-HT hypothalamic synthesis and release reduce food intake and body weight, increasing the energy expenditure (22). Furthermore, it has been observed that both endogenous and exogenous 5-HT decrease food intake at central level in mammals (9, 14, 49). 5-HT is also involved in the control of food intake in fish, showing an anorectic effect shortly when serotonin was administered intracerebroventricularly (i.c.v.) but not intraperitoneally (i.p) (13).

Several papers have been devoted to study the influence of 5-HT on macronutrient intake in mammals. Brain 5-HT increases in response to food intake in mammals (41), and its exogenous administration reduces carbohydrate (CH) with few changes in protein (P) and fat (F) intake (23) or with a decrease in F intake (27, 43). The effect of 5-HT seems to be related with the cerebral site of administration. The 5-HT injection in the paraventricular nucleus (PVN) suppresses CH intake and, with a slight increase or no effect at all in P or F intake (23, 25). The injection in the ventromedial (VMN) and suprachiasmatic (SCN) nuclei selectively decreases CH intake and increases P and F intake, whereas in others hypothalamic and extrahypothalamic sites a reduced effect or a lack of effect have been described (24). Therefore, it has been suggested that endogenous 5-HT is active in the PVN and VMN in the process of end the CH-rich meals (21).

Macronutrients self-selection has been started to study recently in fish. The ability to compose a complete and balanced diet has been demonstrated in some teleosts fish characterized by different feeding habits (carnivorous, omnivorous...) (2, 40, 55). The diet orosensory properties do not seem to be necessary to regulate macronutrient intake. This was demonstrated for European sea bass which revealed a capacity to recognize and select a diet with similar composition, both using granulated macronutrient diets (with different chemosensory properties) or encapsulated diets (with similar chemosensory properties) labelled with different colours (2, 37, 38); however, the mechanisms involved in fish regulation of macronutrient intake remain unknown. We previously described a food intake inhibition in European sea bass, by oral administration of melatonin (into gelatine capsules), with changes in the macronutrient selection pattern (38). This selective effect of melatonin on macronutrient intake was the first study showing the existence of neurohumoral mediators involved in the macronutrient selection by fish.

Therefore, the objective of the present work was to study in fish the effect of 5-HT, administered orally into gelatine capsules, on the regulation of food intake and the selection of pure encapsulated macronutrients.

METHODS

Animals. European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) provided by the CULMAREX S.A. fish farm (Águilas, Murcia, Spain), were kept individually in 75 l tanks

equipped with a closed circuit of artificial sea water (SBR4 premium sea salt, Heimbach, Germany). Tanks were isolated in chambers with controlled environmental parameters. The chambers were assembled in the Chronobiology Laboratory of the University of Murcia, sound proofed and isolated from the outside. The room temperature was regulated to keep the water temperature constant at $23.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. The photoperiod was set at 12:12 h light:dark cycle, with lights on at 08:00 h, by means of a timer (Data Orbis, Madrid, Spain) that controlled 15W fluorescent lamps. The illumination at the water surface was around 350 lux. Water parameters were daily measured and controlled.

Experimental diets. Fish were allowed to acclimatize to the laboratory conditions for several weeks. During this period they were fed *ad libitum* once a day with a complete diet (CD), containing the three macronutrients in pure state (P, CH and F), mixed inside gelatine capsules (Table 1). The encapsulated feed was prepared by filling gelatine capsules n° 4, 0.2 ml (Rais Pharma, S.A., Barcelona, Spain) with powdered macronutrients, using a semi-automatic encapsulator (Tecnifarma, Miranda de Ebro, Spain). During the experimental period a three choice macronutrient paradigm as described in previous papers was used (37, 38). Briefly, fish have to self select from three capsules type, each containing a single macronutrient source (or P or CH or F) supplemented with vitamins and minerals (Table 1). The F sources used were cod liver oil and soya oil (3:1). Protein was provided by vitamin free casein and gelatine (5:1) and dextrin was the CH source. The analytical composition of capsules is presented in Table 1. For proximate analysis, the following techniques were applied: moisture, by drying the samples at 110°C for 24 h to constant weight; proteins, by the Kjeldahl method ($\text{N} \times 6.25$); fats, by diethyl ether extraction; ash, by heating at 450°C for 24 h; and the nitrogen free extract (NFE), calculated by subtraction of protein + fats + ash. The capsules supplied to a given tank were stored in a single bag for at least 10 days to avoid that some external contamination might allow the fish to distinguish their content by their external chemical properties. Fish were fed with colour coded capsules containing P, F or CH. The same colour macronutrient relation was maintained in a given tank throughout all experiment, but, between tanks, the colour of macronutrient capsules was balanced to avoid a possible colour effect.

Experimental design. The study consisted of two sets of experiments. The first one deals with the dynamics of the appearance of 5 HT in the plasma, and the second one on the effect of the 5 HT on food intake and macronutrient selection.

Dynamics of the appearance of 5 HT in the plasma. To determine the kinetics of the appearance of 5 HT in the plasma, we used 42 individually housed fish of 170 ± 36 g in BW (mean $\pm$ SD). Each fish received a single dose (2.5 mg kg BW^{-1}) of 5 HT (SIGMA, Steinheim, Germany) contained inside a gelatine capsule. After anaesthesia blood samples were taken at different times (0, 20, 45, 90 and 180 minutes) for the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) of 5 HT ($n=6$) (BL, Hamburg, Germany).

Dose response curves of plasma 5 HT. Increasing doses of the 5 HT were administered to 24 sea bass of 167 ± 40 g in BW (mean $\pm$ SD) to determine the plasma 5 HT response curves. Each fish received one of the different doses of 5 HT

(0.1, 0.5, or 2.5 mg kg BW^{-1}) into a gelatine capsule. Forty five min after capsule ingestion (the time of the maximum concentration observed in the previous experiment) blood was extracted for the ELISA of 5 HT ($n=6$).

Effect of 5 HT on food intake and macronutrient selection. To determine the influence of 5 HT on total food and macronutrient intake, 12 individually housed sea bass of 180 ± 35 g in BW (mean $\pm$ SD) were used. On days 1–10, fish received an initial capsule (placebo) containing only excipient (0 mg kg BW^{-1}). During days 11–20, 21–30 and 31–40 fish received a capsule containing 0.1, 0.5 and 2.5 mg kg BW^{-1} respectively. At the end of the experiment on days 41–50, the initial capsule was again placebo. To avoid interferences with the conditioning process, the colour of the capsule containing serotonin was different than capsules containing macronutrients. Forty five minutes after the ingestion of this initial capsule (placebo or 5 HT) each fish was provided in excess with three sets of equal number of capsules containing a single pure macronutrient (or P, or CH, or F). Thirty minutes later (from 14:00 to 14:30 h), the remaining capsules were removed and counted to determine the real intake of each macronutrient.

Macronutrient preferences of sea bass for P or F were characterized using the percentage of baseline energy consumed as F or P, according to the modified criteria used in mammals (43), e.g., $\geq 40\%$ as F = fat preferring fish, $\geq 40\%$ as P = protein preferring fish. In P preferring fish the diet selected during the baseline (placebo 1) was: $47 \pm 1\%$ P; $21 \pm 2\%$ CH and $33 \pm 2\%$ F, whereas in F preferring fish was: $36 \pm 2\%$ P; $16 \pm 2\%$ CH and $46 \pm 3\%$ F.

Table 1. Ingredients and proximate analysis calculated from the assay of the macronutrients of the four kinds of capsules, expressed as mean ($n=4$).

	CD	P	F	CH
<i>Ingredients of capsules' content (g kg⁻¹ dry weight)</i>				
Casein	430	783		
Gelatine	90	157		
Cod liver oil	158		705	
Soya oil	52		235	
Dextrin	210			940
Vitamin/Mineral mix	20	20	20	20
$\text{CaCO}_3/\text{CaPO}_4$	40	40	40	40
<i>Proximate analysis of the capsules (% dry matter)</i>				
Dry matter	92.6	90.2	98.8	90.5
Gross protein	57.3	90.8	17.1	18.8
Ether extract	16.7	0.6	80.7	0.7
NFE	22.0	3.3	1.1	77.4
Ash	4.0	5.3	1.1	3.1
Gross energy (kJ g ⁻¹) ^a	23.7	22.2	35.6	17.6

^aCalculated from the macronutrient percentage mean using the following energy coefficients: 23.6 kJ g⁻¹ for P; 38.9 kJ g⁻¹ for F; and 16.7 kJ g⁻¹ for C (26).

Data analysis. Food intake was expressed as g 100 g BW^{-1} day⁻¹. The gross energy intake was calculated using the following energy coefficients: 23.6 kJ g⁻¹ for P; 38.9 kJ g⁻¹ for F; and 16.7 kJ g⁻¹ for CH (26). The results were presented as the mean and its corresponding standard error, and were statistically analysed using ANOVA, and the

Tukey test ($p < 0.05$) for the comparison of paired means. Macronutrient energy intakes were analysed with multivariate, repeated measures ANOVA with respect to treatment and comparisons between treatments groups were adjusted by Bonferroni test.

RESULTS

Dynamics of the appearance of 5-HT in the plasma. The oral administration of 2.5 mg kg BW⁻¹ of 5-HT induces approximately a 2-fold increase in the 5-HT plasma level relative to the physiological level for that time of day (3.5 ng ml⁻¹) and 2.3-fold increase respect the nocturnal level, reaching the maximum values in 45 minutes (6.2 ng ml⁻¹) (Fig. 1).

Dose-response curve of 5-HT in plasma. The administration of increasing doses of 5-HT into gelatine capsules produced a dose-dependent increase in the 5-HT plasma concentration, 45 min after oral ingestion. This increase was statistically significant (Fig. 2) for the highest dose tested.

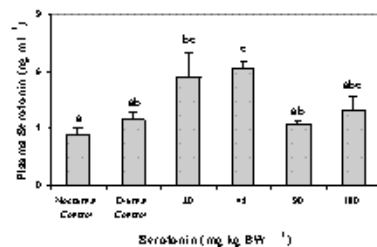


Figure 1. Dynamics of the appearance of 5-HT in plasma after oral administration of 2.5 mg 5-HT per kg BW. Results are expressed as mean $\pm$ SEM ($n=6$). The different superscripts represent statistically significant differences, $P < 0.05$ (ANOVA).

Dose-response curve of 5-HT in plasma. The administration of increasing doses of 5-HT into gelatine capsules produced a dose-dependent increase in the 5-HT plasma concentration. This increase was statistically significant (Fig. 2) for the highest dose tested.

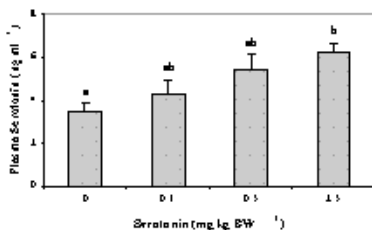


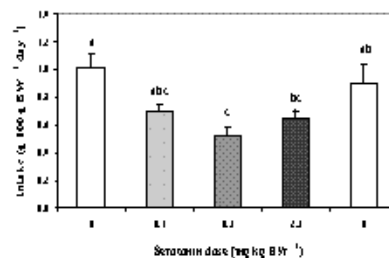
Figure 2. Dose response curve of plasma 5-HT determined 45 min after oral administration of different doses of 5-HT (0.1, 0.5 and 2.5

mg kg BW⁻¹). Results are expressed as mean $\pm$ SEM ($n=6$). The different superscripts represent statistically significant differences, $P < 0.05$ (ANOVA).

Effect of 5-HT on food intake and macronutrient selection. The composition of the diet selected during the first placebo phase, expressed in terms of energy intake, was 44% as P, 37% as F, and 19% as CH. The 5-HT doses of 0.1, 0.5 and 2.5 mg kg BW⁻¹ induced a dose-dependent reduction in total food intake by 31, 49, and 37%, respectively (Fig. 3) in respect to the baseline of the first placebo phase [$F(4,50) = 4.87$, $P = 0.002$]. The intake of macronutrients in the diet selected was reduced by 5-HT (Fig. 4a), although with the dose of 2.5 mg this inhibition was not balanced among macronutrients. Figure 4b shows this selective effect of 2.5 mg of 5-HT on the macronutrient composition of selected diets lead to an increase in the percentage of P [$F(4,50) = 11.59$, $P = 0.000$] and a decrease in F selection [$F(4,50) = 8.34$, $P = 0.000$]. The CH percentage was unaffected at any of 5-HT doses.

In P-preferring fish, the macronutrient composition of the selected diet remained unaffected for all tested doses of 5-HT (Fig. 5a). However, in F-preferring fish (Fig. 5b), 2.5 mg induced a significant increase in P energy selection [$F(4,20) = 4.86$, $P = 0.007$] and decrease in F energy intake [$F(4,20) = 6.06$, $P = 0.002$], with no changes in CH selection.

As it is shown in figure 6, the effect of 5-HT on macronutrient selection (expressed as percentage of energy) requires some days to stabilize. This effect is most evident with the changes induced by the 2.5 dose and after returning to placebo treatment at the end of the experiment. Fish need at least 7-10 days to recover the patterns of macronutrient intake observed with the



first placebo treatment.

Figure 3. Effect of oral administration of increasing doses of 5-HT (0.1, 0.5 and 2.5 mg kg BW⁻¹) on total food intake. Results are expressed as mean $\pm$ SEM ($n=12$). The different superscripts represent statistically significant differences, $P < 0.05$ (ANOVA).

5.6. La serotonina afecta la cantidad y la calidad de macronutrientes seleccionados en la lubina *Dicentrarchus labrax* L.

Artículo enviado al *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* (mayo-2004).

Justificación

La serotonina (5-HT) reduce la ingesta de alimento en mamíferos y peces y modifica el patrón de selección de macronutrientes en mamíferos, sin embargo, no hay información disponible sobre su posible actuación en la regulación de la selección de macronutrientes en los peces. Por ello el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la 5-HT administrada oralmente sobre sus concentraciones plasmáticas y la posterior selección de macronutrientes encapsulados.

Material y métodos

Doce lubinas fueron alojadas individualmente en tanques de 75 l, provistos de un circuito cerrado de agua salada artificial, en los cuales se mantuvieron constantes las condiciones medioambientales. A los peces se les administraron dosis crecientes de 5-HT de 0,1, 0,5 y 2,5 mg kg⁻¹ del peso corporal en el interior de cápsulas de gelatina, determinándose su cinética de aparición en plasma, las concentraciones plasmáticas inducidas por las diferentes dosis de 5-HT a los 45 min. de su ingestión y su efecto sobre la ingesta total de alimento y el patrón de selección de macronutrientes. Los peces se dividieron en dos grupos de acuerdo con sus preferencias previas por proteína o grasa, utilizando como criterio que los porcentajes de energía consumidos como proteína o grasa fuesen superiores al 40%.

Resultados y discusión

La 5-HT ingerida fue liberada a la circulación, induciendo una concentración dos veces superior a la de los controles, 45 minutos después de su ingestión. La indolamina indujo una reducción dosis-dependiente de la ingesta total de alimento del 31, 49 y 37%, respectivamente, modificando el patrón de selección de macronutrientes. El porcentaje de grasa seleccionada se redujo significativamente, mientras que el de proteína fue significativamente aumentado tras la dosis de 2,5 mg kg⁻¹ p.c., por el contrario no se observaron cambios en la proporción de carbohidratos seleccionados con ninguna de las dosis de 5-HT utilizadas.

Conclusión

La administración oral de serotonina afecta tanto la cantidad de alimento consumido como el patrón de macronutrientes seleccionados. Los resultados obtenidos son la primera evidencia que sustenta un papel de la 5-HT como un mediador neurohumoral implicado en la regulación de la selección de macronutrientes en peces.

J. Pineal Res. 2004

Doi:10.1111/j.1600-079X.2004.00134.x

Copyright © Blackwell Munksgaard 2004
Journal of Pineal Research

Oral administration of melatonin reduces food intake and modifies macronutrient selection in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.)

Abstract. Seasonal and circadian changes have been observed in dietary selection and feeding behavior of fish. It is known that the light-dark cycle is the principal mediator of the production of pineal-derived melatonin in fish, and also that the digestive tract synthesizes and secretes melatonin and indeed is the principal extrapineal source of this secretor product, suggesting that melatonin could be involved in the processes of feeding and/or digestion. Fish are capable of regulating their energy intake from separate sources of macronutrients, but the mechanisms of this selection process are unknown. In the present paper, we explored the effect of melatonin administered orally to European sea bass on their selection of encapsulated macronutrients. Melatonin doses of 0.1, 0.5, and 2.5 mg/kg body weight were administered in gelatin capsules. The voluntarily ingested melatonin was absorbed into the fish's plasma, 45 min after the administration reaching a level depending on the dose that was up to 26 times greater than the controls with the highest dose of melatonin. The indole produced a dose-dependent inhibition of total food intake of 9, 26, and 34%, respectively, and also modified the pattern of macronutrient selection. Carbohydrate intake was significantly reduced (by 17, 33, and 42% for the three doses, respectively), but the observed reductions in fat and protein intake were not statistically significant. On the contrary, fat percentage significantly increased for the highest dose, but no changes were observed in the protein or carbohydrate percentages for any of the melatonin doses. In conclusion, orally administered melatonin affected both the amount of food consumed and the pattern of macronutrient selected. This is the first evidence for the existence of neurohumoral mediators involved in the selection of macronutrients in fish.

V. C. Rubio, F. J. Sánchez-Vázquez and J. A. Madrid

Department of Physiology, Faculty of Biology,
University of Murcia, Murcia, Spain

Key words: feeding behavior, fish, food intake, macronutrient selection, melatonin, satiety

Address reprint requests to Vera Cruz Rubio
Department of Physiology, Faculty of Biology,
University of Murcia, Campus de Espinardo
30100 Murcia, Spain
E-mail: vesacruz@um.es

Received December 3, 2003
accepted March 3, 2004

Introduction

In free-living European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.), seasonal changes have been observed in dietary selection [1] and in feeding behavior, feeding by night in winter and by day for rest of the year [2]. There are photoperiod-linked circadian changes in the quality of the food taken by some fish [3, 4]. The light-dark cycle is known to be the principal mediator of the production of pineal-derived melatonin in fish [5–7], with low plasma melatonin levels associated with the light phase and high levels with darkness [5–8]. There are also seasonal changes in plasma melatonin levels, the duration of the high levels at night is longer during short photoperiods (winter) than during long photoperiods (summer) [9, 10]. As well as the association with circadian and seasonal rhythms in fish, melatonin is also involved in the regulation of neural and endocrine activities, breeding and migratory behavior [7], pigmentation [11], and osmoregulation [12]. In mammals it has been shown to be

involved in growth, development, sexual maturation, the breeding cycle, ageing, and cellular immunity [13], and it is a powerful antioxidant [14, 15].

Many workers have shown that melatonin is present in the gastrointestinal tract (GIT) [16–19], suggesting that the hormone might play a role in the processes of food ingestion [18, 20]. It has been postulated that the synthesis of melatonin by the enterochromaffin cells of the intestine depends more on the presence of nutritional factors and on feeding behavior [16, 18, 20] than on the photoperiod. Melatonin triggers the digestive processes essential for the appropriate use of the food [20], acts as a paracrine and/or autocrine factor in the intestine [19], and protects against pathological alterations in the GIT [21, 22]. It regulates gastrointestinal motility [18, 23] and food intake in rat [16], mouse [17], pig [20], hamster [24], and goldfish [25].

Fish are known to have the capacity to choose a complete diet (containing the three macronutrients) from separate

Rabó et al.

sources of macronutrients [4, 26, 27, 28, 29]. Thus, in demand-feeding experiments, goldfish [4], rainbow trout [26], European sea bass [27], and common carp [28] select a diet related with their specific nutritional habits, carnivorous or omnivorous, from individually incomplete granulated diets containing different proportions of macronutrients. This diet selecting capacity of fish has recently been confirmed even when the food sources were macronutrient packaged in gelatin capsules [29], thereby avoiding the interference from the senses of taste and smell that is present with the granulated diets.

Encapsulation allows drugs and other substances to be administered to fish without the handling stress associated with the classical administration by injection, allowing the study of feeding behavior over long periods.

The physiological mechanisms regulating fish's capacity to select a complete diet from separate sources of macronutrients are still unknown. The objective of the present work was therefore to study in fish the influence of increasing doses of melatonin, administered orally inside gelatin capsules, on the regulation of food intake and the selection of pure encapsulated macronutrients.

Materials and methods

Animal housing

The study was carried out in the Chronobiology Laboratory of the University of Murcia. This was soundproofed and isolated from the outside. The sea bass were provided by the CULMAREX S.A. fish farm (Aguilas, Murcia, Spain). They were kept individually in 75 L tanks equipped with a closed circuit of artificially salted water (SERA premium sea salt, Heinsberg, Germany). The tanks were

isolated in chambers with controlled environmental parameters. The ambient temperature was regulated to keep the water temperature constant at $23.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. The photoperiod was set at 12 L:12 D (lights on at 08.00 hr) by means of a timer (Data Orbis, Madrid, Spain) that controlled 15 W fluorescent lamps. The illumination at the water surface was 350 lux (irradiance about $300 \mu\text{W}/\text{cm}^2$).

Several weeks were allowed for acclimation of the fish to the laboratory conditions. During this period they were fed *ad libitum* once a day on pure macronutrients contained inside gelatin capsules.

Diet manufacture

The encapsulated feed was prepared by filling 0.2 mL n°4 gelatin capsules (Roig Farma, S.A., Barcelona, Spain) with powdered macronutrients, using a semi-automatic encapsulator (Tecnifarma, Miranda de Ebro, Spain). A three-choice diet paradigm was used, that enable fish to select from three different types of capsule, each containing a single macronutrient source (protein, carbohydrate or fat) supplemented with vitamins and minerals. The macronutrient sources used were vitamin-free casein (BBA Lactalis Industrie, Bourgarré, France) and gelatin (Anaya, Murcia, Spain) (5.1) as protein, cod liver oil (Acofarma, Terrasa, Spain) and soya oil (Moreno Dólera, Murcia, Spain) (3.1) as fats, and dextrin (Scharlau, Barcelona, Spain) as carbohydrate. All the capsules contained a vitamin and mineral complex supplement (Dibaq Diprolag, S.A., Fuentepeyayo, Spain). The capsules supplied to a given tank were stored in a single bag to avoid that some external contamination might allow the fish to distinguish their content by their external chemical properties. Table 1 gives the results of the analysis of the composition of the

	Complete	Protein	Fat	Carbohydrate
Ingredients of capsules' content (g/kg dry weight)				
Casein	430	183		
Gelatin	90	187		
Cod liver oil	158		105	
Soya oil	52		235	
Dextrin	210			940
Vitamin and mineral mix ^a	20	20	20	20
CaCO ₃ /Ca PO ₄	40	40	40	40
Proximate analysis of the capsules (% dry matter)				
Dry matter	92.6 $\pm$ 0.1 ^a	90.2 $\pm$ 0.1 ^b	98.8 $\pm$ 0.2 ^c	90.5 $\pm$ 0.3 ^b
Gross protein	57.3 $\pm$ 0.2 ^a	90.8 $\pm$ 0.1 ^b	17.1 $\pm$ 0.1 ^c	18.8 $\pm$ 0.1 ^d
Ether extract	16.7 $\pm$ 0.4 ^a	0.6 $\pm$ 0.0 ^b	80.7 $\pm$ 1.2 ^c	0.7 $\pm$ 0.0 ^b
NFE	22.0 $\pm$ 0.4 ^a	3.3 $\pm$ 0.3 ^b	1.1 $\pm$ 1.0 ^b	77.4 $\pm$ 0.2 ^c
Ash	4.0 $\pm$ 0.2 ^a	5.3 $\pm$ 0.3 ^b	1.1 $\pm$ 0.2 ^c	3.1 $\pm$ 0.1 ^a
Gross energy (kJ/g) ^{bc}	23.7 $\pm$ 0.1	22.2 $\pm$ 0.1	35.6 $\pm$ 0.5	17.6 $\pm$ 0.0

Table 1. Ingredients and proximate analysis calculated from the assay of the macronutrients of the four kinds of capsules, expressed as mean $\pm$ S.E.M. (n = 4).

^aVitamins and minerals (mg/kg diet): retinol, 20,000 (IU/kg diet); calciferol, 6000 (IU/kg diet); alpha tocopherol, 240; L ascorbate, 1600; vitamin K₁, 20; thiamin, 50; riboflavin, 50; pyridoxine, 33; cobalamin, 0.06; biotin, 1.52; pantothenic acid, 160; folic acid, 15; nicotinic acid, 300; inositol, 350; betain, 3500; polyglycides, 240; beta glucanes, 100; Zn, 0.4; Se, 0.4; I, 10; Fe, 4; Cu, 3; Mg, 115; Co, 0.4; Mn, 24; Cl, 16; Lys, 26; Arg, 12; Phe, 8; Trp, 14; dicalcium phosphate, 20; calcium carbonate, 20 g/kg diet.

^{bc}Calculated from the macronutrient percentage mean using the following energy coefficients: 23.6 kJ/g for protein; 38.9 kJ/g for fat; and 16.7 kJ/g for carbohydrate, 30).

The different superscript letters represent statistically significant differences, $P < 0.05$ (ANOVA).

capsules. The assay techniques used were: moisture, by drying the samples at 110°C for 24 hr to constant weight; proteins, by the Kjeldahl method ($N \times 6.25$); lipids, by diethyl ether extraction, ash, by heating at 450°C for 24 hr, and the nitrogen-free extract (NFE), calculating by subtraction of protein + lipids + ash.

Experimental design

The work consisted of two consecutive studies. The first was on the dynamics of the appearance of melatonin in the plasma, and the second on the effect of the indole on food intake and the selection of different macronutrients.

Dynamics of the appearance of melatonin in the plasma

To determine the kinetics of the appearance of melatonin in the plasma, 42 individually housed sea bass of mean weight 173 ± 47 g (mean $\pm$ S.D.), each of which was administered melatonin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) contained inside a gelatin capsule were used. The single dose used was 2.5 mg/kg body weight (BW). Blood was then collected at different times (0, 20, 45, 90, 180, and 360 min) for the assay of melatonin ($n = 6$) by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique (IBL, Hamburg, Germany).

Dose-response curves of plasma melatonin

To determine the dose-response curves of plasma melatonin after the administration of increasing doses of the indole, 12 sea bass of mean weight 192 ± 43 g (mean $\pm$ S.D.) to which we administered one of three doses of melatonin (0.1, 0.5, or 2.5 mg/kg BW) were used. After 45 min (the time at which the maximal concentration had been observed in the previous experiment), blood was collected for melatonin assay again using the ELISA technique ($n = 6$).

Effect of melatonin on food intake and macronutrient selection

For the analysis of the effect of melatonin on macronutrient intake, 12 individually housed sea bass of 153 ± 29 g in body weight (mean $\pm$ S.D.) were used. On days 1–10, they were given an initial capsule which was a placebo containing only the excipient (powdered complete feed) and hence a melatonin dose of 0 mg/kg BW. On days 11–20, their initial capsule contained 0.1 mg/kg BW of melatonin, on days 21–30, 0.5 mg/kg BW, and on days 31–40, 2.5 mg/kg BW. Finally, on days 41–50, their initial capsule was again a placebo. This initial capsule was of a different color from those containing the pure macronutrients. Forty-five minutes after the ingestion of this initial capsule (placebo or melatonin), each fish was provided with macronutrient-containing capsules. These were equal in number for each macronutrient, and the quantity provided was always greater than the fish could ingest. After 30 min (from 14:00 to 14:30 hr), the remaining capsules were removed and counted to determine the real intake of each

Melatonin modifies fish macronutrient selection

macronutrient. The different capsules were placed in a single floating feeder. The color coding for the macronutrient content of the capsules was maintained unchanged throughout the experiment for each individual, but was different between individuals. With this design, any effect of position or color of the capsule on the selection of macronutrient was avoided.

Data analysis

Food intake is expressed as g/100 g BW/day. The gross energy intake was calculated using the following energy coefficients: 23.6 kJ/g for protein, 38.9 kJ/g for fat, and 16.7 kJ/g for carbohydrate [30]. The results were presented as the mean with the corresponding standard error, and were analyzed using analysis of variance (ANOVA), and the Tukey test ($P < 0.05$) for the comparison of paired means.

Results

The oral administration of 2.5 mg/kg BW of melatonin gave rise to a 26-fold increase in the plasma level of the hormone relative to the physiological level for that time of day (18 pg/mL). The value was 2.4 times greater than the nocturnal peak levels, and the maximum was reached in the period between 45 and 90 min following ingestion (464 and 419 pg/mL, respectively) (Fig. 1), although at 20 min the levels were already similar to nocturnal values.

Giving increasing doses of melatonin in gelatin capsules produced a dose-dependent increase in the plasma melatonin concentration. This increase was statistically significant (Fig. 2) for each of the three doses tested. The plasma levels reached were similar to the nocturnal values for the 0.1 mg/kg BW dose, and double the nocturnal values for the 0.5 and 2.5 mg/kg BW doses.

The energy composition of the diet selected during the first placebo phase was 39% as proteins, 39% as fats, and 22% as carbohydrates.

The oral melatonin doses of 0.1, 0.5, and 2.5 mg/kg BW had a dose-dependent inhibitory effect on total food intake

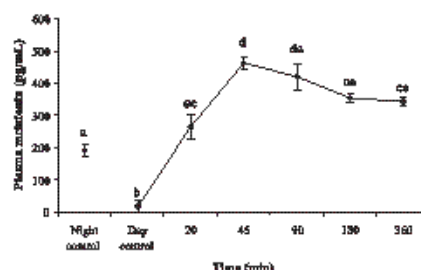


Fig. 1. Time of the appearance of melatonin in plasma after the oral administration of a dose of 2.5 mg melatonin/kg BW. Results are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. ($n = 6$). The different super script letters represent statistically significant differences, $P < 0.05$ (ANOVA).

Rubio et al.

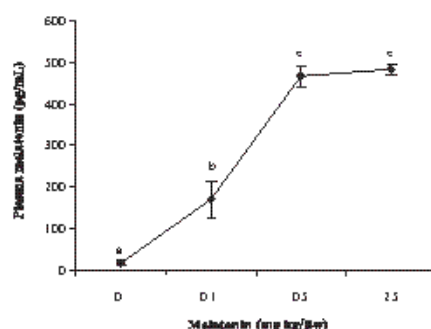


Fig. 2. Dose response curve after the oral administration of three doses of melatonin (0, 0.1, 0.5 and 2.5 mg/kg BW). Plasma melatonin levels were determined 45 min after melatonin intake. Results are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. ($n = 6$). The different super script letters represent statistically significant differences, $P < 0.05$ (ANOVA).

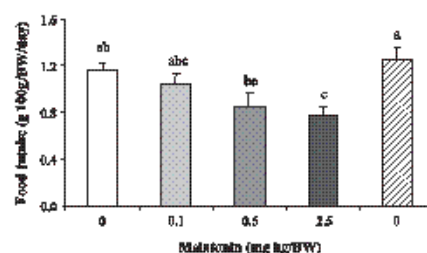


Fig. 3. Effect of the oral administration of increasing doses of melatonin (0, 0.1, 0.5 and 2.5 mg/kg BW) on food intake. Each melatonin dose was administered during 10 consecutive days, at the end of the experiment a new dose of 0 mg/kg BW was used during 10 days as control. Results are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. ($n = 12$ fish per dose). The different superscripts represent statistically significant differences, $P < 0.05$ (ANOVA).

of 9, 26, and 34%, respectively (Fig. 3) with respect to the baseline of the first placebo phase. Melatonin administration also modified the pattern of macronutrient selection. It mainly affected the amount of carbohydrates ingested, with significant reductions of 17, 33, and 42% with respect to the quantity ingested during the first placebo phase (Fig. 4A). The decreases in the intake of proteins (by 8, 24, and 33%) and of fats (by 3, 22, and 24%) were not statistically significant. However, with respect to the percentage composition of the macronutrients in the selected diet (Fig. 4B), while there were no significant differences in protein or carbohydrate content for any of the melatonin doses, the proportion of fats increased significantly at the 2.5 mg/kg BW dose.

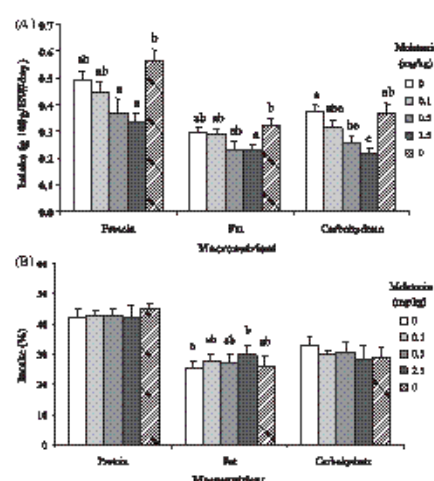


Fig. 4. Relationship between the melatonin dose and the selection of macronutrients, expressed as (A) total intake and (B) macro nutrient percentage. The appecifications were the same than in Fig. 3. Results are expressed as the mean $\pm$ S.E.M. ($n = 12$ fish per dose). The different superscripts represent statistically significant differences, $P < 0.05$ (ANOVA).

Discussion

The melatonin produced by the GIT may be released in to the peripheral circulation in mammals [16, 22]. The present results on the plasma levels of melatonin following its oral administration in the middle of the light period confirm this possibility in fish. The levels were significantly greater even than nocturnal levels at 45 min after the indole's oral administration, resulting in a pharmacological increase of melatonin plasma levels that remained high for at least 6 hr. While the plasma melatonin response was dependent on the orally administered dose, there were no statistically significant differences between the two highest doses. This may indicate a possible saturation of the transport mechanisms of the hormone in the GIT. There is support for this possibility in the findings that plasma melatonin levels are lower than GIT levels in cows, pigs [31], rats [32], reptiles, amphibians, and fish [17].

The reduction of food intake produced by the administration of melatonin has been described previously in fish [25] that received an intraperitoneal injection of melatonin on a single day. The amount of food intake by fish is highly variable from one day to the next [29, 33–35], and is also reduced by stress [36]. This could therefore lead to errors in interpreting the foregoing results. The present work has shown the viability to administer encapsulated melatonin over 10-day periods for each dose, which we believe minimizes the effects of both stress and normal day-to-day variability.

Melatonin modifies fish macronutrient selection

The use of pure macronutrients with the same chemosensory properties at the oropharyngeal level would seem to be a good model for the study of the regulation of macronutrient intake in fish. The sea bass learns, through post-ingestion processes and/or post-absorption mechanisms, to associate the color of the capsule with the macronutrient that it contains [29]. In energy terms, the composition of the diet selected during the first placebo phase was 39% protein, 39% fat, 22% carbohydrate, representing approximately a proportion of 1.8 protein:1.8 fat:1 carbohydrate. This differs significantly from the proportion 1.6 protein:2.5 fat:1 carbohydrate that would have occurred, according to the energy conversion coefficients [30], if the ingestion of each type of capsule had been random.

The mechanism by which melatonin reduces food intake is unknown. A speculative suggestion is the possibility of a sedative effect of melatonin [25, 37]. In the present case, however, although there was a slight reduction in locomotor behavior of the fish (direct observation), this did not appear until several hours after the administration of melatonin, approximately 5–6 hr after concluding feeding, and just before the onset of the dark phase. Pinillos et al. [25] observed no sedative effect of intraperitoneally administered melatonin in goldfish. Also, the sea bass is a fish which presents a dual feeding behavior in the laboratory, being capable of either diurnal or nocturnal feeding habits [2], and in the latter case the increased endogenous melatonin levels at night do not seem to inhibit either food intake or locomotor activity. One can therefore reject the possibility of a sedative effect being responsible for the decrease in food intake.

The GIT shows rhythmic changes in melatonin levels. This leads one to think that the cycle of food availability may be a mechanism of circadian synchronization [19]. The upper segment of the GIT would secrete melatonin in response to food intake, and this melatonin could then act as an appetite-regulating signal [20]. Subsequently, the melatonin would pass to the lower segments of the GIT, where it would act via receptors [38] to synchronize the processes of feeding and digestion [18, 31].

Melatonin is formed from its precursor, serotonin, which is involved in the cerebral control of feeding behavior, acting in most cases as an anorectic in both mammals and fish [39, 40]. One might speculate that melatonin could stimulate or potentiate the satiating action of its precursor at the level of the brain and/or the GIT, as both indoleamines have a hypophagic effect in fish and in rats [25, 40–42], although other workers have found that their effect is orectic in mice [43] or that they have no influence on food intake [25, 40, 41]. These opposing findings could be related to the doses used, the administration route, or the feeding habits, nocturnal or diurnal, of the species involved. It has been proposed that there is a feedback loop between melatonin and serotonin that regulates appetite and digestion via endocrine and paracrine processes in both the brain and the GIT, with a parallelism in the action of the two molecules [43]. The mechanism by which they act, however, is still unclear. This all indicates that, as was stated previously [43], a study of the relationship between melatonin and serotonin could well

be essential to understanding the mechanisms by which melatonin acts in the GIT.

In the present experiments on the sea bass, while melatonin had a hypophagic effect on total food intake, the effect on the three macronutrients used was not uniform. It reduced carbohydrate intake and apparently protein intake, although the differences were not statistically significant in this latter case, while it had no effect on the quantity of fat ingested, which produced a significant increase in the percentage of fat selection after the administration of the highest melatonin dose. To the best of our knowledge, this selective effect of melatonin on macronutrient intake had not been investigated, however, further studies are needed for go deeply into the role of melatonin on this selection.

In summary, melatonin supplied orally affects both food intake and macronutrient selection. The present results are the first evidence for the existence of neurohumoral mediators that affect macronutrient selection by fish, although the mechanisms involved have yet to be clarified.

Acknowledgments

This research was supported by grants from the 'Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT)' project AGL2001-0598 to J.A. Madrid, EU (Concerted Action Q5CA-2001-989) to F.J. Sánchez-Vázquez, and by the 'Consejería de Trabajo y Política Social, Fondo Social Europeo' and 'Fundación Séneca' (Integral Operative Program for CARM 2000–2006 of FSE) to V.C. Rubio. The authors wish to thank M. Carmen Marín Jiménez and other staff of CULMAREX S.A. for supplying the sea bass and for their kind support and assistance during the experiment.

References

1. KARA MH, DOREAU F. Régime alimentaire du loup *Oreochromis labrax* (poisson maraîch) du golfe d'Amara, Algérie. Ann l'Océanogr Paris 1996; 72:185–198.
2. SÁNCHEZ VÁZQUEZ FJ, AZZAVO M, MARTÍNEZ FJ et al. Annual rhythms of demand feeding activity in sea bass: evidence of a seasonal phase inversion of the diel feeding pattern. Chronobiol Int 1998; 15:607–622.
3. ZOURI R, TABORSKY M. Fish foraging periodically correlates with daily changes of diet quality. Mar Biol 1991; 108:193–196.
4. SÁNCHEZ VÁZQUEZ FJ, YAMAMOTO T, AKIYAMA T et al. Selection of macronutrients by goldfish operating self feeders. Physiol Behav 1998; 65:211–218.
5. FALCÓN J, THIEBAULT C, BROY Y et al. Regulation of the rhythmic melatonin secretion by fish pineal photoreceptor cells. In: Rhythms in Fishes. AL MA ed., Plenum Press, New York, 1992; pp. 167–198.
6. IZOO M, KIZUKA H, SUZUKI T et al. Melatonin signal transduction in the goldfish, *Carassius auratus*. Neurosci Biobehav Rev 1994; 18:563–569.
7. ZACHMANN O, ALI MA, FALCÓN J. Melatonin and its effects in fishes: an overview. In: Rhythms in Fishes. AL MA ed., Plenum Press, New York, 1992; pp. 149–163.
8. SÁNCHEZ VÁZQUEZ FJ, IZOO M, MADRIO JA et al. Daily cycles in plasma and ocular melatonin in demand fed sea bass, *Oreochromis labrax* L. J Comp Physiol 1991; 167B: 409–415.

Rubio et al.

9. Inao M, Aida K. Effects of season, temperature and photoperiod on plasma melatonin rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*. *J Pineal Res* 1995; 18:62-68.
10. García Allureur R, Madrid JA, Sánchez Vázquez FJ. Melatonin rhythms in European sea bass plasma and eye: influence of seasonal photoperiod and water temperature. *J Pineal Res* 2001; 31:68-75.
11. Mikkelsen LGE, Andersson RGG. A melatonin binding site modulates the $\alpha 2$ adrenoceptor. *Life Sci* 1996; 58:525-533.
12. Kulczykowska E. A review of the multifunctional hormone melatonin and a new hypothesis involving osmoregulation. *Rev Fish Biol Fisher* 2002; 11:321-330.
13. Yu HS, Reiter RJ, eds. Melatonin. Biosynthesis, Physiological Effects and Clinical Application. CRC Press, Boca Raton, 1993.
14. Reiter RJ, Oh H S, Furumori O. Melatonin. Its intracellular and genomic actions. *Trends Endocrinol Metab* 1996; 7:22-27.
15. Reiter RJ, Tan D, Osuna C et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci* 2000; 7:444-458.
16. Hatcher G. Melatonin synthesis in the gastrointestinal tract and the impact of nutritional factors on circulating melatonin. In: The Aging Clock. The Pineal Gland and Other Pacemakers in the Progression of Aging and Carcinogenesis. Pienagali W, Regelson W, Falris N eds., The New York Academy of Sciences, New York, 1994; pp. 146-158.
17. Buschik GA, Pang SF. Melatonin levels in the gastrointestinal tissues of fish, amphibians and a reptile. *Gen Comp Endocrin* 1991; 106:415-419.
18. Maren MT, Azarkoz F, Malacalada J R. Melatonin in the gastrointestinal tract. *Therapie* 1998; 53:453-458.
19. Yan'Hor TJ, Gwinner E. Influence of pinealectomy and pineal stalk deflection on circadian gastrointestinal tract melatonin rhythms in zebra finches (*Tamias pygmaus garrula*). *J Biol Rhythm* 1999; 14:185-189.
20. Buschik GA, Pang SF, Hacker RR et al. Melatonin concentrations in serum and tissues of gnotic gastrointestinal tract and their relationship to the intake and passage of food. *J Pineal Res* 1996; 21:251-256.
21. Poirier PT, Buschik GA. Melatonin reduces the severity of dextran induced colitis in mice. *J Pineal Res* 1995; 19:31-39.
22. Buschik GA, Ayres HL, Friedman RM et al. Relationship between melatonin levels in plasma and gastrointestinal tissues and the incidence and severity of gastric ulcers in pigs. *J Pineal Res* 1998; 24:62-66.
23. Buschik GA. The effect of serotonergic, N-acetylsalicylic acid and melatonin on spontaneous contractions of isolated rat intestines. *J Pineal Res* 1986; 3:41-54.
24. Bakness TJ, Wade GN. Body weight, food intake and energy regulation in exercising and melatonin treated Siberian hamsters. *Physiol Behav* 1985; 35:805-808.
25. Phillips ML, de Pedro N, Alonso Gómez AL et al. Food intake inhibition by melatonin in goldfish (*Carassius auratus*). *Physiol Behav* 2001; 72:629-634.
26. Sánchez Vázquez FJ, Yamamoto T, Akiyama T et al. Macronutrient self selection through demand feeders in rainbow trout. *Physiol Behav* 1999; 66:45-51.
27. Akanda A, Sánchez Vázquez FJ, Zamora S et al. Self design of diets by means of self feeders: validation of procedures. *J Physiol Biochem* 2000; 56:155-166.
28. Yamamoto T, Shima T, Furukawa H et al. Effect of water temperature and short term fasting on macronutrient self selection by common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 2003; 220:655-666.
29. Rubio VC, Sánchez Vázquez FJ, Madrid JA. Macro nutrient selection through ingestive signals in sea bass fed on gelatine capsules. *Physiol Behav* 2003; 78:195-203.
30. Muelius I, Josling M. The effects of feeding regime on gravimetric body composition and patterns of energy deposition in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *J Fish Biol* 1989; 35:1-11.
31. Buschik GA, Hacker RR, Brown GM et al. Melatonin concentrations in the luminal fluid, mucosa, and musculature of the bovine and porcine gastrointestinal tract. *J Pineal Res* 1999; 26:56-63.
32. Buschik GA, Brown GM. Pinealectomy reduces melatonin levels in the serum but not in the gastrointestinal tract of rats. *Biol Signal* 1997; 6:40-44.
33. Juell JE, Furukawa DM, Buckwalter A. Demand feeding in salmon farming by hydroacoustic food detection. *Aquacult Eng* 1993; 12:155-167.
34. Páspalo M, Boujard T. A comparative study of automatic feeding and self feeding in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets of different energy levels. *Aquaculture* 1996; 145:245-257.
35. Azzaroli M, Madrid JA, Zamora S et al. 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* 1998; 163:285-296.
36. Boujard T, Ducy X, Gervier D et al. Description of a modular, low cost, water meter for the study of feeding behavior and food preferences in fish. *Physiol Behav* 1992; 52:1101-1106.
37. Zhdanova IV, Wang SY, Leclair OU et al. Melatonin promotes sleep (kinesis) in zebrafish. *Brain Res* 2001; 903:263-268.
38. Buschik GA, Niles LP, Pang SF et al. Diurnal variation and binding characteristics of melatonin in the mouse brain and gastrointestinal tissues. *Comp Biochem Physiol* 1993; 104C:221-224.
39. Leinowicz SF, Alexander JT. Hypothalamic serotonergic control of eating behavior, meal size, and body weight. *Biol Psychiatry* 1998; 44:851-864.
40. de Pedro N, Phillips ML, Valenciano AI et al. Inhibitory effect of serotonergic feeding behavior in goldfish: involvement of CRF. *Peptides* 1998; 19:505-511.
41. Smith BK, York DA, Bray GA. Activation of hypothalamic serotonergic receptors reduced intake of dietary fat and protein but not carbohydrate. *Am J Physiol* 1999; 277:R202-R211.
42. Ishibashi T, Hahn DW, Skirnasara L et al. Effect of pinealectomy and melatonin on feed consumption and thyroid hormone secretion rate. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966; 122:644-647.
43. Buschik GA, Pang SF. The role of serotonergic and melatonin in gastrointestinal physiology: ontogeny, regulation and food intake, and mutual serotonergic melatonin feedback. *J Pineal Res* 1994; 16:91-99.

5.7. La administración oral de melatonina reduce la ingesta de alimento y modifica la selección de macronutrientes en la lubina (*Dicentrarchus labrax*, L.)

Journal of Pineal Research, 2004.

Justificación

En peces salvajes se han observado cambios estacionales y circadianos en la selección de alimento y el comportamiento alimentario. El ciclo luz/oscuridad es el principal mediador de la producción de melatonina (MEL) de origen pineal en peces, siendo el tracto digestivo la principal fuente extrapineal de esta hormona, lo que sugiere que la MEL podría estar implicada en los procesos de alimentación y/o digestión. Los peces son capaces de regular su ingesta energética a partir de fuentes separadas de macronutrientes, pero los mecanismos de este proceso selectivo permanecen sin dilucidar. En el presente trabajo, se exploró el efecto de la administración oral de MEL a lubinas sobre sus concentraciones plasmáticas y la selección de macronutrientes encapsulados.

Material y métodos

Los peces utilizados fueron 66 lubinas, alojadas individualmente en tanques de 75 l, provistos de un circuito cerrado de agua salada artificial. La temperatura, fotoperiodo y salinidad se mantuvieron constantes. Se les administraron dosis de MEL de 0,1, 0,5 y 2,5 mg kg⁻¹ del peso corporal en el interior de cápsulas de gelatina, determinándose la cinética de aparición de la MEL en plasma, las concentraciones plasmáticas inducidas por las diferentes dosis de MEL a los 45 min de su ingestión y su efecto en la ingesta total de alimento y en el patrón de selección de macronutrientes.

Resultados y discusión

La MEL ingerida fue absorbida y transportada al plasma, produciendo un incremento dosis-dependiente de la MEL plasmática, que 45 minutos después de su administración alcanzó una concentración 26 veces superior al control con la dosis más elevada de la indolamina. La MEL produjo una inhibición dosis-dependiente de la ingesta total de alimento del 9, 26 y 34% respectivamente, modificando así mismo el patrón de selección de macronutrientes. La ingesta de carbohidratos fue significativamente reducida en una forma dosis-dependiente (17, 33 y 42%, respectivamente), aunque las reducciones observadas en la ingesta de grasa y proteína no fueron significativas. Por el contrario, el porcentaje de grasa de la dieta seleccionada aumentó significativamente para la dosis más elevada, pero

no se observaron cambios en los porcentajes de selección de proteína o carbohidratos para ninguna de las dosis.

Conclusión

La administración oral de MEL afecta tanto la cantidad de alimento consumido como el patrón de macronutrientes seleccionados, lo que constituye la primera evidencia de la existencia de mediadores neurohumorales que afectan a la selección de macronutrientes en peces.

Differential effect of oral administration of cortisol on food intake in rainbow trout

Cortisol is a multifarious hormone, especially at physiologic and metabolic level. In fish it has been proposed that the fluctuation of cortisol level in the plasma is associated to photoperiod and feeding. In the present paper, we explored the effect on food intake of cortisol (50, 100, and 200 mg/kg BW), administered orally into gelatine capsules, to rainbow trout. The voluntarily ingested corticosteroid was absorbed into the fish's plasma, reaching a level that was up to 129 times greater than the controls, with the highest dose of cortisol, 450 min after its administration. No effect on total food intake was observed after the administration of 200 mg/kg BW, however a great variability was detected when fish food intake were considered individually, including among cortisol effects, stimulation, no effect, and inhibition of food intake in different individuals. In summary, cortisol supplied orally produces a differential effect on the regulation of food intake in rainbow trout, although the mechanisms involved have yet to be clarified.

Cortisol; capsules; feeding behaviour; food intake; *Oncorhynchus mykiss*; satiety.

CORTISOL is a multifarious hormone, especially at physiological and metabolic level. In fish it has been suggested that fluctuation of the plasma cortisol is associated to photoperiod and feeding (6, 15), therefore it has been observed a pronounced increase of circulating cortisol four hours before feeding in goldfish (15), at the moment of the feeding in rainbow trout (4) and several hours after the feeding in rainbow trout (6). Nevertheless, when the cortisol peak happens during the feeding period it is not possible to discriminate if the increase in the cortisol level is due to feeding or to stressor effect of the competition by the food (5).

In the studies using exogenous administration of cortisol it is necessary to establish a clear differentiation between the acute effects (short term) and the long term treatments with cortisol, since during the acute treatments fish react clearly to the induced fluctuations of the plasma cortisol, increasing its concentration quickly, within a time interval from minutes to one hour and descending gradually until reaching the basal concentration (13). On the contrary, during a long term treatment the fish physiology seem to be adapted to the chronic elevation of cortisol, with responses considered within the range of normality (7, 13).

In relation to the effects of cortisol on feeding it has been described that the acute elevation of plasma

cortisol increases food intake (12) whereas chronic elevation of plasma cortisol significantly reduces food intake in rainbow trout, although this effect can be an indirect consequence of the elevation in the rate of aggression and mortality (10). Also, it has been observed that the chronic administration of low doses of cortisol (50 g of cortisol/g of food) increases food intake in goldfish, whereas with high doses (500 g/g) changes in the amount food intake were not observed (3). In addition, the injection i.p. of cortisol does not produce an acute effect in the food intake in goldfish (8). The studies on the possible effect of cortisol in the food intake in fish are few and, once again, the variability of results difficult clarifies the role of cortisol in the regulation of food intake.

In fish cortisol exerts its action in the intermediary metabolism (13), mobilizing the energy reserves and producing an increase of the gluconeogenesis (7). In general cortisol increases the hepatic gluconeogenesis, elevating the plasma glucose level, besides to increase the concentration of hepatic glycogen. In the muscle it stimulates the proteolysis and, therefore, the plasma concentration of amino acids. In the adipocytes and red muscle cortisol stimulates the lipolysis, increasing glycerol and the free fatty acids concentrations (reviewed in 13).

In addition to the modifications induced by cortisol in the intermediate metabolism, which in turn affects food intake, part of the effect of cortisol on food intake can be mediated through some neuropeptides such as neuropeptide Y (NPY) and corticotrophin releasing factor (CRF). The chronic administration of cortisol increases the gene expression of the NPY and diminishes the one of the CRF in the brain of goldfish (3).

The aim of the present study was to evaluate the effect of acute cortisol administration, administered orally inside gelatine capsules, on the plasma cortisol concentration and the regulation of food intake.

METHODS

Animals. The study was carried out in the Chronobiology Laboratory of the Unité Mixte INRA-IFREMER (St Pée sur Nivelle, France). This was sound proofed and isolated from the outside. The rainbow trout were kept individually in 100 l tanks equipped with a closed circuit. The tanks were isolated in chambers with controlled environmental parameters. The ambient temperature was regulated to keep the water temperature constant at $15.6 \pm 0.4^\circ\text{C}$.

Several weeks were allowed for acclimation of the fish to the laboratory conditions. During this period they were fed *ad libitum* once a day on complete diet contained inside gelatine capsules.

Experimental diets. The encapsulated feed was prepared by filling 0.2 ml n° 4 gelatine capsules (Rag Farm, S.A., Barcelona, Spain) with powdered complete diet, using a semi automatic encapsulator (Tecnifarma, Miranda de Ebro, Spain). The macronutrient sources used were vitamin free casein and gelatine (5:1) as protein; cod liver oil and soya oil (3:1) as fats, and dextrin as carbohydrate. Capsules contained a vitamin and mineral complex supplement.

Experimental design. The work consisted of two consecutive studies. The first deals on the dynamics of the appearance of cortisol in the plasma, and the second on the effect of the cortisol on food intake.

Dynamics of the appearance of cortisol in the plasma. To determine the kinetics of the appearance of cortisol in the plasma, 72 individually housed rainbow trout of mean weight 51 ± 8 g (mean $\pm$ SD), each of which was administered cortisol (SIGMA ALDRICH, Steinheim, Germany) contained inside a gelatine capsule were used. The single dose used was 200 mg/kg BW. Blood was then collected at different times (0, 90, 180, 270, 360, 450, 540, 630, 720 and 900 min) for the assay of cortisol (n=6) by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) technique (BL, Hamburg, Germany). Three controls were collected at 0, 360 and 720 min for the assay of cortisol in basal situation.

Dose response curves of plasma cortisol. To determine the dose response curves of plasma cortisol after the administration of increasing doses, 28 rainbow trout of mean weight 56 ± 12 g (mean $\pm$ SD) to which we administered one of three doses of cortisol (50, 100, or 200 mg/kg BW) were used. After 450 min blood was collected for cortisol assay again using the ELISA technique (n=7).

Effect of cortisol on food intake. For the analysis of the effect of cortisol on food intake, 12 individually housed rainbow trout of 359 ± 44 g in body weight (mean $\pm$ SD) were used. All fish were given an initial capsule (placebo) containing only the excipient (powdered complete feed) and hence a cortisol dose of 0 mg/kg BW for 6 days (control phase). Then four fish were given an initial capsule, which was again a placebo, and eight fish received an initial capsule contained 200 mg/kg BW of cortisol during 6 days remaining three days fasting between experimental days (experimental phase), lasting a total of 24 days. The initial capsule was of a different color from those containing the diet. Half and seven hours after the ingestion of this initial capsule (placebo or cortisol), each fish was provided with feed containing capsules. After 30 min (from 16:00 to 16:30 h), the remaining capsules were removed and counted to determine the real intake.

Data analysis. Food intake is expressed as g/100g BW per day. In figure 3, data are expressed as proportion = food intake in experimental phase/food intake in control phase. The results were presented as the mean with the corresponding standard error, and were analysed using analysis of variance (ANOVA), and the Tukey test ($p < 0.05$) for the comparison of paired means.

RESULTS

The oral administration of 200 mg/kg BW of cortisol induced a 129-fold increase in the plasma level of the hormone relative to the physiological level for that time of day (8 ng/ml) (Figure 1). The maximum cortisol value was reached in the period between 450 and 630 min following ingestion (2.088 and 2.752 ng/ml, respectively) (Figure 2), beginning to decrease after 540 min.

Oral administration of increasing doses of cortisol in gelatine capsules produced a dose-dependent increase in the plasma cortisol concentration. This effect was statistically significant (Figure 1) for each of the three doses tested.

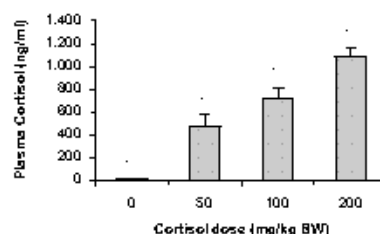
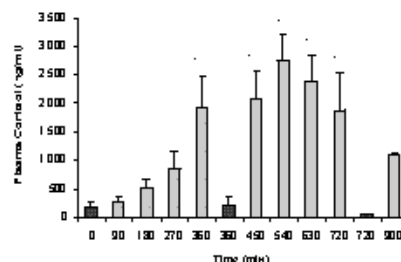


Figure 1. Dose response curve after the oral administration of three doses of cortisol (50, 100 and 200 mg/kg BW) into gelatine capsules. Plasma cortisol levels were determined 450 min after cortisol intake. Results are expressed as the mean $\pm$ SD (n=6). The different superscripts represent statistically significant differences, $P < 0.05$ (ANOVA).

Total food intake was not modified after the oral cortisol dose of 200 mg/kg BW, obtaining a similar food intake level in cortisol and placebo animals. When individual fish results were analyzed, a differential effect of the cortisol was observed (Figure 3). Food intake was calculated as the intake in the experimental phase respect to the intake in the control phase, showing that the four fish feeding the placebo capsule have a similar proportion of food intake whereas fish treated with cortisol exhibited a great variability in this parameter, with values that fluctuate



between an increase of 2.2-fold to reductions of 0.4-fold respect to the previous intake.

Figure 2. Time of the appearance of cortisol in plasma after the oral administration of a dose of 200 mg cortisol per kg BW. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM ($n=6$). Black bars represent baseline values at the times indicated in the figure. The different superscripts represent statistically significant differences. $P<0.05$ (ANOVA).

DISCUSSION

Previously it has been reported elevation and maintenance of plasma cortisol levels above basal concentrations in response to chronic stress, nevertheless the amplitude and magnitude differ with the specie (for a review ref. 2). In the present study oral administration of cortisol induces a dose-related significant increase of plasma cortisol level that remains significantly elevated between 6 and 12 h after cortisol administration. This plasma cortisol increase was unable to produce a significant consistent effect on total food intake when results were considered as the mean of the intake for the 8 treated fish. However, when the results were analysed individually, different responses were observed. Thus, whereas some fish increase their food intake even more than double, others reduce their intake to less than the half, resulting in an absence of effect of the cortisol when all fish were considered together. These results agree with the wide variability in the effects of cortisol on food intake previously described in other studies making it very difficult to assign a clear role to cortisol on food intake regulation (3, 8, 10, 12).

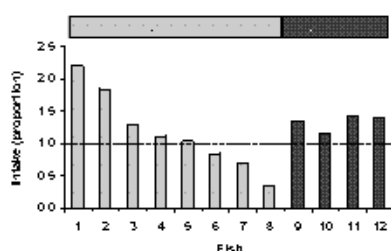


Figure 3. Effect of 200 mg/kg B.W. of cortisol on individual food intake. The food intake of each fish during cortisol (grey bars) or placebo (black bars) treatment was compared with its previous control phase. Values are expressed as the percentage of food intake in experimental phase respect to control phase for each fish. The dotted line represents the baseline level.

A possible explanation about the role of cortisol on the regulation of food intake is that their effects depend on the previous physiological status of fish. The control of cortisol secretion by the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis in fish is a very complex process, where several factors have been described, factors as adrenocorticotropin hormone,

melanocyte-stimulating hormone, growth hormone, pro-opiomelanocortin (reviewed by 13), NPY, CRF, dopamine (reviewed by 16) and serotonin (17). Such as factors are involved in the regulation of food intake at least in mammals and several of them also in fish (reviewed in 11). An imbalance produced by cortisol administration could act at different levels in the cascade of events and produce variable effects depending of the previous endocrine and metabolic state. In addition, this variability of effects can be alternatively explained taking into account the differences in the individual stress levels among experimental fish, since as it has been found, the plasma cortisol response produced by an additional acute stress in chronically stressed fish was inferior respect to non stressed fish (1), probably by interference in the secretion control in the HPA axis (9).

In summary, in rainbow trout, cortisol supplied orally produces a non-consistent response in food intake, consequence of the great variability in their effects probably due to the influence of the previous metabolic and endocrine status of fish.

This research was supported by grants from the MCYT (project AGL2001 0698) to J.A. Madrid, EU (Concerted Action QSCA 2001 989 to F.J. Sánchez-Vázquez) and by the "Consejería de Trabajo y Política Social, Fondo Social Europeo" and "Fundación Séneca" (Integral Operative Program for CARM 2000 2006 of FSE to V.C. Rubio). The authors wish to acknowledge to the people of Nutrition Laboratory of the Unit Mixte INRA IPREMER (St. Pierre sur Nivelle) for their technical and kind support during the experiments.

REFERENCES

1. Barcellos, L.J.C., Nicolajewsky, S., de Souza, S.M.C. and Luthier, F. Plasma levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. *Aquac. Res.* 30: 437-444, 1999.
2. Barton, B.A. and Iwama, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis.* 10: 3-26, 1991.
3. Bernier, N.J., Bedard, N. and Peter, R.E. Effects of cortisol on food intake, growth, and forebrain neuropeptide Y and corticotropin releasing factor gene expression in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135: 230-240, 2004.
4. Boujard, T. and Leatherland, J.F. Circadian pattern of hepatosomatic index, liver glycogen and lipid content, plasma non esterified fatty acid, glucose, T3, T4, growth hormone and cortisol concentrations in *Oreochromis mykiss* held under different photoperiod regimes and fed using demand feeders. *Fish Physiol. Biochem.* 10: 111-122, 1992.
5. Boujard, T. and Leatherland, J.F. Demand feeding behavior and diel pattern of feeding activity in *Oreochromis mykiss* held under different photoperiod regimes. *J. Fish Biol.* 40: 535-544, 1992.
6. Boujard, T., Brett, S., Lin, L. and Leatherland, J.F. Effects of restricted access to demand feeders on diurnal pattern of liver composition, plasma metabolites and hormone levels in *Oreochromis mykiss*. *Fish Physiol. Biochem.* 11: 337-344, 1993.
7. De Boeck, G., Atrop, D. and Wood, C. Cortisol effects on aerobic and anaerobic metabolism, nitrogen excretion, and whole body composition in juvenile rainbow trout. *Physiol. Biochem. Zool.* 74: 858-868, 2001.
8. De Pedro, N., Alonso-Gómez, A.L., Cancedo, B., Valenciano, A.L., Delgado, M.J. and Alonso-Bedate, M. Effects of alpha helical CRF [9-41] on feeding in goldfish: involvement of cortisol and catecholamines. *Behav. Neurosci.* 111: 398-403, 1997.

9. Fryer, J.N. and Peter, R.E. Hypothalamic control of ACTH secretion in goldfish. III. Hypothalamic control implants studies. *Gen. Comp. Endocrinol.* 33: 215-225, 1977.
10. Gregory, T.R. and Wood, C.M. The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming performance of juvenile rainbow trout. *Physiol. Zool.* 72: 286-295, 1999.
11. Lin, X., Volkoff, H., Nannamare, Y., Bernier, N.J., Peyon, P. and Peter, R.E. Brain regulation of feeding behavior and food intake in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 126A: 415-434, 2000.
12. Lyytikäinen, T. and Ruohonen, K. The acute effect of cortisol implants on self feeding activity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac. Res.* 32: S05-S05, 2001.
13. Mømmesen, T.P., Vijayan, M.M. and Moon, T.W. Control in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.* 9: 211-268, 1999.
14. Patiño, R., Schreck, C.B., Banks, J.L. and Zaugg, W.S. Effects of density on the developmental physiology of smolting coho salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 115: 828-837, 1987.
15. Spieler, R.E. and Nozaki, T.A. Effects of photoperiod and feeding schedule on diel variations of locomotor activity, cortisol and thyroxine in goldfish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 113: 528-539, 1984.
16. Wendelaar Bonga S.E. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77: 591-625, 1997.
17. Winberg, S. and Lepage, O. Elevation of brain 5-HT activity, POMC expression, and plasma cortisol in socially subordinate rainbow trout. *Am. J. Physiol.* 274: R645-R654, 1998.

5.8. Efecto de la administración oral de cortisol en la ingesta de alimento en la trucha arco iris

Justificación

El cortisol es una hormona multifactorial, especialmente en el ámbito fisiológico y metabólico. En los peces se ha propuesto que la fluctuación de la concentración plasmática de cortisol está asociada al fotoperiodo y la alimentación. En relación con los efectos del cortisol sobre la ingesta de alimento los resultados obtenidos son escasos y, una vez más, la variabilidad de los mismos no ayuda a clarificar su papel en la regulación de la ingesta de alimento, habiéndose descrito efectos contradictorios en función de la dosis, la vía de administración o la duración del tratamiento (crónico o agudo). En el presente trabajo exploramos el efecto del cortisol, administrado en el interior de cápsulas de gelatina, sobre la regulación de la ingesta de alimento, utilizando para ello dieta completa encapsulada.

Material y métodos

Los peces utilizados fueron truchas arco iris, alojadas individualmente en tanques de 100 l, provistos de un circuito cerrado de agua dulce. La temperatura y fotoperiodo se mantuvieron constantes. Se utilizaron 72 individuos para determinar la cinética de aparición del cortisol en plasma (dosis de 200 mg/kg del peso corporal), así como las concentraciones plasmáticas inducidas por las diferentes dosis de cortisol (50, 100 y 200 mg/kg de peso corporal) a los 450 min de su ingestión. A 24 individuos se les administró una dosis de cortisol de 200 mg/kg del peso corporal en el interior de cápsulas de gelatina, determinándose su efecto en la ingesta total de alimento encapsulado.

Resultados y discusión

El cortisol ingerido voluntariamente fue absorbido, aumentando los niveles plasmáticos hasta 129 veces respecto a los controles en un tiempo comprendido entre 450 y 630 minutos después de la administración de la dosis más elevada de cortisol. Después de la administración de una dosis de 200 mg/kg BW, no se observaron efectos globales en la ingesta de alimento, sin embargo se detectó una gran variabilidad en dicha ingesta cuando los peces fueron considerados individualmente, incluyendo entre los efectos producidos por el cortisol, la estimulación, la falta de efecto y la inhibición de la ingesta de alimento en diferentes individuos.

Conclusión

El cortisol administrado oralmente produce efectos contrapuestos, a escala individual, sobre la ingesta de alimento en la trucha. El estatus fisiológico del pez puede ser el factor determinante de esta variabilidad de efectos.

Effects of salinity on food intake and macronutrient selection in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.)

V.C. RUBIO, F.J. SÁNCHEZ-VÁZQUEZ AND J.A. MADRID

This chapter has been submitted to *Physiology & Behavior*

Salinity is one of the most relevant environmental parameters in regards to fish physiology, modifying food intake and growth performance in many fish species; however, its possible effects on macronutrient selection are still unknown. The aim of this study was to determine the effects of three salinity levels (25‰, 7‰ and 0‰) on total food intake and encapsulated macronutrient selection in a euryhaline teleost, European sea bass. A total of 40 fish (5 per tank) with an average body weight of 52.4 ± 7.1 g were used. Lowering the salinity level from 25‰ to 7‰ and 0‰ reduced food intake by 27% and 42%, respectively. Regarding macronutrient selection, these salinity changes significantly decreased the percentage of CH intake by 31% and 27%, while increasing that of P by 30% and 25%, respectively. Fat selection remained unaltered, with an average value of 22% for all tested salinities. Specific growth rate (SGR), and feed conversion efficiency (FCR) were affected by the macronutrient selection pattern, which in turn was salinity dependent. These results indicate a strong influence of salinity on European sea bass food intake and macronutrient selection.

Salinity, food intake, macronutrient selection, sea bass, *Dicentrarchus labrax*

GROWTH AND FOOD INTAKE are controlled by internal factors involving the central nervous system, and the endocrine and neuroendocrine systems, and also by environmental factors such as temperature, photoperiod, salinity, oxygen level, ammonia, pH, etc. Like other environmental factors, salinity is specific to aquatic environments, which has prompted many studies on the influence of salinity on fish growth. For the most part, these studies have demonstrated that water salinity affects the growth of both marine (13, 19, 38, 57, 61) and freshwater species (3, 20, 27, 39, 54), being in fact unusual to find a species whose growth is not affected by salinity (8, 47). Salinity appears to modify a number of aspects related to growth performance including (a) standard metabolic rate (13, 55, 61); (b) total food intake (8, 12, 19, 26, 39); (c) the feed conversion efficiency (1, 3, 19, 26, 27) and (d) the balance of hormones involved in metabolism (5, 6, 17, 28, 30). Nevertheless, depending on the species, developmental state, season, and acclimation period, some discrepancies have been found as regards the effects of salinity on food intake. It is generally accepted that highest food intake occurs at intermediate salinity levels (25, 35), although

numerous exceptions can be found. Thus for example, increasing salinity increases food intake in grass carp (24), sea bass (12) and flounder (16), whereas it has very little effect, if any, on bluefish (8), spotted wolffish (14), turbot (19) or rainbow trout (40), or even diminishes food intake in other species such as common carp (60), Atlantic cod (26), gilthead seabream (11), rainbow trout (31), and black bream (35).

European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) is one of the most important reared marine species in Europe, especially in the Mediterranean area, with an estimated production of 45,000 tons (21). It is a euryhaline and eurytherm fish that can live in different osmotic media, including the sea, estuaries, coastal lagoons and rivers, which makes this species a good experimental model to study the influence of salinity on fish physiology. It appears that sea bass can endure a very wide range of salinities, being able to tolerate direct transfer from 37‰ to 3.9‰ salinity, and also levels as low as 0.5‰ if salinity is gradually reduced over 24 hours (9).

Previous studies using self-feeders have shown that some fish species like goldfish (44), rainbow trout (45), European sea bass (2), common carp (62) and sharpnose seabream (58), are able to select a balanced diet from unbalanced granulated diets with different macronutrient proportions, i.e., they can regulate their energy and macronutrient intake to put together a complete diet matching their specific nutritional habits (carnivorous or omnivorous). Recently, it has been shown that fish can also select a complete diet from pure macronutrient sources packaged into gelatine capsules (42, 43), a method that prevents the diet chemosensory properties at oropharyngeal level from interfering with macronutrient selection. However, despite the number of reports devoted to the influence of salinity on fish food intake, its possible effects on macronutrient selection have not been investigated.

The aim of this work was to study the influence of three salinity levels (25‰, 7‰ and 0‰) on European sea bass food intake regulation and encapsulated macronutrient selection.

METHODS

Animals. A total of 40 European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) with initial and final body weights of 52.4 ± 7.1 g and 78.0 ± 14.2 g (mean $\pm$ S.D.), respectively, were

distributed among eight 75 l tanks (5 fish/tank) with a flow through and water turnover of 200% per hour. Fish were kept at 23 ± 0.5 °C, under 12:12 L:D, (350 lux: total darkness, lights onset at 08:00 h). The tanks were placed in isolated chambers, and each one of them fitted with a closed water circuit that recycled artificial seawater through biological and mechanical filters. Marine water was prepared by adding synthetic sea salt (SBR4 Premium sea salt, Heinsberg, Germany) to aerated tap water until the appropriate density was obtained. Three salinity levels were used: 25, 7 and 0‰, achieved by gradually replacing filtered seawater with freshwater in order to reach the target salinity in 72h. Water salinity levels were recorded using a manual refractometer (Leica Microsystems Inc., Buffalo, USA) and adjusted on a daily basis.

Sea bass were allowed to acclimate to laboratory conditions for several weeks. During this period, fish were fed *ad libitum* once a day using a complete diet containing pure macronutrients (Protein P, Carbohydrate CH and Fat F) mixed inside gelatine capsules (Table 1).

Experimental diets. The encapsulated feed was prepared by filling gelatine capsules (nº. 4, 0.2 ml, Raig Forma, S.A., Barcelona, Spain) with powdered macronutrients using a semi automatic encapsulator (Tecniforma, Miranda de Ebro, Spain). During the experimental period, a previously described (42, 43) three choice macronutrient paradigm was used. Briefly, fish had to select from three types of capsules, each one containing a single macronutrient source (P, CH or F) supplemented with vitamin and mineral complexes, sodium alginate as binder, and cellulose as filler (Table 1). The F source used was a mixture of cod liver oil and soya oil (3:1). Protein was provided by vitamin free casein and gelatine (5:1), and CH by dextrin. The capsules analytical compositions are given in Table 1. Proximate composition was determined using the following techniques: moisture, by drying the samples at 110 °C for 24 h to constant weight; proteins, by the Kjeldahl method ($N \times 6.25$); fats, by diethyl ether extraction; ash, by heating at 450°C for 24 h; and nitrogen free extract (NFE), calculated by subtraction of protein + fats + ash from 100. The capsules supplied to a given tank were stored in a single bag for at least 10 days before being used. This prevented the fish from distinguishing the capsules content based on the chemical properties of any potential external contamination.

Table 1. Ingredients and proximate analysis calculated from the assay of the macronutrients of the four kinds of capsules, expressed as mean (n=4).

	CD	P	F	CH
<i>Ingredients of capsules' content (g/kg dry weight)</i>				
Casein	430	783		
Gelatin	90	157		
Cod liver oil	158		705	
Soya oil	52		235	
Dextrin	210			940
Vitamin Mineral mix	20	20	20	20
CaCO ₃ /CaPO ₄	40	40	40	40
<i>Proximate analysis of the capsules (% dry matter)</i>				
Dry matter	92.6	90.2	98.8	90.5
Gross protein	57.3	90.8	17.1	18.8
Ether extract	16.7	0.6	80.7	0.7
NFE	22.0	3.3	1.1	77.4

Ash	4.0	5.3	1.1	3.1
Gross energy (kJ g ⁻¹) ^a	23.7	22.2	35.6	17.6
Weight(g)	0.168	0.127	0.218	0.209

^aCalculated from the macronutrient percentage mean using the following energy coefficients: 23.6 kJ g⁻¹ for P; 38.9 kJ g⁻¹ for F; and 16.7 kJ g⁻¹ for CH (23).

Experimental design. To evaluate the influence of salinity on total food intake, fish were fed gelatine capsules filled with either a complete diet (52% P, 21% CH, 21% F) or pure macronutrients. For the effect of salinity on the macronutrient selection pattern, fish were fed color coded capsules containing P, F or CH. The same color macronutrient relationship was maintained in a given tank throughout the study, but this relationship was balanced between tanks to prevent a possible color effect. Each fish was provided an equal number of capsules of each macronutrient, the quantity offered being always greater than what the fish could eat (30-60 capsules/macronutrient). After 30 minutes (from 12:00 to 12:30 h), uneaten capsules were removed and counted to determine each macronutrient real intake. Throughout the experimental period, fish were weighed at the beginning and at the end of each experimental phase.

Data analysis. Food intake is expressed as g/100g BW per day. Results are presented as mean $\pm$ standard error values. Specific growth rate was calculated using the following formula: SGR (% body weight per day) = $100 (\ln W_f - \ln W_i) / \text{days}$, where W_f and W_i are the final and initial body weight (g), respectively. The feed conversion ratio was calculated as: FCR (%) = $100 (W_f - W_i) / R$, where R is total food intake (g).

The effects of salinity on food and macronutrient intake were analyzed using an ANOVA test. A Tukey's test was used to make pairwise comparisons between means. Correlations were analyzed using the Pearson correlation test. A probability level of $p < 0.05$ was used in order to consider the observed effects as statistically significant.

RESULTS

Sea bass was able to regulate food intake regardless of the capsules composition, since no differences were observed in total food intake when capsules were filled with either a complete diet or pure macronutrients (1.52 ± 0.10 vs. 1.54 ± 0.08 g/100g BW per day). In contrast and irrespective of the salinity level, statistically significant differences were found between the numbers of capsules of each macronutrient ingested by the animals (P: $3.54^a \pm 0.21$; CH: $2.78^b \pm 0.29$ and F: $1.79^c \pm 0.14$ capsules/100g BW per day, different superscripts indicate significantly different values, $p < 0.05$).

Total food intake significantly dropped when salinity was reduced from 25‰ ($1.52^a \pm 0.08$) to 7‰ ($1.12^b \pm 0.03$), and then again to 0‰ ($0.89^d \pm 0.06$ g/100g BW per day), although this last difference was not statistically significant.

Macronutrient intake was also affected by salinity. As shown in figure 1a, the total intake of all three macronutrients decreased along with salinity, the differences between the initial (25‰) and final (0‰) salinity levels being statistically significant for all macronutrients. However, if the results are expressed as macronutrient intake percentages, CH intake decreased and P intake increased in response to decreasing salinity (Figure 1b), whereas the percentage of F remained unaltered at an average value of 22%.

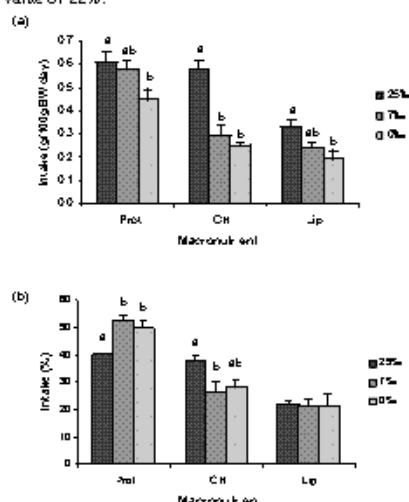


Figure 1. Effect of decreasing salinity levels on the macronutrient selection pattern expressed as: (a) macronutrient intake in g; (b) macronutrient intake percentage. Values represent the mean $\pm$ SEM of 8 fish groups. Different superscripts indicate significantly different values (ANOVA, $P < 0.05$).

Growth performance and feeding efficiency showed a tendency to decrease at 0‰ compared to 25‰ salinity (SGR was reduced by 68% and FCR by 58%), however, these effects were not statistically significant.

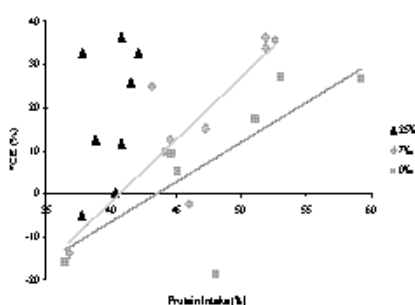


Figure 2. Relationship between protein selection and FCE at different salinity levels. Values represent the mean $\pm$ SEM of 8 fish groups. Different superscripts indicate significantly different values (ANOVA, $p < 0.05$). Regression lines are displayed for those correlations that were found to be statistically significant.

SGR and FCE depended on the macronutrient selection pattern, which was in turn modified by salinity. Figures 2 and 3 show the relationship between the different macronutrient intake percentages and FCE at all three salinity levels. A significant, positive correlation between P selection and FCE was found at 0‰ and 7‰ salinity levels (Figure 2). In contrast, a negative correlation that was also statistically significant was observed between FCE and the percentage of F selected by the animals at 0‰ and 25‰ salinity (Figure 3).

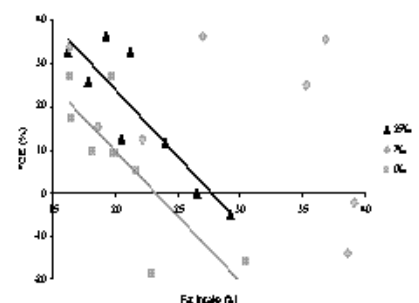


Figure 3. Relationship between fat selection and FCE at different salinities. Values represent the mean $\pm$ SEM of 8 fish groups. See Figure 2 for details.

DISCUSSION

Pure macronutrient encapsulation has proved to be a valuable tool for macronutrient selection studies. This technique allows sea bass to select a complete diet, in line with its carnivorous habits, from separate pure macronutrients sources contained inside colored gelatine capsules. One advantage of this method is that of preventing interference from the chemosensory properties inherent to granulated diets. In the present study, sea bass total daily food intake was the same regardless of the capsule content (complete diet or separate pure macronutrients); however, the numbers of capsules consumed of each macronutrient were statistically different irrespective of the salinity level, indicating that sea bass is able to develop an associative learning between the color and macronutrient content of the capsules through postingestive processes and/or postabsorptive

mechanisms. Similar results have been previously described for this specie (42,43).

Total food intake progressively decreased when salinity was lowered from 25‰ to 7‰ and then to 0‰, the drop between the first two salinity levels being statistically significant. Previous studies (12) have reported a food intake increase with salinity levels over 28‰; however, no studies have been published regarding the effects of salinity on fish fed dissociated macronutrient diets. Our results indicate that salinity has a differential effect on the macronutrient selection pattern, the percentage of P selection increasing, and that of CH decreasing, with decreasing salinity. Although the reason why salinity modifies dietary selection is not known, a number of tentative explanations can be advanced:

(a) The percentage of P would increase to compensate protein intake reduction, which is supported by some evidence indicating that, within certain limits, fish tend to maintain a stable protein intake (36, 37). CH reduction would be a passive consequence of the P increase.

(b) Since encapsulated macronutrient intake is regulated through postingestive mechanisms, an alteration of the macronutrient selection pattern could be due to changes at digestive, metabolic and/or neurohumoral levels.

To this effect, a number of studies have reported alterations of digestive enzymes in response to salinity changes (10, 22, 61), which could in turn alter the digestibility (41, 53) and, consequently, metabolic availability of specific macronutrients. Salinity also affects the transport of nutrients (34), which might selectively affect the availability of some macronutrients, and thus the fish appetite for them, although this fact has not been described.

Salinity-induced changes of key metabolic enzymes have also been reported, particularly for enzymes involved in CH metabolism (50, 51, 52, 61). In addition, the use of 2-deoxy-D-glucose and 2-mercaptoacetate in mammals has been reported to modify macronutrient selection, producing glucooprivation and lipoprivation respectively (7, 46, 49, 56).

Finally, macronutrient intake is modulated by several hormones and/or neurotransmitters acting at brain areas involved in feeding behavior regulation; consequently, modifications in any of these factors could alter the macronutrient selection pattern. In this sense, it has been described that salinity changes modify cortisol and GH levels in seawater fish, and also prolactin in freshwater fish (4, 5, 23, 33). Furthermore, it is known that these hormones are involved in the regulation of macronutrient metabolism in fish (15, 18, 48, 59).

Considered overall and in agreement with our results, neither PCE nor SGR values are significantly affected by salinity. Yet, regression analysis between

macronutrient selection and these two parameters provide some interesting results. Regardless of the salinity, PCE and SGR increase when protein selection increases and that of fat decreases. These results would appear to contradict the current tendency of increasing the lipid content of carnivorous fish diets in order to reduce the costs of using protein, presumably without any effect on feed efficiency. Yet, it must be pointed out that allowing fish to choose their diet is very different from forcing them to consume a diet with fixed proportions of previously established macronutrients.

In summary, the present study reveals the important influence of salinity on food intake and macronutrient selection in sea bass. However, given that this species can be cultivated under different salinity levels and even in fresh water, further studies are required to determine the optimal composition of the diet depending on the salinity.

This research was supported by grants from the "Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT)" project AGL2001 0698 to J.A. Madrid, EU (Contract Action QSCA 2001 989 to F.J. Sánchez-Vázquez), and by the "Consejería de Trabajo y Política Social, Fondo Social Europeo" and "Fundación Séneca" (Integral Operative Program for CARM 2000 2006 of FSE to V.C. Rubio). The authors wish to thank M. Carmen Martín Jiménez and other staff of CULMAREX, S.A. for supplying the sea bass and for their kind support and assistance during the experiment.

REFERENCES

- Alava, V.R. Effect of salinity, dietary lipid source and level on growth of milkfish (*Chanos chanos*) fry. *Aquaculture* 167: 229-236, 1998.
- Aranda, A., Sánchez-Vázquez, F.J., Zamora, S. and Madrid, J.A. Self design of diets by means of self feeders: validation of procedures. *J. Physiol. Biochem.* 56: 155-166, 2000.
- Arumachalam, S. and Reddy, S.R. Food intake, growth, food conversion, and body composition of catfish exposed to different salinities. *Aquaculture* 16: 163-171, 1979.
- Avella, M., Young, C., Prunel, P. and Schreck, C.B. Plasma prolactin and cortisol concentrations during salinity challenges of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) at smolt and post-smolt stages. *Aquaculture* 91: 359-372, 1990.
- Björnsson, B.T., Stefánsson, G.V., Berge, A.F., Hansen, T. and Stefánsson, S.O. Circulating growth hormone levels in Atlantic salmon smolts following seawater transfer: effects of photoperiod regime, salinity, duration of exposure and season. *Aquaculture* 168: 121-137, 1998.
- Boul, G. and Payan, P. How should salinity influence fish growth? *Comp. Biochem. Physiol. C* 130: 411-423, 2001.
- Boutillier, S., Lutz, T.A., Volkert, M. and Scharrer, E. 2-Mercaptoacetate, an inhibitor of fatty acid oxidation, decreases the membrane potential in rat liver in vivo. *Am. J. Physiol.* 277: R301-R305, 1999.
- Buckel, J.A., Steinberg, N.D. and Conover, D.O. Effects of temperature, salinity, and fish size on growth and consumption of juvenile bluefish. *J. Fish Biol.* 47: 696-706, 1995.
- Chervinsky, J. Sea bass, *Dicentrarchus labrax* Linnaeus (Pisces: Sciaenidae) a "police fish" in fresh water ponds and its adaptability to various saline conditions. *Bodensee* 26: 110-113, 1974.
- Colin, D.A., Nannette, G., Leray, C. and Nannette, L. Na transport and enzyme activities in the intestine of the freshwater and seawater adapted trout (*Salmo gairdneri* R.). *Comp. Biochem. Physiol.* 81A: 695-698, 1985.
- Condes, A.J., Parga, A.R. and Palis, G. Study on the effects of salinity on the fry of the euryhaline species gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., 1758). *J. Aquac. Trop.* 12: 297-303, 1997.

12. Dendrinis, P. and Thorpe, J.P. Effects of reduced salinity on growth and body composition in the European bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Aquaculture* 49: 333-358, 1985.
13. Dutil, J.D., Lambert, Y. and Boucher, E. Does higher growth rate in Atlantic cod (*Gadus morhua*) at low salinity result from lower standard metabolic rate or increased protein digestibility? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54: 99-103, 1997.
14. Foss, A., Evensen, T.H., Imsland, A.K. and Øiestad, Y. Effects of reduced salinities on growth, food conversion efficiency and osmoregulatory status in the spined wolfish, *J. Fish Biol.* 59: 416-426, 2001.
15. Goodman, H.M., 1993. Growth hormone and metabolism. In: *The Endocrinology of Growth, Development, and Metabolism in Vertebrates*, edited by M.P. Schreibman, C.G. Scanes and P.K.T. Pang. San Diego: Academic Press; 1993. p. 93-115.
16. Gull, J. The growth of juvenile flounders (*Paralichthys flesus* L.) at salinities of 0, 5, 15, and 35‰. *J. Appl. Ichthyol.* 1: 17-26, 1985.
17. Handeland, S.O., Berge, Å., Björnsson, B.Th., Lie, Ø. and Stefánsson, S.O. Seawater adaptation by out of season Atlantic salmon (*Salmo salar*) L. smolts at different temperatures. *Aquaculture* 181: 377-396, 2000.
18. Hazon, N. and Balmont, R.J. Endocrinology. In: *The Physiology of Fishes*, edited by D.H. Evans Boca Raton: CRC Press; 1998. p. 441-463.
19. Imsland, A.K., Foss, A., Gunnarsson, S., Bornésson, M.H.G., Gerald, R.F., Berge, S.W., Ham, E.V., Nævdal, C. and Stefánsson, S.O. The interaction of temperature and salinity on growth and food conversion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 198: 353-367, 2001.
20. Jonassen, T.M., Pittman, K. and Imsland, A.K. Seawater acclimation of tilapia, *Oreochromis spilargenteus spilargenteus* Gunter, fry and fingerlings. *Aquaculture* Res. 28: 205-214, 1997.
21. Kaushik, S.J. European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax*. In: *Nutrient requirements and feeding of fish for aquaculture*, edited by C.D. Webster, C.D. and C.E. Lim. Oxon: Cabi Publishing; 2002. p. 28-39.
22. Kelly, S.P., Chow, J.N.K. and Woo, N.Y.S. Effects of prolactin and growth hormone on strategies of hypoosmotic adaptation in a marine teleost, *Sparus sarba*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113: 9-22, 1999.
23. Kelly, S.P. and Woo, N.Y.S. The response of sea bream following abrupt hypoosmotic exposure. *J. Fish Biol.* 55: 752-759, 1999.
24. Kikabibi, R.V. Food consumption, growth and survival of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* at four salinities. *J. Fish Biol.* 17: 613-618, 1980.
25. Kladovatos, S.D. and Canides, A.J. Growth, food conversion, maintenance and long term survival of gilt-head sea bream, *Sparus aurata* L., juveniles after abrupt transfer to low salinity. *Aquat. Res.* 27: 765-774, 1996.
26. Lambert, Y., Dutil, J.-D. and Munro, J. Effects of intermediate and low salinity conditions on growth rate and food conversion of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Can. J. Fish. Sci.* 51: 1569-1576, 1994.
27. Likangwe, J.S., Stecko, T.D., Stauffer, J.R. and Carlisle, R.F. Combined effects of water temperature and salinity on growth and feed utilization of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus). *Aquaculture* 146: 37-46, 1996.
28. Mancera, J.M. and McCormick, S.D. Evidence for growth hormone/insulin like growth factor 1 axis regulation of seawater acclimation in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 111: 103-112, 1998.
29. Mancera, J.M., Laiz Carrión, R. and Martín del Río, M.P. Osmoregulatory action of PRL, GH, and cortisol in the gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* 129: 95-100, 2002.
30. McCormick, S.D. Effects of growth hormone and insulin like growth factor 1 on salinity tolerance and gill Na⁺ K⁺ ATPase in Atlantic salmon (*Salmo salar*): interaction with cortisol. *Gen. Comp. Endocrinol.* 101: 3-11, 1996.
31. McKay, L.R. and Cjende, B. The effect of salinity on growth of rainbow trout. *Aquaculture* 49: 325-331, 1985.
32. Miglavs, I. and Jobling, M. The effects of feeding regime on proximate body composition and patterns of energy deposition in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *J. Fish Biol.* 35: 1-11, 1989.
33. Nakano, K., Tagawa, M., Takemura, A. and Hirano, T. Temporal changes in liver carbohydrate metabolism associated with seawater transfer in *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 119B: 721-728, 1998.
34. Nordrum, S., Bakke-McKellip, A.M., Krogdahl, Å. and Buddington, R.K. Effects of soybean meal and salinity on intestinal transport of nutrients in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* 125B: 317-335, 2000.
35. Partridge, G.J. and Jenkins, G.I. The effect of salinity on growth and survival of juvenile black bream (*Acanthopagrus butcheri*). *Aquaculture* 210: 219-230, 2002.
36. Peres, H. and Oliva-Telles, A. Effect of dietary lipid level on growth performance and feed utilization by European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 179: 325-334, 1999.
37. Peres, H. and Oliva-Telles, A. Influence of temperature on protein utilization in juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 170: 337-348, 1999.
38. Peterson, M.S., Conyns, B.H., Rakocinski, C.F. and Fulling, G.L. Does salinity affect somatic growth in early juvenile Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus* (L.)? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 238: 199-207, 1999.
39. Peterson-Curtis, T.L. Effects of salinity on survival, growth, metabolism, and behavior in juvenile hogchokers, *Trinectes maculatus fasciatus* (Achiidae). *Environ. Biol. Fish.* 49: 323-331, 1997.
40. Pirhonen, J., Schreck, C.B. and Reno, P.W. Can smoking be assessed by food intake in steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)? *Aquaculture* Res. 34: 1459-1463, 2003.
41. Ringø, E. Hatchery reared landlocked Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), from lake Tahran reared in fresh water and sea water II. The effect of salinity on the digestibility of protein, lipid and individual fatty acids in a capelin rose diet and commercial feed. *Aquaculture* 93: 133-142, 1991.
42. Rubio, Y.C., Sánchez-Vázquez, F.J. and Madrid, J.A. Oral administration of melatonin reduces food intake and modifies macronutrient selection in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. Pwael Res.* 2004 (in press).
43. Rubio, Y.C., Sánchez-Vázquez, F.J. and Madrid, J.A. Macronutrient selection through post-ingestive signals in sea bass fed on gelatin capsules. *Physiol. Behav.* 78: 795-803, 2003.
44. Sánchez-Vázquez, F.J., Yamamoto, T., Akiyama, T., Madrid, J.A. and Tabata, M. Selection of macronutrients by goldfish operating self feeders. *Physiol. Behav.* 65: 211-218, 1998.
45. Sánchez-Vázquez, F.J., Yamamoto, T., Akiyama, T., Madrid, J.A. and Tabata, M. Macronutrient self selection through demand feeders in rainbow trout. *Physiol. Behav.* 66: 45-51, 1999.
46. Sanders, N.M. and Ritten, S. Repeated 2-deoxy D glucose induced glucoprivation attenuates Fos expression and glucoregulatory responses during subsequent glucoprivation. *Diabetes* 49: 1865-1874, 2000.
47. Saunders, R.L. and Henderson, E.B. Influence of photoperiod on smolt development and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Fish. Res. Bd. Can.* 27: 1295-1311, 1970.
48. Sheridan, M.A. Effects of thyroxine, cortisol, growth hormone and prolactin on lipid mobilization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), during smoltification. *Gen. Comp. Endocrinol.* 64: 220-238, 1986.
49. Singer, L.R., York, D.A. and Bray, G.A. Macronutrient selection following 2-deoxy D glucose and metoprolol administration in rats. *Physiol. Behav.* 65: 115-121, 1998.
50. Soengas, J.L., Barciela, P., Fuentes, J., Otero, J., Andrés, M.D. and Aldegunde, M. Changes in muscle carbohydrate metabolism in domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after transfer to seawater. *Comp Biochem Physiol.* 1993; 104B: 173-179, 1993.
51. Soengas, J.L., Barciela, P., Fuentes, J., Otero, J., Andrés, M.D. and Aldegunde, M. The effect of seawater transfer in liver carbohydrate metabolism of domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* 105B: 337-343, 1993.
52. Soengas, J.L., Otero, J., Fuentes, J., Andrés, M.D. and Aldegunde, M. Preliminary studies on carbohydrate metabolism changes in domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) transferred to diluted seawater (12 ppt.). *Comp. Biochem. Physiol.* 98B: 53-57, 1991.
53. Storebakken, T., Shearer, K.D., Røffle, S., Lagocki, S. and McCool, J. Interactions between salinity, dietary carbohydrate source and carbohydrate concentration on the digestibility of macronutrients and energy in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 163: 347-359, 1998.
54. Surrah, A.V. and Lin, C.K. Tilapia culture in saline water: a review. *Aquaculture* 106: 201-226, 1992.
55. Swanson, C. Early development of milkfish: effects of salinity on embryonic and larval metabolism, yolk absorption and growth. *J. Fish Biol.* 48: 405-421, 1996.

54. Swithers, S.E. Development of independent ingestive responding to blockade of fatty acid oxidation in rats. *Am. J. Physiol.* 273: R1649-R1656, 1997.
55. Tandler, A., Anav, F.A. and Choshniak, I. The effect of salinity on growth rate, survival and swimbladder inflation in gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae. *Aquaculture* 135: 343-353, 1995.
56. Torrejón-Alienza, M., Chatzifotis, S. and Divanach, P. Macronutrient selection by shaw snout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Aquaculture* 232: 481-491, 2004.
57. van der Boon, J., van den Thillart, G.E.E.J.M. and Addink, A.D.F. The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 1991;100A:47-53, 1991.
58. Wang, J.Q., Lui, H., Po, H. and Fan, L. Influence of salinity on food consumption, growth and energy conversion efficiency of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *Aquaculture* 148: 115-124, 1997.
59. Woo, N.Y.S. and Kelly, S.P. Effects of salinity and nutritional status on growth and metabolism of *Sparus aurata* in a closed seawater system. *Aquaculture* 135: 229-238, 1995.
60. Yamamoto, T., Shima, T., Furuta, H. and Suzuki, N. Effect of water temperature and short term fasting on macronutrient self selection by common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 220: 655-666, 2003.

5.9 La salinidad influye en la ingesta de alimento y modifica la selección de macronutrientes en la lubina (*Dicentrarchus labrax*, L.)

Artículo enviado a *Physiology & Behavior* (mayo-2004)

Justificación

En peces la salinidad es uno de los parámetros medioambientales más importantes que afecta a la fisiología, modificando la ingesta de alimento y el crecimiento en diferentes especies de peces tanto marinos como dulceacuícolas. La lubina es un pez eurihalino, capaz de vivir en medios osmóticos diferentes como el mar, estuarios, lagos costeros y ríos, tolerando salinidades que oscilan desde 37‰ a 0‰. Los peces teleósteos son capaces de regular su ingesta energética seleccionando a partir de fuentes puras de macronutrientes, aunque el posible efecto debido a los cambios de salinidad en la selección de macronutrientes nunca ha sido estudiado. El objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de tres niveles de salinidad (25, 7 y 0‰) en la ingesta de alimento y la selección de macronutrientes puros encapsulados.

Material y métodos

Se utilizaron un total de 40 lubinas, alojadas en grupos de 5 individuos en tanques de 75 l, provistos de un circuito cerrado de agua salada artificial. La temperatura y fotoperiodo se mantuvieron constantes a lo largo de todo el periodo experimental. La salinidad se redujo gradualmente por sustitución del agua salada sintética con agua dulce hasta alcanzar la salinidad de 7‰ o 0‰ a lo largo de 72 h. A los peces se les alimentó mediante cápsulas que contenían una dieta completa (compuesta por los tres macronutrientes) o macronutrientes puros encapsulados.

Resultados y discusión

La ingesta de alimento disminuyó con la reducción de la salinidad de 25‰ a 7 y 0‰, mostrando una inhibición de la ingesta del 27 y 42% para las salinidades de 7 y 0‰, respecto a la salinidad del 25‰. La reducción de la salinidad influyó en la selección de macronutrientes, produciendo una reducción significativa de la ingesta de carbohidratos (38, 26 y 29%) y un aumento de la selección de P (40, 52 y 50%) conforme la salinidad disminuía (25, 7 y 0‰). El porcentaje de selección de grasa se mantuvo constante, con un valor del 22% para todas las salinidades probadas. La tasa de crecimiento específica, el índice de eficacia alimentaria y el índice de eficiencia proteica fueron afectados por el patrón de selección de macronutrientes, el cual a su vez fue salinidad-dependiente.

Conclusión

Estos resultados ponen de manifiesto la gran influencia que ejerce la salinidad en la ingesta de alimento y la selección de macronutrientes en una especie eurihalina, la lubina. Sin embargo, son necesarios estudios posteriores para determinar la composición óptima de una dieta en función de la salinidad, dada la posibilidad que ofrecen algunas especies para ser cultivadas a diferentes salinidades, incluso en agua dulce.

Discusión general

6. Discusión general

La mayoría de las investigaciones sobre el control de la ingesta de alimento, llevadas a cabo en animales de laboratorio y en humanos, se han centrado en el control de la energía o en la cantidad de alimento ingerido, descuidando un aspecto de la regulación de la ingesta que merece también atención, la regulación de la ingesta de macronutrientes, tema que es el objeto principal de esta Tesis Doctoral.

6.1. Aspectos metodológicos

Hasta la fecha, muy pocos han sido los estudios que han tratado de abordar este tema en peces (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1998, 1999; Aranda *et al.*, 2000, 2001; Yamamoto *et al.*, 2001, 2003; Torrejón Atienza *et al.*, 2004), utilizando para ello una metodología previamente empleada en mamíferos. Básicamente, el procedimiento ha consistido en ofrecer a los peces dos o más dietas que difieren en sus contenidos en macronutrientes y en la posterior determinación de la ingesta en peso (g), energía (kJ) o porcentaje de la energía o del peso total ingerido como P, CH o F. Así, en diferentes estudios se han utilizado tres dietas granuladas, cada una de ellas compuesta por un tipo de macronutriente (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1999; Aranda *et al.*, 2000), o tres dietas granuladas compuestas por pares de macronutrientes: P-G, P-CH y CH-F (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1998; Aranda *et al.*, 2000, 2001). La primera metodología plantea dos problemas importantes: a) la dificultad técnica de granular dietas elaboradas con macronutrientes puros, especialmente la dieta grasa, lo que obliga a la incorporación de grandes proporciones de celulosa y de aglutinantes, y b) la gran diferencia existente en las propiedades organolépticas entre las diferentes dietas. La segunda metodología empleada (dietas con pares de macronutrientes) reduce los inconvenientes anteriores pero no los evita totalmente. Con independencia de los problemas técnicos, las diferentes propiedades organolépticas inherentes a las dietas granuladas dificultan la demostración de la existencia de selección de macronutrientes, ya que los resultados de los experimentos pueden verse enmascarados por las reacciones de los animales ante las diferencias sensoriales de las dietas o a los efectos de neurotransmisores, hormonas o fármacos sobre las vías sensorimotoras que intervienen en la percepción de dichas cualidades. En consecuencia, como señalan Thibault y Booth (1999), sólo cuando se obtengan patrones constantes de selección dietaria en diferentes experimentos llevados cabo con dos o más presentaciones de un mismo macronutriente, se podrá concluir que existe un control fisiológico de la ingesta de ese macronutriente. Por tanto, parece evidente, que las diferentes propiedades organolépticas de las distintas dietas utilizadas en estudios de selección de macronutrientes, constituyen un serio inconveniente para poder abordar la regulación de la ingesta de macronutrientes, especialmente en peces, animales dotados de múltiples sistemas quimiosensoriales de gran sensibilidad (Lamb, 2001).

La capacidad que muestran algunos peces, como la trucha o la lubina, para ingerir el

alimento sin masticarlo previamente, ofrece una posibilidad para el desarrollo de metodologías basadas en la encapsulación de dietas. La inclusión de una dieta completa en el interior de cápsulas de gelatina, fue utilizada por vez primera por Ruohonen *et al.* (1997) para alimentar truchas, sin embargo, nunca hasta ahora se había propuesto la encapsulación como método para el estudio de la selección de macronutrientes en peces.

La inclusión de macronutrientes puros en cápsulas duras de gelatina permite eliminar simultáneamente los dos problemas planteados por el uso de dietas granuladas. Externamente las cápsulas presentan las mismas propiedades quimiosensoriales y de textura, con independencia del macronutriente que lleven en su interior, con lo que se evita su posible interferencia en la selección. Además, debido a su estanqueidad es posible introducir tanto sólidos como líquidos en su interior. Sin embargo, la ingesta de un determinado macronutriente únicamente puede ser selectiva si la dieta que contiene dicho macronutriente presenta alguna propiedad química o física particular que pueda ser detectada por el animal antes de proceder a su ingestión (Thibault y Booth, 1999). En el caso de las dietas encapsuladas, las dos únicas características que podrían ser utilizadas por los peces para diferenciar entre ellas son el color de las mismas y su localización en el tanque. El suministro de las cápsulas según su composición en tres contenedores emplazados en posiciones diferentes, aunque puede ayudar a que se realice un aprendizaje más rápido, no parece ser un buen procedimiento ya que la posición *per se* afecta a la selección, siendo necesaria la rotación de las posiciones ocupadas por los diferentes macronutrientes para evitar dicho efecto enmascarante. Además, una vez producida la rotación de las posiciones ocupadas por cada macronutriente, la ingesta de cada uno de ellos vuelve rápidamente a su nivel previo, lo que demuestra que la otra característica diferencial de las dietas, el color, es mucho más importante que la posición a la hora de favorecer la discriminación. Es por ello, por lo que una vez demostrada la relativa debilidad de la posición se procedió a suministrar los tres tipos de cápsulas mezcladas en el mismo contenedor flotante.

En cuanto a la importancia del color como indicador de la composición de las cápsulas, hay que señalar, en principio, que los diferentes macronutrientes no poseen colores específicos en la naturaleza (Thibault y Booth, 1999), por lo que la utilización del color como marcador externo de su contenido ha de ser necesariamente un proceso aprendido. Esta posibilidad ya fue puesta de manifiesto previamente en saltamontes por Raubenheimer y Tucker (1997), especie que aprende a asociar señales visuales con el contenido en CH o P de la dieta. Los colores utilizados en los experimentos recogidos en la presente Tesis Doctoral, rojo, naranja y amarillo no producen por sí mismos ningún tipo de preferencia en la lubina, como lo demuestra el hecho de que cuando los distintos colores se asocian a la misma dieta estándar no existe preferencia por ninguno de ellos; sin embargo, esto no es así en el caso de la trucha, especie que muestra preferencia por el color amarillo frente a los otros dos. Por tanto, para cada especie es necesario realizar un estudio previo que demuestre la existencia o no de preferencias por un color determinado a la hora de ingerir el alimento.

Desde el punto de vista metodológico, también es importante que las cápsulas se digieran y liberen su contenido en el estómago en un corto periodo de tiempo. En la lubina, especie que aprende a utilizar el color de la cápsula para discriminar su contenido, su

apertura tiene lugar en menos de 20 min tras la ingestión. Esta afirmación se deduce de la observación de que tanto la melatonina como la serotonina exógenas, tras ser ingeridas en cápsulas de gelatina, aumentan sus niveles plasmáticos a partir de 20 min. Nuevamente la trucha constituye un caso aparte, ya que la dinámica de apertura de las cápsulas es mucho más lenta, con un tiempo mínimo de apertura entre 5 y 7 h, dependiendo de que los peces estuvieran ayunados o hubieran sido alimentados 24 h antes, probablemente esta gran demora entre la ingestión de las cápsulas y su apertura justifica que no se haya podido demostrar la existencia de una verdadera selección de macronutrientes con esta técnica en la trucha.

La posibilidad de incluir en el interior de las cápsulas de gelatina diferentes contenidos que no son detectados oralmente por los peces, es una cualidad que también puede ser aprovechada para la administración oral de sustancias como hormonas, neurotransmisores o fármacos sin el estrés asociado que conllevan otras vías de administración como la intraperitoneal, intravenosa o intracerebroventricular. Este aspecto es particularmente importante cuando se trata de estudiar la regulación de la ingesta de alimento en peces, especies muy sensibles al efecto del estrés. Además, al ser una técnica nada estresante, permite la realización de experimentos de larga duración, lo que es imprescindible para el estudio de la selección de macronutrientes dada su gran variabilidad entre un día y otro. En este trabajo, las cápsulas se han utilizado para administrar sustancias como melatonina, CCK, proglumide, serotonina y cortisol. En el caso particular de melatonina y serotonina en la lubina y cortisol en la trucha se ha estudiado, además, la cinética de aparición en plasma de dichas sustancias. En la lubina, los niveles plasmáticos de ambas sustancias fueron significativamente superiores a los basales a partir de los 20 min tras la ingestión de las cápsulas, indicando que su apertura y absorción son muy rápidas. En la trucha, sin embargo, la cinética de aparición de cortisol en plasma indica que los tiempos de apertura de la cápsula eran mucho más lentos. Esta técnica de administración de sustancias se ha revelado como muy satisfactoria para su utilización en peces.

6.2. Aprendizaje asociativo entre el color y el contenido de las cápsulas

La eliminación de la posición de las cápsulas como marcador de su composición no reduce la capacidad del pez para discriminar entre las diferentes cápsulas, por tanto, dado que en nuestros experimentos todas sus características externas, salvo el color, eran idénticas, y que éste no constituye una característica diferencial de los macronutrientes en la naturaleza, las lubinas han debido desarrollar un aprendizaje asociativo del tipo condicionamiento clásico (Pauloniano), para poder seleccionar entre los diferentes macronutrientes. Para que tenga lugar este condicionamiento ha debido actuar el tipo de macronutriente como estímulo incondicionado y el color como estímulo condicionado. En nuestras condiciones experimentales este aprendizaje se desarrolla en un tiempo máximo de dos semanas, que es el necesario para alcanzar un nivel estable de ingesta de macronutrientes.

Debido a la elevada sensibilidad química que caracteriza a los peces, cabía la posibilidad de que la discriminación entre cápsulas no fuese producto de su diferente color sino

debido a pequeñas contaminaciones externas a partir de su contenido interno. De haber sido ésta la característica utilizada por los peces y no el color, el cambio de la asociación color-macronutriente debería haber sido seguida de una modificación rápida en las preferencias por el nuevo color que ahora contiene el macronutriente. Nuestros resultados experimentales rebatieron esta sospecha, ya que tras el cambio de color los peces siguieron durante varios días ingiriendo proporciones de cápsulas de acuerdo con la antigua asociación color-macronutriente, tardando unas dos semanas en alcanzar un patrón estable de selección similar al que tuvo lugar con anterioridad al cambio de color. Esto indica de forma concluyente que es el color, y no la potencial contaminación externa de las cápsulas, la responsable de esta discriminación.

6.3. ¿Qué regulan los peces?

Es lógico pensar que los animales seleccionan un macronutriente concreto debido a que éste le aporta algo que no puede ser cubierto por los otros nutrientes. En peces, los tres macronutrientes pueden ser utilizados como fuente de energía, si bien no con la misma eficiencia (Wilson, 1994; Mommsen, 1998). Por otro lado, no todos los nutrientes son interconvertibles, necesitándose cantidades mínimas de algunos de ellos considerados como esenciales, como ciertos aminoácidos y ácidos grasos. Además, en la naturaleza, los alimentos no están constituidos exclusivamente por un único macronutriente sino que lo están por una combinación de ellos. Así, los alimentos que contienen una cierta cantidad de grasa, también contienen habitualmente proteína, al igual que los que contienen mayoritariamente carbohidratos. Por ello, se podría pensar que es suficiente la regulación de la cantidad de energía ingerida para que los animales, de forma indirecta, consigan los macronutrientes que precisan. Estos argumentos coinciden en señalar la necesidad de que existan mecanismos reguladores de la cantidad de energía ingerida, sin embargo, proporcionan argumentos contrapuestos para justificar la necesidad de existencia de regulación en la ingesta de los diferentes macronutrientes. ¿Qué es lo que se regula en la lubina?

La lubina parece regular muy bien el nivel de energía ingerido. Nuestros resultados experimentales muestran que la lubina mantiene la concentración energética con independencia de que la dieta ofrecida esté granulada o incluida en el interior de cápsulas de gelatina, tanto en forma de dieta completa como de macronutrientes puros separados. Por tanto, la lubina no necesita de la detección de las cualidades organolépticas del alimento para evaluar su contenido energético, siendo ésta la primera vez que se demuestra la existencia de un control exclusivamente post-ingestivo sobre la energía ingerida. Un reto mucho más complejo para el animal es la regulación de la ingesta energética a partir de tres fuentes de macronutrientes puros encapsulados separadamente. Esto implica la capacidad del pez, en nuestro caso una especie carnívora, para compensar las fluctuaciones en la ingesta de cada uno de los macronutrientes de tal modo que al final la dieta seleccionada le aporte una cantidad estable de energía. La capacidad para regular la ingesta de energía a partir de dietas elaboradas con macronutrientes puros ya fue

demostrada por Sánchez Vázquez *et al.* (1998), sin embargo, en aquella ocasión las dietas fueron granuladas y, por tanto, el pez podía detectar ciertas cualidades del alimento antes de ingerirlo.

Mucho más complicada resulta la demostración de la existencia de un control de la ingesta de los diferentes macronutrientes. La importancia de esta cuestión es mayor que la puramente restringida al debate científico. Por ejemplo, si la ingesta de proteína está regulada en los peces, su nivel de inclusión en la dieta puede modificar los valores de ingesta de los otros dos macronutrientes. Si suministramos a los peces una dieta con baja cantidad de proteína y elevado nivel de grasa, para que el pez consiga el nivel proteico que precisa ha de sobreingerir grasa, lo que le puede provocar alteraciones fisiológicas considerables.

En principio, en relación con la selección de macronutrientes, podemos plantear dos situaciones extremas, entre las cuales probablemente ha de situarse la realidad: a) la existencia de tres sistemas separados dedicados al control de cada uno de los macronutrientes, y b) que no exista una regulación específica de ningún macronutriente. El primer planteamiento implica que la selección de diferentes macronutrientes en la dieta esté determinada separadamente por el almacenamiento y utilización de cada uno de ellos, lo que supone la existencia de sistemas de control separados para cada macronutriente. Cada uno de estos sistemas ha de poseer mecanismos de detección de las cantidades relativas de almacenamiento/utilización de cada macronutriente, la existencia de una señal de error relacionada con un macronutriente específico y la capacidad de identificar e ingerir los macronutrientes con el fin de corregir esas señales de error y alcanzar un balance a largo plazo. Sin embargo, entre estos dos extremos, un control rígido y la falta de regulación, cabe establecer posiciones intermedias como la existencia de una regulación flexible que no tiene por qué ser de igual nivel para los tres macronutrientes (Seeley y Berthoud, 2000).

En peces carnívoros, como es el caso de la lubina, debe haberse producido una fuerte presión selectiva para asegurar niveles adecuados de proteína, sin esos niveles los animales no pueden crecer y regenerar sus tejidos adecuadamente tras una agresión. Por tanto, puede parecer lógico que la ingesta de proteína esté regulada de forma separada. En ratas, varias pruebas apoyan la existencia de tal regulación, Rozin (1968) muestra que las ratas compensan su ingesta proteica tras la dilución de la dieta de proteína con celulosa. Por su parte, Simpson y Raubenheimer (2000) demuestran, mediante la técnica del diseño geométrico de dietas, que la rata regula la proteína y los carbohidratos. Por último, Gietzen (2000) ha descrito la existencia de mecanismos neurales que pueden detectar imbalances de aminoácidos localmente y producir potentes cambios en el comportamiento ingestivo. En peces, con la excepción del carpín dorado, especie omnívora, la proteína ha sido el macronutriente seleccionado en mayor cantidad, tanto en experimentos utilizando dieta granulada (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1999; Aranda *et al.*, 2000, 2001; Yamamoto *et al.*, 2001; Torrejón Atienza, 2004) como encapsulada (Rubio *et al.*, 2003, 2004; Almáida *et al.*, comunicación personal). Llama la atención la relativa estabilidad encontrada tanto en el número de cápsulas como en la cantidad de proteína ingerida en los diferentes experimentos realizados en esta Tesis Doctoral. El porcentaje de proteína seleccionado es

superior al de CH y F sin que pueda argumentarse que son el sabor-olor y/o la textura de la dieta los que están favoreciendo dicha selección. Un porcentaje de selección de proteína similar al obtenido con tres dietas se consigue cuando las lubinas son alimentadas únicamente con cápsulas de proteína y grasa o proteína y carbohidratos. Además, resultados no publicados (Almáida *et al.*, comunicación personal), obtenidos en el sargo picudo con la técnica de la encapsulación, demuestran que la dilución del contenido de las cápsulas de proteína con celulosa va seguida de una compensación progresiva de la ingesta de cápsulas de proteína. Todos estos resultados sugieren que la ingesta de proteína está fuertemente regulada en peces, tanto carnívoros, como omnívoros. A pesar de ello, la lubina es incapaz de mantener sus niveles de energía o de cantidad de proteína ingerida tras unos pocos días de alimentación únicamente a partir de cápsulas de proteína, lo que indica que otros nutrientes son necesarios para que se pueda mantener la regulación de su ingesta proteica.

En el caso de la grasa y carbohidratos los argumentos para explicar la presencia de una regulación independiente son mucho más débiles y controvertidos. La mayoría de los experimentos no han permitido demostrar la existencia de unos niveles de selección diferentes para las cápsulas de F y de CH, manteniéndose los porcentajes de selección de uno y otro macronutriente relativamente cercanos. No obstante, cuando los peces fueron considerados de forma individual aparecieron preferencias nutricionales por proteína o grasa, con animales que ingieren más de un 40% de la energía de la dieta en forma de proteína o de grasa, respectivamente. Estas preferencias nutricionales previas han sido demostradas en ratas, donde los animales mostraron preferencia por ingerir proteína o carbohidratos (Smith *et al.*, 1999), preferencia nutricional que podría ser debida a su capacidad metabólica o a su estatus fisiológico previo. De los resultados obtenidos se desprende la necesidad de realizar nuevos experimentos para demostrar la capacidad de los peces de controlar la cantidad de F y CH ingeridos en el interior de cápsulas.

6.4. ¿Cómo tiene lugar el aprendizaje?

El desarrollo de un aprendizaje asociativo implica que los animales han de poder asociar una característica externa de las cápsulas con su contenido interno, lo que implica necesariamente la capacidad de monitorizar el contenido de las cápsulas mediante algún mecanismo post-ingestivo. Si eliminamos la detección orofaríngea, permanecen como opciones las señales nerviosas (quimiosensores de estómago e intestino), los niveles circulantes de nutrientes, las señales metabólicas y las endocrinas.

Ya se ha discutido anteriormente que la lubina debe aprender a reconocer alguna característica pre-ingestiva de las cápsulas que asocie a los cambios post-ingestivos inducidos por el macronutriente contenido en ellas, cambios que a su vez son reconocidos por el envío de una señal al cerebro. Finalmente, el cerebro del pez ha de conectar la señal pre-ingestiva con la post-ingestiva. Una vez producida esta asociación, la selección puede producirse a dos escalas temporales: intraprandial e interprandial. La selección intraprandial únicamente es posible si las comidas duran el tiempo necesario para que los nutrientes

puedan ser detectados en el tracto gastrointestinal y/o absorbidos. Para que se produzca la selección intraprándial los nutrientes en estómago e intestino han de estimular quimiorreceptores específicos o, una vez absorbidos, ser detectados por tejidos sensibles a sus niveles circulantes o bien producir la liberación de hormonas de un modo rápido que permita la decisión de seguir o no consumiendo un determinado tipo de alimento (Thibault y Booth, 1999). Sin descartar que con nuestro diseño experimental pueda ocurrir una cierta selección intraprándial, ésta no debe ser muy importante debido a dos razones: a) el corto tiempo que dura una comida, ya que las cápsulas permanecen accesibles únicamente durante 30 min y, además, la mayor parte de la ingesta tiene lugar en los primeros 15-20 minutos; b) la existencia de una cápsula de gelatina dura retrasa la liberación de los macronutrientes contenidos en ella durante unos minutos, por tanto, la mayor parte de la selección compensatoria ha de tener lugar de un modo interprándial. Ahora bien, para que ésta tenga lugar, el animal ha de aprender a seleccionar el alimento cuyas características preingestivas coinciden con una señal interna nutriente-específica, cuando ésta es suficientemente baja, y no seleccionar el alimento cuyas características sensoriales han sido asociadas con una señal interna suficientemente elevada (Booth, 1977, 1985, 1987). La selección dietaria ha de estar controlada por una conjunción de información adquirida durante el presente y el pasado de un individuo acerca de las características de un alimento y de los estados nutricionales de su organismo. Así, por ejemplo, un pez que ingiera pocas cápsulas de proteína un día, tenderá a comer más cápsulas de proteína al día siguiente y por el contrario tenderá a comer menos tras un día en el que su ingesta de proteína fuese demasiado elevada. Ello podría explicarse, por ejemplo, argumentando que los elevados niveles de amonio, o de cualquier otro metabolito, incrementados por la elevada ingesta proteica podrían inducir una aversión condicionada hacia la ingestión de cápsulas proteicas (Thibault y Booth, 1999).

En resumen, existen cuatro niveles de actuación que tienen lugar en los procesos de selección de macronutrientes en peces alimentados con macronutrientes encapsulados (Figura 17):

1. Señales sensoriales cefálicas (visión, olfacción, gustación, mecanocepción).
2. Señales generadas durante la digestión y/o absorción (señales gastrointestinales y hepáticas)
3. Transducción neural. Generación de señales nerviosas que informen de la disponibilidad de los diferentes macronutrientes (liberación de neurotransmisores y péptidos capaces de actuar en diferentes regiones cerebrales).
4. Integración nerviosa que como resultado final produzca la activación de efectores (sistemas motor, autonómico, endocrino y comportamental) que en última instancia serán los responsables de la selección dietaria.

De estos cuatro niveles, en los experimentos llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral, únicamente se han abordado experimentalmente, si bien parcialmente, los tres primeros. Por ello son los que se discutirán más extensamente a continuación.

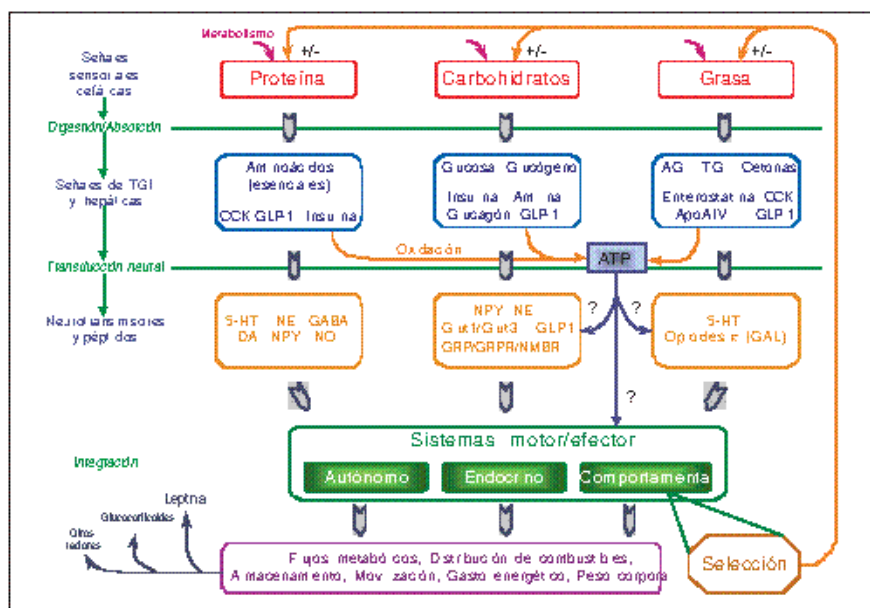


Figura 17. Diagrama esquemático mostrando el flujo de información y el carácter químico de los mensajeros potencialmente implicados en el sistema regulador macronutriente específico de la ingesta de alimento. Las señales portadoras de la información específica de los macronutrientes son generadas por las fases cefálicas y gastrointestinal/hepática durante la ingestión, y por los procesos metabólicos. Estas señales son transducidas e integradas dentro de la actividad neuronal, la cual determina la selección presente y futura así como la actividad autónoma y endocrina. También aparece indicada la posibilidad de una información no específica de los macronutrientes, en el control de la ingesta de alimento, procedente de la producción energética del hígado. Abreviaturas: CCK, colecistoquinina; GLP-1, péptido similar al glucagón tipo 1; AG, ácidos grasos libres; TG, triglicéridos; ApoAIV, Apolipoproteína A-IV; S-HT, serotonina; NE, norepinefrina; GABA, ácido gamma-aminobutírico; DA, dopamina; NPY, neuropéptido Y; NO, óxido nítrico; Glut1/Glut3, transportadores de glucosa 1 y 3; GRP, polipéptido liberador de gastrina (hombesina); GRPR, receptor del GRP; NMBR, receptor de la neuromedina-B; GAL, galanina (Redibujado de Seeley y Berthoud, 2000).

6.4.1. Señales cefálicas

Las señales sensoriales cefálicas, si bien limitadas por el procedimiento de la encapsulación, han de estar presentes para permitir la existencia de selección de macronutrientes. Mediante el empleo de este procedimiento, en principio, sólo las señales visuales han estado presentes, sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que los peces elaboren una imagen cerebral de cada tipo de cápsula a partir de informaciones obtenidas tras la ruptura ocasional de alguna de ellas antes o durante la ingestión de la misma. De este modo, las señales visuales procesadas por el cortex visual podrían confluir en la amígdala o en hipotálamo lateral con señales de receptores gustativos (procesadas por el núcleo del tracto solitario) y con señales olfativas procedentes del bulbo olfatorio. Estas señales sensoriales podrían verse confrontadas con otras señales de origen postingestivo que en su conjunto permitirían la elaboración de un comportamiento alimentario tendente a controlar la ingesta de macronutrientes (Rolls, 2000).

6.4.2. Señales generadas durante la digestión y absorción de nutrientes

Cuando las cápsulas llegan al estómago, antes de ser digerida su cubierta, pueden producir la estimulación de terminaciones mecanosensitivas vagales que informarían a los centros reguladores de la ingesta del grado de distensión de la pared estomacal. Esta señal mecanorreceptiva, rápida, podría servir como un primer nivel de regulación del volumen de alimento ingerido. Sin embargo, aunque esta regulación esté presente en peces, estos vertebrados parecen regular más la energía que el volumen como lo prueban los experimentos de dilución de dietas con celulosa, tanto granuladas como encapsuladas (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1998; Almáida *et al.*, comunicación personal), y la aparente pérdida de la regulación de volumen en especies como la trucha en la cual la ingesta de cápsulas llegó a alcanzar niveles incluso superiores a un 8% de su peso corporal en una sola comida.

Pruebas electrofisiológicas y comportamentales sugieren que estómago e intestino son capaces de suministrar información sobre la composición en macronutrientes de una comida. La pared de estómago e intestino está tapizada de quimiorreceptores sensibles a determinados componentes de la dieta (Höfer *et al.*, 1996; Covasa y Ritter, 2000). En mamíferos, registros electrofisiológicos de fibras nerviosas que inervan el intestino han mostrado sensibilidad a la presencia de aminoácidos, glucosa y ácidos grasos (Mei, 1978; Jeanningros, 1982; Melone, 1986). Estas señales convergen con señales gástricas mecanorreceptivas e información exteroceptiva en el metencéfalo-mielencéfalo, suministrando una vía mediante la cual las señales viscerales pueden influenciar las señales orosensoriales en la selección de macronutrientes (Covasa y Ritter, 2000).

Dentro de esta categoría (señales generadas durante la digestión y absorción de nutrientes) existe un tercer tipo de señal, la endocrina, generada por el tracto gastrointestinal en respuesta a nutrientes específicos. Así, la CCK, GLP-1, enterostatina, insulina y amilina, entre otras, son liberadas diferencialmente en respuesta a los distintos macronutrientes (Seeley y Berthoud, 2000).

Desde hace años se conoce el papel desempeñado por la CCK reduciendo la ingesta de alimento y produciendo saciedad, tanto en mamíferos como en peces (Himick y Peter, 1994; Woltman y Reidberger, 1999; Broberger y Hökfelt, 2001). Nuestros resultados muestran que también en peces alimentados con macronutrientes encapsulados, la CCK induce una disminución dependiente de la dosis de la ingesta total, sin que sus efectos sean selectivos sobre uno u otro macronutriente. En mamíferos se ha descrito un efecto selectivo en la ingesta de macronutrientes inducido por la administración de CCK, no obstante la amplia variabilidad de efectos observados en el patrón de selección de macronutrientes en la misma especie (Avery y Livosky, 1986; McCoy *et al.*, 1990; Thibault *et al.*, 1990; Mamoun *et al.*, 1997) no permite asignarle un claro efecto sobre un macronutriente determinado a dicha hormona. La reducción por igual de todos los macronutrientes en la lubina, a diferencia de lo descrito en mamíferos, puede ser explicada por las diferencias en la regulación de la ingesta entre peces y mamíferos. Asimismo, una posible explicación complementaria puede estar relacionada con la metodología empleada en la que los cambios en la palatabilidad inducidos, al menos parcialmente, por la CCK (Croos-Mellor *et al.*,

1999; Peyon *et al.*, 1999) son evitados al mostrar todas las dietas las mismas características organolépticas.

Los efectos de la CCK están mediados por dos tipos de receptores, los CCK-A predominantes en los tejidos periféricos y los CCK-B especialmente abundantes en el SNC (Gardner y Jensen, 1984). El bloqueo no selectivo de la CCK endógena, mediante el antagonista proglumide, produce un incremento dosis-dependiente de la ingesta total de alimento, sin alterar la proporción de sus macronutrientes. Tampoco se ve alterada la composición de la dieta seleccionada cuando se bloquean los efectos de la CCK exógena con este mismo antagonista.

El cortisol también ha sido una sustancia cuyos efectos sobre la ingesta de alimento han sido ampliamente estudiados en mamíferos y en menor medida en peces, si bien su actuación es muy dependiente de sus concentraciones plasmáticas y del estatus fisiológico del animal. En la trucha, el cortisol induce efectos que van desde la inhibición hasta la estimulación de la ingesta total de alimento encapsulado, aunque, debido a las peculiaridades de esta especie, no se ha podido abordar el estudio de la influencia del cortisol sobre la selección de macronutrientes.

Un último nivel de detección de los nutrientes tiene lugar una vez han sido absorbidos. Diferentes tejidos, entre los que destaca el hígado, poseen sensores que monitorizan continuamente las concentraciones disponibles de nutrientes. Los nutrientes percibidos por la boca y el estómago no restauran las reservas nutricionales del cuerpo, hasta que los nutrientes no son absorbidos y detectados por el hígado, que es el primer órgano que detecta que los nutrientes han sido finalmente absorbidos por el intestino, induciendo saciedad (Carlson, 1998).

6.4.3. Transducción neural

Determinados neurotransmisores y hormonas, una vez liberados en respuesta a señales procedentes del tracto digestivo o metabólicas, pueden actuar sobre áreas cerebrales específicas modificando las preferencias selectivas por macronutrientes. En esta Tesis Doctoral se han estudiado los efectos de la hormona melatonina y de un neurotransmisor, precursor de la síntesis de la melatonina, como es la serotonina.

La melatonina es una hormona producida por la pineal de los peces en respuesta a cambios en el fotoperiodo y temperatura (Falcón *et al.*, 1992; Zachmann *et al.*, 1992; Iigo *et al.*, 1994; García-Allegue *et al.*, 2001), sin embargo, su síntesis por las células enterocromafines en el tracto digestivo (TGI) es muy importante, postulándose que la misma depende de la presencia de factores nutricionales y del comportamiento alimentario antes que del fotoperiodo (Huether, 1994; Bubenik *et al.*, 1996; Martín *et al.*, 1998). Lo último es sustentado por los hallazgos obtenidos en mamíferos y peces, dado que la pinealectomía no causa alteración alguna de la cantidad o distribución de la melatonina en el tracto gastrointestinal (Bubenik, 1980; Huether *et al.*, 1992; Bubenik y Brown, 1997), no impide la aparición de melatonina plasmática (Ozaki y Lynch, 1976), permaneciendo los niveles diurnos inalterados (Kennaway *et al.*, 1977; Vaughan y Reiter, 1986), y que la pinealectomía acompañada de enucleación bilateral no disminuye la concentración plasmática de

melatonina en el carpín dorado (Kezuka *et al.*, 1992), apuntando al tracto gastrointestinal como la principal fuente de melatonina plasmática durante el periodo de iluminación. La administración de esta hormona en el interior de cápsulas de gelatina induce concentraciones 2,4 veces superiores a los nocturnos y 26 veces superiores al nivel basal a esa hora del día, 45 min después de su ingestión por la lubina. Esta hormona induce una inhibición dosis dependiente en la ingesta total de macronutrientes. Sin embargo, la reducción en la ingesta de cada uno de los macronutrientes no es proporcional por lo que, en la dieta final seleccionada en respuesta a la ingestión de la melatonina, la proporción de grasa se ve incrementada significativamente. Aunque se desconoce el mecanismo de acción de la melatonina sobre la ingesta, es muy probable que sus efectos tengan lugar directamente sobre áreas reguladoras de la ingesta ya que se trata de una hormona lipofílica que atraviesa muy bien la barrera hematoencefálica. Ésta es la primera vez en la que se demuestra un efecto selectivo sobre la ingesta de macronutrientes de una hormona en peces.

El que una hormona relacionada con la sincronización fotoperiódica promueva cambios selectivos en el patrón de selección de macronutrientes no debe sorprender ya que, a lo largo del año, las necesidades de los diferentes macronutrientes pueden ir cambiando adaptándose a los cambios fisiológicos de la especie. En condiciones naturales, la elevación de la melatonina es más duradera en el invierno y otoño que en verano (Iigo y Aida, 1995; García-Allegue *et al.*, 2001), y es precisamente en invierno cuando tiene lugar la reproducción de la lubina, lo que lleva parejo un aumento de la deposición de grasa en las gónadas (Pickett y Pawson, 1994), por lo que no sería extraño que sus necesidades por esta sustancia se vieran incrementadas. El aumento del porcentaje de grasa ingerida también podría ser un reflejo de la necesidad de ingerir nutrientes ricos en energía que compensen la disminución de la ingesta asociada a las bajas temperaturas que tienen lugar durante fotoperiodos cortos.

La monoamina neurotransmisora serotonina fue asociada al control de la ingesta de alimento y del comportamiento alimentario hace más de 20 años (Blundell, 1977). La serotonina neuronal es producida a partir del aminoácido triptófano. El triptófano ingerido entra en el SNC cruzando la barrera hematoencefálica mediante un proceso de transporte activo, compartiendo el transportador de los grandes aminoácidos neutros (Blundell, 1977), mientras que la serotonina periférica es sintetizada y liberada por las células enterocromafines de la mucosa gástrica (Hubel, 1985; Cooke, 1986).

La 5-HT en mamíferos y peces actúa produciendo una inhibición de la ingesta de alimento (Edwards y Stevens, 1991; De Pedro *et al.*, 1998; Leibowitz y Alexander, 1998; Ward *et al.*, 1999; Chapelot *et al.*, 2000), efecto que también se ha observado en la lubina. La inhibición es dependiente de la dosis y tiene lugar cuando la 5-HT se administra oralmente. Por tanto, en peces parece ser que la 5-HT también actúa aumentando el proceso de saciación y promoviendo el estado de saciedad al igual que lo hace en mamíferos. Las concentraciones de 5-HT hipotalámica en mamíferos sugieren que ésta es sensible a los distintos macronutrientes y puede formar parte integral de los sistemas que regulan la ingesta de macronutrientes. Se ha propuesto que la 5-HT actúa como un sensor de la relación plasmática entre el triptófano y los grandes aminoácidos neutros y esta relación se ve afectada por el consumo de proteína y de carbohidratos (Fernstorm y Wurtman, 1973;

Wurtman y Fernstorm, 1974; Teff *et al.*, 1989). Inicialmente se postuló un papel regulador de la ingesta de CH para la 5-HT, sin embargo, pruebas más recientes indican que la 5-HT puede estar también relacionada con la ingesta de grasa (Leibowitz, 2000; York *et al.*, 2000); sin embargo, dado que estos experimentos se han llevado a cabo con dietas cuyo sabor y textura eran diferentes, sus resultados han de ser tomados con cautela. A diferencia de lo señalado en mamíferos, en la lubina, la 5-HT parece inhibir selectivamente la selección de grasa, mientras que aumenta la de proteína y no cambia la de carbohidratos. El diferente papel jugado por los carbohidratos en el metabolismo de peces y de mamíferos podría justificar las diferentes acciones de la 5-HT en ambos grupos de vertebrados.

6.5. Aplicaciones y perspectivas de los estudios de selección de macronutrientes encapsulados

La realización de estudios sobre selección de macronutrientes en peces, además de poseer un innegable interés científico permitiendo el enfoque comparado de un tema tan controvertido en mamíferos, es interesante por su potencial aplicado a la elaboración de dietas comerciales adaptadas a las necesidades de los peces.

Entre las líneas de trabajo en las que los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral pueden tener implicaciones se encuentran las siguientes:

6.5.1. Utilización de atrayentes para la mejora de la ingesta de alimento

Los sentidos químicos en los peces tienen una gran importancia, por ello se ha tratado de mejorar la ingesta de alimento mediante la incorporación de atrayentes a sus dietas. Si bien algunas de estas sustancias podrían ser detectadas oralmente y ser mediadoras de señales innatas indicadoras de la energía y/o macronutrientes de la dieta, buena parte de la regulación de la energía y la ingesta de alimento no requieren de la detección orofaríngea, siendo más bien los procesos de aprendizaje establecidos entre las características sensoriales de la dieta y sus consecuencias los que parecen ser más efectivos. Es por ello, que los efectos de los atrayentes podrían verse reducidos únicamente a unos cortos periodos de tiempo, cesando o reduciéndose cuando el animal aprenda a asociar el saborizante con el contenido real de la dieta.

6.5.2. Incorporación de nuevas fuentes de macronutrientes de origen vegetal

La incorporación de nuevas fuentes de proteína y de grasa de origen vegetal constituye uno de los retos actuales de la nutrición de peces con el fin de alcanzar la sostenibilidad de la acuicultura. Sin embargo, los estudios nutricionales sobre la eficacia de determinadas fuentes alternativas de grasa y proteína se ven influidos por la presencia en dichas fuentes de sustancias rechazadas por los peces debido a su palatabilidad, lo que hace difícil diferenciar entre la capacidad de los peces para aprovechar metabólicamente esos nutrientes y el rechazo que generan las nuevas dietas. La encapsulación constituye un buen sistema para evitar la barrera ingestiva en este tipo de estudios.

6.5.3. Diseño de dietas estacionales o adaptadas a cambios fisiológicos

La utilización de una única dieta, con una composición definida, para alimentar a los peces a lo largo de buena parte de su ciclo vital no deja de ser una simplificación que probablemente no responda a sus necesidades metabólicas. La selección de macronutrientes puede ser un buen sistema para el diseño de dietas estacionales, dado los grandes cambios que sufre el metabolismo de los peces en relación con la temperatura. Además, la reproducción estacional que caracteriza a la mayoría de las especies de peces exige, así mismo, cambios en las necesidades de los diferentes macronutrientes que deberían ser tenidas en cuenta.

La existencia de modificaciones en la selección de macronutrientes en respuesta a cambios medioambientales puede ilustrarse de un modo ejemplar con los estudios presentados en esta Tesis Doctoral sobre el efecto de la salinidad en la selección de macronutrientes. Cuando la salinidad disminuye la preferencia por proteína aumenta mientras que disminuye por los carbohidratos. Dada la existencia de cultivos comerciales de lubina en aguas salobres e incluso dulces, la dieta elaborada para estos peces debería ser modificada teniendo en cuenta esta información.

6.5.4. Selección genética de acuerdo con las preferencias por macronutrientes

Los estudios de selección de macronutrientes, tanto encapsulados como granulados, han permitido poner de manifiesto la existencia de una cierta variabilidad en la dieta seleccionada por los peces. A partir de este tipo de estudios es posible relacionar el crecimiento individual de un pez con la selección dietaria realizada. Probablemente dicha selección dietaria esté en parte condicionada por la capacidad del pez para metabolizar eficientemente los diferentes macronutrientes. En este sentido se han podido observar excelentes crecimientos en lubinas que ingieren porcentajes de carbohidratos superiores a la media (datos no mostrados). Posiblemente, una selección genética basada en la elevada capacidad de utilización de carbohidratos sería un procedimiento rápido y sencillo para conseguir peces con mayor tolerancia y capacidad de utilización de dietas con menores niveles de proteína.

Finalmente, los estudios mostrados en esta Tesis Doctoral confirman que la selección de macronutrientes en peces ha de ser estudiada conjuntamente con la regulación de la ingesta en este grupo de vertebrados. Con la encapsulación de dietas se inicia una nueva etapa que ya está produciendo y sin duda producirá importantes resultados dentro de este campo científico.

6. General discussion

Most studies on the control of food intake that have been carried out in laboratory animals and humans have focussed on the control of the energy or the quantity of food ingested, neglecting an important aspect of intake regulation that also deserves attention, the regulation of macronutrients intake, which is the main subject of this PhD Thesis.

6.1. Methodological aspects

So far, the studies that have tried to address this issue in fish are very scarce (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1998, 1999; Aranda *et al.*, 2000, 2001; Yamamoto *et al.*, 2001, 2003; Torrejón Atienza *et al.*, 2004), applying for that purpose methods previously used in mammals. Basically, the procedure has been to offer fish two or more diets with different macronutrient content and subsequently determining their intake in terms of weight (g), energy (kJ), or energy/total weight percentage ingested as P, CH or F. Thus, a number of studies have used three granulated diets, each one containing a single macronutrient type (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1999; Aranda *et al.*, 2000), or three granulated diets each one made of a pair of macronutrients, P-F, P-CH and CH-F (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1998; Aranda *et al.*, 2000, 2001). The first method poses two important problems: a) the technical difficulties involved in granulating diets made of pure macronutrients, especially the fat diet, which requires using large proportions of cellulose and binders, and b) the huge differences in the organoleptic properties of the different diets. The second method used (diets with pairs of macronutrients) reduces but does not entirely avoid the previous drawbacks. Aside from the technical problems, the inherent organoleptic properties of granulated diets make it difficult to demonstrate the existence of macronutrient selection, inasmuch as the experimental results may be masked by the animals reactions to the different sensory qualities of the diets, or to the effects of neurotransmitters, hormones or drugs on the sensorimotor pathways involved in the perception of those qualities. In consequence, like Thibault and Booth (1999) have pointed out, only when constant patterns of dietary selection are obtained in different experiments using two or more presentations of the same macronutrient, it will be legitimate to conclude that a physiological control exists for the intake of that macronutrient. Therefore, it seems clear that the organoleptic properties of the different diets used in macronutrient selection studies are a serious drawback to study the regulation of macronutrient intake, especially in the case of fish, which are endowed with multiple, highly sensitive chemosensory systems (Lamb, 2001).

The ability of some fish such as rainbow trout or sea bass to ingest the food without previously chewing it, opens the possibility of developing methods based on diet encapsulation. The inclusion of a complete diet inside gelatin capsules was first used by Ruohonen *et al.* (1997) to feed rainbow trout, but until now, encapsulation had never been proposed as a method for studying macronutrient selection in fish.

The inclusion of pure macronutrients in hard gelatin capsules simultaneously eliminates

the two problems associated with the use of granulated diets. Irrespective of the macronutrient they contain, the capsules have the same external texture and chemosensory properties, which prevents the interference of their content with the selection process. In addition, being watertight they can be filled with both solids and liquids. Nevertheless, intake of any given macronutrient can only be selective if the diet containing that macronutrient has some particular physical or chemical property the animal can detect before ingestion (Thibault and Booth, 1999). In the case of encapsulated diets, the two only characteristics the fish could use to differentiate among diets are their color and their position in the tank. Even though it may help to speed up the learning process, supplying the capsules in three containers placed in different positions according to their composition does not seem to be a good method. The position *per se* has an effect on selection, and it becomes necessary to rotate the containers in order to prevent this masking effect. Furthermore, once the macronutrient positions have been rotated, the intake of every one of them quickly returns to its previous level, which demonstrates that the other differential feature of the diet, the color, is much more important for discrimination than the position. For this reason and once the relative weakness of the position became evident, it was decided to supply the three types of capsules mixed in a single floating container.

Concerning the importance of the color as an indicator for the capsules composition, it must be pointed out that the different macronutrients do not have specific colors in nature (Thibault and Booth, 1999); consequently the use of colors as external markers for the capsules content must necessarily be a learned process. This possibility was already implemented by Raubenheimer and Tucker (1997) in grasshopper, a species that can learn to associate visual signals with the CH or P content of the diet. Sea bass does not show any preference for any of the colors (red, orange and yellow) that have been used in these experiments, as it has been demonstrated by associating different colors to the same standard diet; however, this is not the case for rainbow trout, a species that shows a clear preference for the yellow color over the other two. Therefore, a previous study has to be conducted for each species in order to determine whether or not they have a preference for a certain color when ingesting the food.

From the methodological point of view, it is also important that the capsules are digested and release their content into the stomach in a short period of time. In sea bass, a species that learns to use the capsules color to discriminate their content, they break open in less than 20 min following ingestion. This time estimate comes from the observation that the plasma levels of both exogenous melatonin and serotonin start to rise 20 minutes after being ingested inside gelatin capsules. Here again, the rainbow trout is a special case, since the dynamics of capsule opening is much slower, with a minimum opening time of 5 to 7 hours depending on whether or not the animals have been fed during the previous 24 hours. This long delay between the capsules ingestion and their opening probably explains why it has not been possible to demonstrate the existence of a true macronutrient selection in rainbow trout using this technique.

The fact that the gelatin capsule content is not orally detected by the fish is an advantage that can also be useful for oral administration of substances such as hormones, neurotransmitters or drugs without the stress associated with other routes of administration like

intraperitoneal, intravenous or intracerebroventricular. This is particularly important to study the regulation of food intake in fish, which are very sensitive to the effects of stress. In addition, since the technique is not at all stressful, it can be used for long-term experiments, which is essential for studying the selection of macronutrients given their large variability from one day to the other. In our studies, capsules have been used to administer substances like melatonin, CCK, proglumide, serotonin and cortisol. In the particular case of melatonin and serotonin in sea bass, as well as cortisol in rainbow trout, the kinetics of their recovery in plasma was also studied. In sea bass, the plasma levels of melatonin and serotonin were significantly higher than the basal levels as from 20 min after the ingestion of the capsules, indicating that they break open, and their content is absorbed, quickly. In rainbow trout, however, the plasma kinetics of cortisol indicates that the capsules opening times are much longer. This technique for administering substances has proved quite acceptable for being used in fish.

6.2. Associative learning between the capsules color and their content

Eliminating the capsules position as a marker for their content does not reduce the fish ability to discriminate among the different capsules. In our experiments, with the exception of the color, all capsule external features were identical. Since the color is not a differential feature for macronutrients in nature, to be able to select among the different macronutrients the animals must have developed a classical conditioning (Pavlovian) type of associative learning. For this conditioning to occur, the type of macronutrient and the color must have acted as the unconditioned and conditioned stimulus respectively. Under our experimental conditions, this learning develops within two weeks at the most, which is the time required for macronutrient intake to reach a stable level.

Considering the high chemical sensitivity of fish, there was the possibility that discrimination of the capsules was not due to their different colors, but rather to slight external contaminations from their internal content. Should this have been the case, changing the color-macronutrient association should have been followed by a rapid change in preference for the new color now containing the macronutrient. This suspicion, however, was refuted by our experimental results, since the capsule proportions ingested by the animals after the color change was still in agreement with the old color-macronutrient association for several days, and it took the fish about two weeks to reach a stable selection pattern similar to the one they had prior to the color change. This is conclusive evidence that it is the color, and not any potential external contamination of the capsules, the feature responsible for this discrimination.

6.3. What do fish regulate?

It seems reasonable to think that animals select a specific macronutrient because it provides something they cannot obtain from other nutrients. Fish can use all three macronu-

trients as energy source, albeit not with the same efficiency (Wilson, 1994; Mommsen, 1998). On the other hand, all nutrients are not interconvertible, and small quantities of some of them are required, as is the case of certain amino acids and fatty acids that are considered essential. Furthermore, natural foodstuffs are not composed of a single macronutrient, but rather of a combination of them. Thus, foodstuffs that contain a certain amount of fat, usually also contain protein, and the same is true for those containing mostly carbohydrates. As a result, one could think that animals only have to regulate the quantity of energy they ingest in order to get, in an indirect way, all the macronutrients they need. All these arguments do agree in pointing out the need for mechanisms that regulate the quantity of ingested energy, however, they are at odds when it comes to justify the need for regulating the intake of the different macronutrients. What does sea bass regulate?

Sea bass appears to regulate quite well the level of energy ingested. Our experimental results show that sea bass can maintain the energy concentration regardless of whether the diet they are offered is granulated or inside gelatin capsules, and whether it is delivered as a complete diet or as separate, pure macronutrients. Thus, sea bass does not need to detect the food organoleptic qualities to evaluate its energy content, this being the first demonstration for the existence of an exclusively post-ingestive control on ingested energy. A much higher challenge for the animal is that of regulating its energy intake from three sources of pure macronutrients separately encapsulated. This requires the fish, in this case a carnivorous species, to compensate fluctuations in each macronutrient intake in such a way that at the end the diet selected provides a stable quantity of energy. Sea bass ability to regulate its energy intake when feeding on diets elaborated with pure macronutrients was already demonstrated by Sánchez-Vázquez *et al.* (1998), however, since granulated diets were used in this study, the animals could detect certain qualities of the food before the ingestion.

Demonstrating the existence of a control mechanism for macronutrient intake is a much more difficult task. The importance of this question goes beyond the purely scientific debate. For example, if protein intake is regulated in fish, its inclusion level in the diet can modify the intake values of the other two macronutrients. If fish are given a low-protein diet with high levels of fat, in order to get the amount of protein they need, fish will have to overeat fat, which may result in severe physiological alterations.

With regard to macronutrient selection, one can envisage two extreme cases, the real situation most likely being somewhere in the middle: a) the existence of three separate systems, each one controlling one type of macronutrient, and b) the lack of a specific regulation for any macronutrient. The first possibility means that the different macronutrients in the diet are independently selected based on the storage and usage of each one of them, which implies the existence of separate control systems for each macronutrient. Each system must include mechanisms to detect the relative storage/usage quantities of each macronutrient, error signals associated with specific macronutrients, and the capacity to identify and control the ingestion of macronutrients for the purpose of correcting those error signals in order to reach a long-term balance. However, a number of intermediate situations can be considered between these two extremes, i.e., a rigid control and the lack of regulation, including the existence of a flexible regulation that does not necessarily have to be at the same level for all three macronutrients (Seeley and Berthoud, 2000).

In carnivorous fish as sea bass, there must have existed a strong selective pressure to maintain suitable protein levels, without which the animals cannot adequately grow or regenerate their tissues after an aggression. Therefore, it would make sense for protein intake to be separately regulated. In rats, there is some evidence supporting the existence of such regulation. Thus, Rozin (1968) has shown that rats can compensate protein intake after the diet protein is diluted with cellulose. On the other hand, using the technique of geometric design of diets, Simpson and Raubenheimer (2000) have demonstrated that rats regulate protein and carbohydrates. Lastly, Gietzen (2000) has described the existence of neural mechanisms that can detect local amino acid imbalances, and induced drastic ingestion behavior changes. With the exception of goldfish, an omnivorous species, protein is the macronutrient for which fish tend to select highest quantities, both in experiments using granulated (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1999; Aranda *et al.*, 2000, 2001; Yamamoto *et al.*, 2001; Torrejón Atienza, 2004) and encapsulated (Rubio *et al.*, 2003, 2004; Almaida *et al.*, personal communication) diets. The relative stability observed both in the number of capsules and the quantity of protein ingested in the different experiments of this PhD Thesis is rather striking. The protein percentage selected is higher than that of CH and F, and it cannot be argued that the diet flavour and/or texture favour this selection. A similar protein selection percentage to that observed with three diets is achieved when sea bass are fed only protein and fat capsules or protein and carbohydrate capsules. Also, unpublished results (Almaida *et al.*, personal communication) obtained in sharpsnout sea bream using the encapsulation technique, demonstrate that diluting the content of protein capsules with cellulose is followed by a progressive compensation of protein capsules ingestion. All these results suggest that protein intake is strongly regulated in fish, whether they are carnivorous or omnivorous. In spite of that, after a few days being fed only protein capsules, sea bass is unable to maintain its energy or protein quantity levels, indicating that other nutrients are also required in order to maintain protein intake regulation.

The arguments for the existence of an independent regulation in the case of fat and carbohydrates are much weaker and controversial. Most experiments have not allowed demonstrating the existence of different selection levels for F and CH capsules, the selection percentages for both macronutrients being relatively similar. Nevertheless, when fish were considered on an individual basis, nutritional preferences for protein or fat were observed, with examples of animals ingesting more than 40% of the diet energy as protein or fat. These nutritional preferences have been shown to occur in rats, where animals preferred to eat protein or carbohydrates (Smith *et al.*, 1999), a preference that could be due to their metabolic capacity or previous physiological status. From the results we have obtained, it is clear that new experiments are required to determine the fish capacity to control the quantity of F and CH ingested inside capsules.

6.4. How does learning take place?

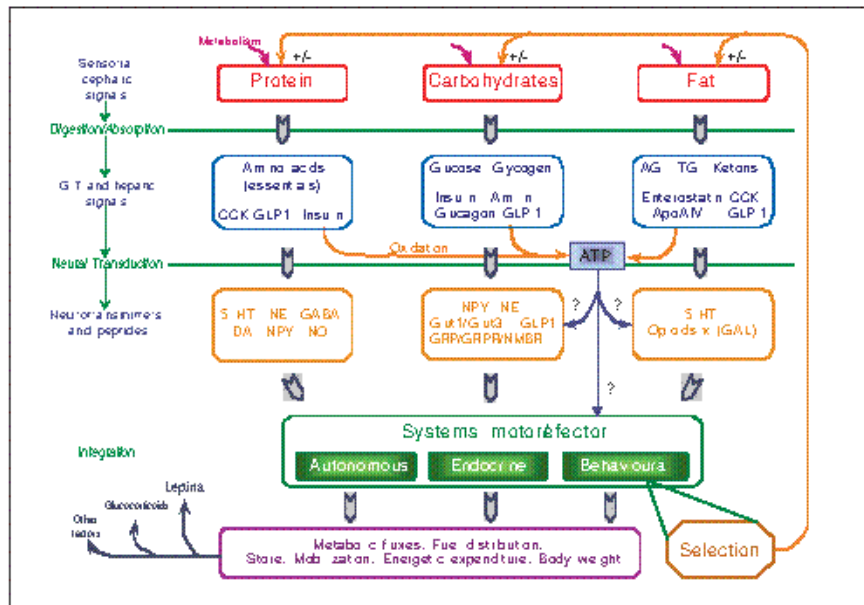
Development of an associative learning requires the animals to be able to associate an external feature of the capsules with their internal content, which necessarily implies their

ability to monitor the capsule content through some post-ingestive mechanism. After oropharyngeal detection has been ruled out, the alternative options include nerve signals (gastric and intestinal chemoreceptors), circulating levels of nutrients, and metabolic and endocrine signals.

As already discussed, sea bass must learn to recognize some pre-ingestive feature of the capsules that will be associated with the post-ingestive changes induced by the macronutrient they contain, changes that are in turn recognized by a signal travelling to the brain. Finally, the brain of the fish must connect the pre-ingestive signal with the post-ingestive one. Once this association has been established, selection can take place at two different time scales: intraprandial and interprandial. Intraprandial selection is only possible if meals last long enough for nutrients to be detected in the gastrointestinal tract and/or absorbed. For intraprandial selection to occur, nutrients in the stomach and the intestine must stimulate specific chemoreceptors. Alternatively, once absorbed, they must either be detected by tissues that are sensitive to their circulating levels or induce a rapid release of hormones that would allow animals to decide whether or not to continue consuming a certain type of food (Thibault and Booth, 1999). Even though our experimental design leaves room for a certain level of intraprandial selection, this should not be very important due to: a) the short time that a meal lasts, since capsules are only accessible for 30 min and most of the intake takes place in the first 15-20 minutes, and b) the fact that a few minutes are required to release the macronutrient content of a hard gelatin capsule; therefore, most of the compensatory selection must take place during the interprandial period. For this to occur, however, the animal must learn to select the food whose pre-ingestive features correlate with a nutrient-specific internal signal when this signal is low enough, and not to select this same food when the internal signal is sufficiently high (Booth, 1977, 1985, 1987). Dietary selection must be controlled by a conjunction of information, acquired during the present and past history of an individual, about the characteristics of a given foodstuff and the nutritional states of the animal. Thus, for example, a fish that on a given day ingests few protein capsules will tend to eat more protein capsules the day after; and on the contrary, it will tend to eat less after a day in which its protein intake was too high. This could be explained, for example, by arguing that the level of ammonium or any other metabolite, which has increased by the high protein intake, would induce a conditioned aversion toward the ingestion of protein capsules (Thibault and Booth, 1999).

In summary, macronutrient selection processes in fish take place at four different levels (Figure 17):

1. Cephalic sensory signals (vision, olfaction, gustation, mechanoreception).
2. Signals generated during digestion and/or absorption (gastrointestinal and hepatic signals)
3. Neural transduction. Generation of nerve signals informing on the availability of different macronutrients (release of neurotransmitters and neuropeptides acting on different brain regions).
4. Neural integration with the end result of activating a number of effectors (motor, autonomic, endocrine and behavioral systems) that will ultimately be the ones responsible for dietary selection.



Figures 17. Schematic diagram showing the flow of information and the chemical character of the messengers potentially implied in the macronutrient-specific regulating system of food intake. The carrying signals provided by specific information of the macronutrients are generated by the cephalic and gastrointestinal/hepatic phases during the ingestion, and by the metabolic processes. These signals are transduced and integrated inside the neuronal activity, which determines the present and future selection as well as the autonomous and endocrine activity. It also appears represented the possibility of a non-specific information of the macronutrients, in the control of the food intake, coming from the energy production of the liver. Abbreviations: CCK, cholecystokinin; GLP-1, glucagon-like peptide 1; AG, free fatty acids; TG, triglycerides; ApoAIV, apolipoprotein IV; 5-HT, serotonin; NE, norepinephrine; GABA, acid gamma-aminobutyric; DA, dopamine; NPY, neuropeptide Y; NO, nitric oxide; Glut1/Glut3, type 1 and 3 glucose transporters; GRP, gastrin-releasing peptide (bombesin); GRPR, GRP receptor; NMBR, neuromedin-B receptor; GAL, galanin (Redraw from Seeley and Berthoud, 2000).

Out of these four levels, only the three first have been experimentally addressed, albeit partially, in the present PhD Thesis. This is the reason why they are discussed below at length.

6.4.1. Cephalic signals

Although the encapsulation procedure reduces cephalic sensory signals, they have to be present for macronutrients selection to occur. In theory, the use of this procedure would only allow visual signals, however, one cannot exclude the possibility that fish could elaborate a mental image of each type of capsule based on the information gathered after the occasional breaking of some of them before or during ingestion. This way, visual signals processed by the visual cortex could converge in the amygdala or lateral hypothalamus with signals from gustatory receptors (processed by the nucleus of the solitary tract) and with olfactory signs coming from the olfactory bulb. These sensory signals could be confronted

with other signals of post-ingestive origin in order to elaborate a feeding behavior tending to control the intake of macronutrients (Rolls, 2000).

6.4.2. Signals generated during the digestion and absorption of nutrients

When capsules arrive to the stomach and before their cover is digested, they may stimulate vagal mechanosensitive endings that would report the degree of stomach wall distension to the centres responsible for intake regulation. This rapid mechanoreceptive signal could function as a first-level mechanism to regulate the volume of food ingested. However, although fish do exhibit this kind of regulation, more than the volume they seem to regulate the amount of energy, as it is demonstrated by experiments in which the diet, be it granulated or encapsulated, is diluted with cellulose (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1998; Almailda *et al.*, personal communication), and also by the apparent loss of volume control in species like rainbow trout where the capsules ingested could even exceed 8% of their body weight in a single meal.

Electrophysiological and behavioural tests suggest that the stomach and the intestine can provide information on the macronutrient composition of a meal. The walls of both of them are covered by chemoreceptors that are sensitive to certain components of the diet (Höfer *et al.*, 1996; Covasa and Ritter, 2000). In mammals, electrophysiological recordings of nerve fibers innervating the intestine have shown sensibility to the presence of amino acids, glucose and fatty acids (Mei, 1978; Jeanningros, 1982; Melone, 1986). These signals converge with gastric mechanoreceptive signals and exteroceptive information in the metencephalon-myelencephalon, providing a pathway through which visceral signals can influence orosensory signals during macronutrients selection (Covasa and Ritter, 2000).

Among the signals generated during the digestion and absorption of nutrients there is a third type, the endocrine signal, which is generated by the gastrointestinal tract in response to specific nutrients. Thus, CCK, GLP-1, enterostatin, insulin and amylin, among others, are differentially released in response to specific macronutrients (Seeley and Berthoud, 2000).

The role of CCK in reducing food intake and producing satiety, both in mammals and fish (Himick and Peter, 1994; Woltman and Reidberger, 1999; Broberger and Hökfelt, 2001), has been known for many years. Our results show that in fish fed encapsulated macronutrients, CCK also induces a dose-dependent inhibition of total intake, an effect that is not selective for any macronutrient in particular. A selective effect of CCK administration on macronutrient intake has been described in mammals, but the wide variability of effects that were observed on the macronutrient selection pattern of a given species (Avery and Livovsky, 1986; McCoy *et al.*, 1990; Thibault *et al.*, 1990; Mamoun *et al.*, 1997) does not allow to assign this hormone any clear effect on a specific macronutrient. Unlike what has been described in mammals, the fact that in sea bass CCK reduces the intake of all macronutrients to the same extent can be explained by the intake regulation differences between fish and mammals. Also, a possible complementary explanation may be related to the method we have used, in which the changes induced on palatability, at least partially by

CCK (Croos-Mellor *et al.*, 1999; Peyon *et al.*, 1999), are abolished since all diets have the same organoleptic characteristics.

The effects of CCK are mediated by two types of receptors: CCK-A that predominate in peripheral tissues, and CCK-B that are especially abundant in the CNS (Gardner and Jensen, 1984). The non-selective blocking of endogenous CCK by the antagonist proglumide induces a dose-dependent total food intake increase without modifying the macronutrient proportions. The composition of the diet selected does not change either when proglumide is used to block the effects of exogenous CCK.

The effects of cortisol on food intake have also been widely studied in mammals, and to a lesser extent in fish, although its action is strongly dependent on its concentration in plasma and the physiological status of the animal. In rainbow trout, the effects of cortisol go from inhibiting to stimulating the total intake of encapsulated food, although the distinctive features of this species have so far precluded analysing the influence of cortisol on macronutrient selection.

The last level of nutrient detection comes into play once these have been absorbed. Different tissues, among which stands out the liver, do have sensors that continuously monitor available nutrient concentrations. Nutrients sensed by the mouth and the stomach do not replenish the body nutritional stores until they are absorbed and detected by the liver, which is the first organ detecting that nutrients have been finally absorbed through the intestine, inducing satiety (Carlson, 1998).

6.4.3. Neural transduction

Once they are released in response to signals from the digestive tract or metabolic signals, some neurotransmitters and hormones can act on specific brain areas modifying the selective preferences for macronutrients. In this PhD Thesis we have study the effects of the hormone melatonin, and also serotonin, a neurotransmitter that is a precursor for the synthesis of melatonin.

Melatonin is a hormone produced by the pineal gland of the fish in response to photoperiod and temperature changes (Falcon *et al.*, 1992; Zachmann *et al.*, 1992; Iigo *et al.*, 1994; García-Allegue *et al.*, 2001). Nevertheless, its synthesis by chromaffin cells in the gastrointestinal (GI) tract is also very important, and it has been postulated to depend on the presence of nutritional factors and the animals feeding behavior rather than the photoperiod (Huether, 1994; Bubenik *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1998). This last statement is supported by findings from mammals and fish, where pinealectomy does not affect the quantity or distribution of melatonin in the gastrointestinal tract (Bubenik, 1980; Huether *et al.*, 1992; Bubenik and Brown, 1997), and it does not abolish the rise of plasmatic melatonin (Ozaki and Lynch, 1976), its daily levels remaining unaffected (Kennaway *et al.*, 1977; Vaughan and Reiter, 1986). In addition, pinealectomy combined with bilateral enucleation does not reduce the plasma concentration of melatonin in goldfish (Kozuka *et al.*, 1992), pointing to the gastrointestinal tract as the main source for plasmatic melatonin during the light period. Forty-five minutes after being ingested by sea bass inside gelatin capsules, melatonin concentrations increase 2,4 times with respect to nocturnal levels and 26 times

with respect to the basal level at that time of the day. This hormone induces a dose-dependent inhibition of total macronutrient intake. However, the intake of all macronutrients is not reduced to the same extent, and the final diet selected after melatonin administration has a significantly higher proportion of fat. Although the mechanism of action for the effects of melatonin on food intake is not known, probably it may act directly on brain areas involved in intake regulation, as it is a lipophilic hormone that can cross very easily the blood-brain barrier. This is the first time a selective effect on macronutrient intake has been demonstrated for a hormone in fish.

The fact that a hormone involved in photoperiodic synchronization promotes selective changes in the macronutrient selection pattern should not be surprising, since the different macronutrient requirements may change throughout the year in line with the physiologic changes of the species. Under natural conditions, melatonin peaks last longer in winter and autumn than in summer (Iigo and Aida, 1995; García-Allegue *et al.*, 2001), and sea bass reproduction in fact takes place in the winter, involving an increase of fat deposition in the gonads (Pickett and Pawson, 1994), thus, it would not be strange that the animals required higher levels of this substance. The fat ingestion percentage increase could also reflect the need to eat energy-rich nutrients to compensate for the intake decrease associated with the low temperatures reached during short photoperiods.

The neurotransmitter monoamine, serotonin, was first connected with the control of food intake and feeding behavior more than 20 years ago (Blundell, 1977). Neuronal serotonin is synthesised from the amino acid tryptophan. Ingested tryptophan enters the CNS crossing the blood-brain barrier by an active transport process, sharing the transporter for large neutral amino acids (Blundell, 1977), while peripheral serotonin is synthesized and released by chromaffin cells of the gastric mucosa (Hubel, 1985; Cooke, 1986).

In mammals and fish, 5-HT inhibits food intake (Edwards and Stevens, 1991; De Pedro *et al.*, 1998; Leibowitz and Alexander, 1998; Ward *et al.*, 1999; Chapelot *et al.*, 2000), an effect that has also been observed in sea bass. This inhibition is dose-dependent, and it occurs when 5-HT is orally administered. Therefore, it would appear that 5-HT also acts in fish by increasing the satiation process and promoting the satiety state as it does in mammals. Hypothalamic 5-HT concentrations in mammals suggest that this monoamine may be sensitive to the different macronutrients, and that it can be an integral part of the systems that regulate macronutrient intake. It has been proposed that 5-HT acts as a sensor for the plasma ratio between tryptophan and the large neutral amino acids, and this relationship is affected by protein and carbohydrate consumption (Fernstrom and Wurtman, 1973; Wurtman and Fernstrom, 1974; Teff *et al.*, 1989). A regulatory role for 5-HT on CH intake was initially postulated, however, more recent evidence indicates that 5-HT can also be related with fat intake (Leibowitz, 2000; York *et al.*, 2000); however, these results must be taken with caution, since the experiments were conducted using diets with different flavours and textures. Contrary to what has been described in mammals, in sea bass, 5-HT appears to selectively inhibit the selection of fat, while it increases that of protein and it does not change that of carbohydrate. The fact that the role of carbohydrates in fish metabolism is different from that in mammals could justify the different actions of 5-HT in both groups of vertebrates.

6.5. Applications and perspectives of encapsulated macronutrient selection studies

Besides their undeniable scientific interest as they provide a comparative approach to such a controversial topic in mammals, macronutrient selection studies in fish are interesting because of their potential application for elaborating commercial diets adjusted to the fish requirements.

The results obtained in this PhD Thesis may have implications for the following working lines:

6.5.1. Use of attractants to improve food intake

As chemical senses are especially important in fish, attempts have been made to improve food intake by incorporating attractants to their diets. Although some of these substances could be orally detected and act as mediators of innate signals indicative of the diet energy and/or macronutrient content, much of the energy and food intake regulation does not require oropharyngeal detection. Instead, the learning processes that are established between the sensory characteristics of the diet and its consequences appear to be much more effective. For this reason, the effects of attractants could be restricted to very short time periods, and would stop or decrease once the animals learn to associate the flavouring with the actual content of the diet.

6.5.2. Incorporation of new macronutrient sources of plant origin

The incorporation of new protein and fat sources of plant origin is one of the current challenges of fish nutrition with the aim of achieving a sustainable aquaculture. Nutritional studies on the efficacy of certain alternative fat and protein sources, however, are hindered by the presence in such sources of substances rejected by fish due to their palatability, which makes it difficult to distinguish between the fish capacity to make a metabolic use of those nutrients and the rejection generated by new diets. Encapsulation constitutes a good method to bypass the ingestive barrier in this type of studies.

6.5.3. Design of seasonal diets or diets adjusted to physiological changes

The use of only one diet with a defined composition to feed fish all along a good part of their vital cycle is nothing more than a simplification that in all likelihood does not meet their metabolic requirements. Macronutrients selection can be a good method for designing seasonal diets, given the important changes that fish metabolism undergoes in connection with the temperature. Furthermore, seasonal reproduction that is characteristic of most fish species also demands macronutrient requirement changes that should be taken into account.

The existence of macronutrient selection changes in response to environmental changes can be illustrated by the studies we are presenting concerning the effect of salin-

ity on macronutrient selection. When salinity decreases, the preference for protein increases while that for carbohydrates diminishes. Given the existence of commercial sea bass cultures in brackish and even freshwater, the diets elaborated for these fish should be modified keeping this information in mind.

6.5.4. Genetic selection according to the preferences for macronutrients

Whether encapsulated or granulated, macronutrient selection studies have revealed the existence of some variability in the diet selected by fish. From this type of studies, it would be possible to correlate a fish dietary selection with its individual growth. Most likely, dietary selection is partly conditioned by the fish capacity to metabolize the different macronutrients in an efficient way. In this sense, excellent growth rates have been observed in sea bass ingesting higher than average carbohydrate percentages (data not shown). A genetic selection based on a high capacity to use carbohydrates would possibly be a quick and simple procedure to obtain fish with higher tolerance and capacity to use diets with lower protein levels.

Finally, the studies that have been described in this PhD Thesis confirm that macronutrient selection in fish must be studied in conjunction with food intake regulation. Diet encapsulation opens a new stage for this scientific field that is already producing, and without a doubt it will produce, many important results.

Conclusiones

7. Conclusiones

1. La posibilidad de incluir en el interior de cápsulas de gelatina diferentes contenidos que no son detectados oralmente por los peces es una cualidad que puede ser aprovechada para la administración oral de cualquier tipo de sustancia sólida o líquida, sin que su ingestión se vea afectada por las propiedades organolépticas de dicha sustancia, y sin el estrés que conllevan otras vías de administración, lo que permite la realización de estudios de larga duración como los que son necesarios para abordar la regulación de la ingesta de alimento en peces.
2. La lubina, aunque no la trucha, es capaz de discriminar y seleccionar una dieta completa, rica en proteína, a partir de macronutrientes contenidos separadamente en tres tipos de cápsulas de gelatina de diferente color, desarrollando para ello un aprendizaje asociativo entre los efectos post-ingestivos ocasionados por la ingesta de un macronutriente y el color de la cápsula que lo contiene.
3. La lubina parece regular el nivel de energía ingerido, tanto si ésta procede de una dieta granulada completa, de una dieta encapsulada completa, o de macronutrientes encapsulados, siendo imprescindible que uno de ellos sea grasa. Por tanto, no necesita de la detección orofaríngea de las cualidades organolépticas del alimento para evaluar su contenido energético, siendo ésta la primera vez que se demuestra la existencia de un control exclusivamente postingestivo sobre la energía ingerida.
4. La lubina, especie típicamente carnívora, parece discriminar y regular los niveles de ingesta proteica, bien sea seleccionando a partir de dos macronutrientes (proteína y grasa o proteína y carbohidratos) o de los tres macronutrientes encapsulados. Para ello, ha de aprender a asociar el color de la cápsula de proteína con alguno de sus efectos postingestivos.
5. En nuestras condiciones experimentales, que implican una corta duración de la comida y un retraso en la liberación de nutrientes en el digestivo, si bien podría existir una cierta capacidad de control intraprandial de la ingesta de energía y de macronutrientes, ésta ha de producirse mayoritariamente mediante compensación interprandial, utilizando para ello una conjunción de información adquirida durante el presente y pasado del individuo acerca de las características de un alimento y de los estados nutricionales de su organismo.
6. La administración oral de CCK, en el interior de cápsulas de gelatina, induce una reducción dependiente de la concentración, de la ingesta de alimento,

inhibiendo de forma proporcional la ingesta de cada uno de los macronutrientes, por lo que no se ha podido demostrar ningún efecto selectivo de este péptido sobre los macronutrientes. Los efectos de la CCK sobre la ingesta se producen a través de la activación de sus receptores ya que son completamente bloqueados por su antagonista proglumide.

7. La administración oral de las indolaminas, serotonina y melatonina, en el interior de cápsulas de gelatina induce una rápida elevación plasmática de dichas sustancias tras su ingestión, lo que produce una inhibición, dependiente de la dosis, en la ingesta de alimento, acompañada de cambios en las proporciones de los macronutrientes seleccionados. En el caso de la serotonina aumenta la proteína, mientras que tras melatonina es el porcentaje de grasa el que se ve incrementado. Se trata de las primeras observaciones que muestran la capacidad de unos mediadores químicos de alterar la selección de macronutrientes en peces.
8. La lubina tolera bien una transferencia gradual desde agua salada (25‰) hasta agua dulce (0‰), sin embargo, su ingesta total de alimento experimenta una reducción significativa, aumentando el porcentaje de proteína seleccionada a costa de una disminución en el porcentaje de carbohidratos. Dada la existencia de cultivos comerciales de lubina en aguas salobres e incluso dulces, la dieta elaborada para estos peces debería ser modificada teniendo en cuenta esta información.

Conclusión general

La existencia de selección de macronutrientes mediante aprendizaje asociativo, inducido, al menos en parte, por los efectos selectivos de ciertos mediadores químicos, constituye el punto de partida de posteriores estudios que profundicen en este aspecto de la regulación de la ingesta, tradicionalmente olvidado en los peces, a pesar de sus implicaciones científicas y sus numerosas aplicaciones en acuicultura.

7. Conclusions

1. The possibility of filling gelatin capsules with different substances that are not orally detected by fish, is a feature that can be useful for oral administration of any type of solid or liquid, without their ingestion being hindered by the substance organoleptic properties, and without the stress associated to other administration routes. This opens the possibility of conducting long-term studies as are required to approach the regulation of food intake in fish.
2. Sea bass, but not rainbow trout, is able to discriminate and select a complete, protein-rich diet, from separate macronutrients delivered inside three types of different color gelatin capsules, developing for that purpose an associative learning between the macronutrient post-ingestive effects and the color of the capsules where it is contained.
3. Sea bass appears to regulate the level of ingested energy, whether this comes from a complete granulated diet, a complete encapsulated diet, or encapsulated macronutrients, one of which must necessarily be fat. Thus, oropharyngeal detection of the food organoleptic qualities is not required to evaluate its energy content, this being the first demonstration for the existence of an exclusively post-ingestive control on ingested energy.
4. Sea bass, a typically carnivorous species, seems to discriminate and regulate the levels of protein intake, whether it is by selecting from two macronutrients (protein and fat or protein and carbohydrates) or from all three encapsulated macronutrients. To do that, sea bass must learn to associate the color of the protein capsule with some of its post-ingestive effects.
5. Under our experimental conditions, which involve short-lasting meals and delayed nutrient release into the digestive system, there might be some intraprandial control of energy and macronutrient intake; however, most of this control would be exerted through interprandial compensation, using for that purpose a conjunction of information, acquired during the present and past history of the individual, about the characteristics of a given foodstuff and the nutritional states of the animal.
6. Oral administration of CCK inside gelatin capsules induces a dose-dependent food intake reduction, inhibiting to the same extend the intake of all macronutrients, that is, the effect of CCK does not appear to be selective for any macronutrient. The effects of CCK on food intake are mediated by activation of CCK receptors, since they are totally blocked by its antagonist proglumide.

7. Oral administration of the indolamines serotonin and melatonin inside gelatin capsules, results in a rapid elevation of their plasma concentrations, inducing a dose-dependent food intake inhibition, that is accompanied by changes in the proportions of macronutrients selected. Serotonin increases protein intake, whereas in the case of melatonin it is the fat percentage that is increased. This is the first time that a chemical mediator has been reported to modify macronutrient selection in fish.
8. Sea bass tolerates fairly well a gradual transfer from seawater (25‰) to fresh water (0‰), however, its total food intake significantly drops, with protein selection percentages increasing at the expense of carbohydrates. Given the existence of commercial sea bass cultures in brackish and even fresh waters, the diets elaborated for these fish should be modified keeping this information in mind.

General conclusion

The existence of macronutrient selection mediated by associative learning, and at least partially induced by the selective effects of certain chemical mediators, is the starting point for further studies that will go more deeply into this aspect of intake regulation, a topic that, in spite of its scientific implications and many aquacultural applications, has been traditionally forgotten in fish.

Bibliografía

- Ackroff, K., Vigorito, M. y Sclafani, A., 1990. Fat appetite in rats: the response of infant and adult rats to nutritive and nonnutritive oil emulsions. *Appetite*, 15, 171-188.
- Adams, L.D., Gong, W., Dall Vechia, S., Hunter, R.G. y Kuhar, M.J., 1999. CART: from gene to function. *Brain Research*, 848, 137-140.
- Adron, J.W., Grant, P.T. y Cowey, C.B., 1973. A system for the quantitative study of the learning capacity of rainbow trout and its application to the study of food preferences and behaviour. *Journal of Fish Biology*, 5, 625-636.
- Ahima, R.S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E. y Flier, J.S., 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, 382, 250-252.
- Ahima, R.S., Dushay, J., Flier, S.N., Prabakaran, D. y Flier, J.S., 1997. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 99, 391-395.
- Aiston, S. y Aglus, L., 1999. Leptin enhances glycogen storage in hepatocytes by inhibition of phosphorylase and exerts an addictive effect with insulin. *Diabetes*, 48, 15-20.
- Akabayashi, A., Levin, N., Paez, X., Alexander, J.T. y Leibowitz, S.F., 1994a. Hypothalamic neuropeptide Y and its gene expression: relation to light dark cycle and circulating corticosterone. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 5, 210-218.
- Akabayashi, A., Koenig, J.I., Watanabe, Y., Alexander, J.T. y Leibowitz, S.F., 1994b. Galanin containing neurons in the paraventricular nucleus: a neurochemical marker for fat ingestion and body weight gain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.*, 91, 10375-10379.
- Akabayashi, A., Zaia, C.T., Koenig, J.I., Gabriel, S.M., Y., Silva, I. y Leibowitz, S.F., 1994c. Diurnal rhythm of galanin-like immunoreactivity in the paraventricular and suprachiasmatic nuclei and other hypothalamic areas. *Peptides*, 15, 1437-1444.
- Alanärä, A., 1992a. Demand feeding as a self-regulating feeding system for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in net-pens. *Aquaculture*, 108, 347-356.
- Alanärä, A., 1992b. The effect of time-restricted demand feeding on feeding activity, growth, and feed conversion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 108, 357-368.
- Alanärä, A., 1994. The effect of temperature, dietary energy content and reward level on the demand feeding activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 126, 349-359.
- Alanärä, A., 1996. The use of self-feeders in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) production. *Aquaculture*, 195, 1-20.
- Alanärä, A. y 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.
- Alanärä, A. y Brännäs, E., 1996. Dominance in demand-feeding behaviour in Arctic charr and rainbow trout, the effect of stocking density. *Journal of Fish Biology*, 48, 242-254.
- Alanärä, A. y Brännäs, E., 1997. Diurnal and nocturnal feeding activity in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54, 2894-2900.

- Alanärä, A., Burns, M.D. y Metcalfe, N.B., 2001. Intraspecific resource partitioning in brown trout: the temporal distribution of foraging is determined by social rank. *Journal of Animal Ecology*, 70, 980-986.
- Alava, V.R., 1998. Effect of salinity, dietary lipid source and level on growth of milkfish (*Chanos chanos*) fry. *Aquaculture*, 167, 229-236.
- Aldegunde, M., Garcia, J., Soengas, J. L. y Rozas, G., 1998. Uptake of tryptophan into brain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Zoology*, 282, 285-289.
- Aldegunde, M., Soengas, J. L. y Rozas, G., 2000. Acute effects of Ltryptophan on tryptophan hydroxylation rate in brain regions (hypothalamus and medulla) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Zoology*, 286, 131-135.
- Aldman, G., Grove, D.J. y Holmgren, S., 1992. Duodenal acidification and intra-arterial injection of CCK8 increase gallbladder motility in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 86, 20-25.
- Ali, M., Cui, Y., Zhu, X. y Wootton, R.J., 2001. Dynamics of appetite in three fish species (*Gasterosteus aculeatus*, *Phoxinus phoxinus* and *Carassius auratus gibelio*) after feed deprivation. *Aquaculture Research*, 32, 443-450.
- Almazán Rueda, P., 2004. Towards assessment of welfare in African catfish, *Clarias gariepinus*: the first step. Tesis Doctoral. Wageningen University, The Nederland.
- Amundsen, P.-A., Bergersen, R., Huru, H. y Heggberget, T.G., 1999. Diel feeding rhythms and daily food consumption of juvenile Atlantic salmon in the River Alta, northern Norway. *Journal of Fish Biology*, 54, 58-71.
- Amundsen, P.-A., Gabler, H.-M., Herfindal, T. y Riise, L.S., 2000. Feeding chronology of Atlantic salmon parr in subarctic rivers: consistency of nocturnal feeding. *Journal of Fish Biology*, 56, 676-686.
- Anand, B.K. y Brobeck, J.R., 1951. Localization of a 'feeding center' in the hypothalamus of the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 77, 323-324.
- Anastasi, A., Erspamer, V. y Bucci, M., 1971. Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians, *Bombina* and *Alytes*. *Experientia*, 27, 166-167.
- Anderson G.M., Stevenson, J.M. y Cohen, D.J., 1987. Steady-state model for plasma free and platelet serotonin in man. *Life Sciences*, 41, 1777-1785.
- Anderson, P.H., Kristensen, K., Pederson, S.B., Hjollund, E., Schmitz, O., Richelsen, B., 1997. Effect of long-term total fasting and insulin on *ob* gene expression in obese patients. *European Journal of Endocrinology*, 137, 229-233.
- Ando, H., Hasegawa, M., Ando, J. y Urano, A., 1999. Expression of salmon corticotropin-releasing hormone precursor gene in the preoptic nucleus in stressed rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, 113, 87-95.
- Angers, K., Haddad, N., Selmaoui, B. y Thibault, L., 2003. Effect of melatonin on total food intake and macronutrient choice in rats. *Physiology & Behavior*, 80, 9-18.
- Anglade, I., Wang, Y., Jensen, J., Tramu, G., Kah, O. y Conlon, J.M., 1994. Characterization of trout galanin and its distribution in trout brain and pituitary. *The Journal of Comparative Neurology*, 350, 63-74.

- Anthouard, M., Kentouri, M. y Divanach, P., 1993. An analysis of feeding activities of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Moronidae), raised under different lighting conditions. *Ichthyophysiological Acta*, 16, 59-73.
- Antin, J., Gibbs, J. y Smith, G.P., 1977. Intestinal satiety requires pregastric food stimulation. *Physiology & Behavior*, 18, 421-425.
- Antoni, F.A., 1986. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocrine Reviews*, 7, 351-378.
- Aranda, A., Madrid, J.A., Zamora, S. y Sánchez-Vázquez, F.J., 1999a. Synchronizing effect of photoperiod on the dual phasing of demand-feeding rhythms in sea bass. *Biological Rhythm Research*, 30, 392-406.
- Aranda, A., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 1999b. Influence of water temperature on demand-feeding rhythms in sea bass. *Journal of Fish Biology*, 55, 1029-1039.
- Aranda, A., Sánchez-Vázquez, F.J., Zamora, S. y Madrid, J.A., 2000. Self-design of fish diets by means of self-feeders: validation of procedures. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 56, 155-166.
- Aranda, A., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2001. Effect of short-term fasting on macronutrient self-selection in sea bass. *Physiology & Behavior*, 73, 105-109.
- Arends, R.J., Vermeer, H., Marents, G.J.M., Leunissen, J.A.M., Bonga, S.E.W. y Flik, G., 1998. Cloning and expression of two proopiomelanocortin mRNAs in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Molecular and Cellular Endocrinology*, 143, 23-31.
- Arnensen, A.M., Jørgensen, E.H. y Jobling, M., 1993a. Feed intake, growth and osmoregulation in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.) transferred from freshwater to saltwater at 8°C during summer and winter. *Fish Physiology and Biochemistry*, 12, 281-292.
- Arunachalam, S. y Reddy, S.R., 1979. Food intake, growth, food conversion, and body composition of catfish exposed to different salinities. *Aquaculture*, 16, 163-171.
- Assem, H. y Hanke, W., 1981. Cortisol and osmotic adjustment of the euryhaline teleost, *Sarotherodon mossambicus*. *General and Comparative Endocrinology*, 43, 370-380.
- Auperin, B., Rentier-Delrue, F., Martial, J. A. y Prunet, P., 1995. Regulation of gill prolactin receptors in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) after a change in salinity or hypophysectomy. *The Journal of Endocrinology*, 145, 213-220.
- Avella, M., Young, G., Prunet, P. y Schreck, C.B., 1990. Plasma prolactin and cortisol concentrations during salinity challenges of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) at smolt and post-smolt stages. *Aquaculture*, 91, 359-372.
- Avery, D.D. y Livosky, M., 1986. Peripheral injections of bombesin and cholecystokinin affect dietary self-selection in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 25, 7-11.
- Azzaydi, M., Madrid, J.A., Zamora, S., Sánchez-Vázquez, F.J. y 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.
- Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J.-P., Bortoluzzi, M.-N., Moizo,

- L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Marchand-Brustel, Y.L. y Lewin, M.J.M., 1998. The stomach is a source of leptin. *Nature*, 394, 790-793.
- Bai-Han, L. y Rowland, N.E., 1996. Peripherally and centrally administered bombesin induce Fos-like immunoreactivity in different brain regions in rat. *Regulatory Peptides*, 62, 167-172.
- Baile, C.A. y Della-Fera, M.A., 1985. Central nervous system cholecystokinin and the control of feeding. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 448, 424-430.
- Baile, C.A., McLaughlin, C.L. y Della-Fera, M.A., 1986. Role of cholecystokinin and opioid peptides in control of food intake. *Physiological Reviews*, 66, 172-234.
- Baker, B.I., 1993. The role of melanin-concentrating hormone in colour change. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 680, 279-289.
- Baker, B., Booth, D.A., Duggan, J.P. y Gibson, E.L., 1987. Protein appetite demonstrated: learned specificity of protein- cue preference to protein need in adult rats. *Nutrition Research*, 7, 481-486.
- Baker, D.M., Larsen, D.A., Swanson, P. y Dickhoff, W.W., 2000. Long-term peripheral treatment of immature coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) with human leptin has no clear physiologic effect. *General and Comparative Endocrinology*, 118, 134-138.
- Balasubramaniam, A., 1997. Neuropeptide Y family of hormones: receptor subtypes and antagonists. *Peptides*, 18, 445-457.
- Balm, P.H.M., Lambert, J.D.G. y Wendelaar Bonga, S.E., 1989. Corticosteroid biosynthesis in the interrenal cells of the teleost fish *Oreochromis mossambicus*. *General and Comparative Endocrinology*, 76, 53-62.
- Balm, P.H.M., Haenen, H.E.M.G. y Wendelaar Bonga, S.E., 1995. Regulation of interrenal function in freshwater and sea water adapted tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 14, 37-47.
- Banks, W.A., Kastin, A.J., Huang, W., Jaspan, J.B. y Maness, L.M., 1996. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*, 17, 305-311.
- Baños, N., Moon, T.W., Castejón, C., Gutiérrez, J. y Navarro, I., 1997. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) binding in fish red muscle: regulation by high insulin levels. *Regulatory Peptides*, 68, 181-187.
- Baños, N., Baró, J., Castejón, C., Navarro, I. y Gutiérrez, J., 1998. Influence of high-carbohydrate enriched diets on plasma insulin levels and insulin and IGF-I receptors in trout. *Regulatory Peptides*, 77, 55-62.
- Barash, I.A., Cheung, C.C., Weigle, D.S., Ren, H., Kabigting, E.B., Kuijper, J.L., Clifton, D.K. y Steiner, R.A., 1996. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology*, 137, 3144-3147.
- Barassin, S., Raison, S., Saboureau, M., Bienvenu, C., Maître, M., Malan, A. y Pévet, P., 2002. Circadian tryptophan hydroxylase levels and serotonin release in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *European Journal of Neuroscience*, 15, 833-840.
- Barcellos, L.J.G., Nicolaiewsky, S., de Souza, S.M.G. y Luhier, F., 1999. Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. *Aquaculture Research*, 30, 437-444.

- Barnabé, G., 1980. Exposé synoptique des données biologiques sur le loup ou bar, *Dicentrarchus labrax* (Linné, 1758). *Synopsis FAO sur les Pêches*, 126, 70 pp.
- Barnabé, G., 1990. Rearing bass and gilthead bream. En: *Aquaculture*, Vol. 2. Barnabé, G. (Ed.). Ellis Horwood, New York. pp. 647-687.
- Barnabé, G., 1991. *Acuicultura*. Vol. II. Omega, Barcelona.
- Barrachina, M.D., Martínez, V., Wang, L., Wei, J.Y. y Taché, Y., 1997. Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 94, 10455-10460.
- Barrenechea, M.A., López, J. y Martínez, A., 1994. Regulatory peptides in gastric endocrine cells of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: general distribution and colocalizations. *Tissue & Cell*, 26, 309-321.
- Bartness, T.J. y Rowland, N., 1983. Dietary self-selection in normal and diabetic rats after gastric loads of pure macronutrients. *Physiology & Behavior*, 31, 546-554.
- Bartness, T.J. y Wade, G.N., 1985a. Body weight, food intake and energy regulation in exercising and melatonin-treated Siberian Hamsters. *Physiology & Behavior*, 35, 805-808.
- Bartness, T.J. y Wade, G.N., 1985b. Photoperiodic control of seasonal body weight cycles in hamsters. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 9, 599-612.
- Barton, B.A. y Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effect of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 10, 3-26.
- Bas Peired, C., 2002. El mar Mediterráneo: recursos vivos y explotación. Ariel Ciencia, Barcelona.
- Baskerville-Bridges, B. y Kling, L.J., 2000. Larval culture of Atlantic cod (*Gadus morhua*) at high stocking densities. *Aquaculture*, 181, 61-69.
- Baskin, D.G., Seeley, R.J., Kuijper, J.L., Lok, S., Weigle, D.S., Erickson, J.C., Palmiter, R.D. y Schwartz, M.W., 1998. Increased expression of mRNA for the long form of the leptin receptor in the hypothalamus is associated with leptin hypersensitivity and fasting. *Diabetes*, 47, 538-544.
- Baskin, D.G., Lattemann, D.F., Seeley, R.J., Woods, S.C., Porte Jr., D. y Schwartz, M.W., 1999a. Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Research*, 848, 114-123.
- Baskin, D.G., Breininger, J.F., Bonigut, S. y Miller, M.A., 1999b. Leptin binding in the arcuate nucleus is increased during fasting. *Brain Research*, 828, 154-158.
- Baskin, D.G., Breininger, J.F. y Schwartz, M.W., 1999c. Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes*, 48, 828-833.
- Bayarri, M.J., Madrid, J.A. y Sánchez-Vázquez, F.J., 2002. Influence of light intensity, spectrum and orientation on sea bass plasma and ocular melatonin. *Journal of Pineal Research*, 32, 34-40.
- Beach, M.A., McVean, A., Roberts, M.G., Thorndyke, M.C., 1988. The effects of bombesin on the feeding of fish. *Neuroscience Letters*, 32, 46.
- Beamish, F.W.H. y Tandler, A., 1990. Ambient ammonia, diet and growth in lake trout. *Aquatic toxicology*, 17, 155-156.

- Beck, B., 2001. Quantitative and macronutrient-related regulation of hypothalamic neuropeptide Y, galanin and neurotensin. En: *Neural and Metabolic Control of Macronutrient Intake*. Berthoud, H.-R. y Seeley, R.J. (Eds.). CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 455-464.
- Beck, B., Stricker-Krongrad, A., Burlet, A., Nicolas, J.P. y Burlet, C., 1990. Influence of diet composition on food intake and hypothalamic neuropeptide Y (NPY) in the rat. *Neuropeptides*, 17, 197-203.
- Beck, B., Stricker-Krongrad, A., Burlet, A., Max, J.P., Musse, N., Nicolas, J.P. y Burlet, C., 1994. Macronutrient type independently of energy intake modulates hypothalamic neuropeptide Y in Long-Evans rats. *Brain Research Bulletin*, 34, 85-91.
- Beglinger, C. 1994. Effect of cholecystokinin on gastric motility in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 713, 219-225.
- Bégout Anras, M.L., 1995. Demand-feeding behaviour of sea bass kept in ponds: diel and seasonal patterns, and influences of environmental factors. *Aquaculture International*, 3, 186-195.
- Bégout Anras, M.L., Beauchaud, M., Juell, J.E., Covès, D. & Lagardère, J.-P., 2001. Environmental factors and feed intake: rearing systems. En: *Food Intake in Fish*. Houlihan, D., Boujard T. and Jobling, M. (Eds.), Blackwell Science, Cornwall, pp. 189-215.
- Bermudez, F.F., Forbes, J.M. y Injidi, M.H., 1983. Involvement of melatonin and thyroid hormones in the control of sleep, food intake and energy metabolism in the domestic fowl. *Journal of Physiology*, 337, 19-27.
- Bernier, N.J. y Peter, R.E., 2001a. The hypothalamic-pituitary-interrenal axis and the control of food intake in teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 129, 639-644.
- Bernier, N.J. y Peter, R.E., 2001b. Appetite-suppressing effects of urotensin I and corticotropin-releasing hormone in goldfish (*Carassius auratus*). *Neuroendocrinology*, 73, 248-260.
- Bernier, N.J., Lin, X. y Peter, R.E., 1999. Differential expression of corticotropin-releasing factor (CRF) and urotensin I precursor genes and evidence of CRF mRNA regulation by cortisol in goldfish brain. *General and Comparative Endocrinology*, 116, 461-477.
- Bernier, N.J., Bedard, N. y Peter, R.E., 2004. Effects of cortisol on food intake, growth, and forebrain neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor gene expression in goldfish. *General and Comparative Endocrinology*, 135, 230-240.
- Berthoud, H.R., 2000. An overview of neural pathways and networks involved in the control of food intake and selection. En: *Neural and Metabolic Control of Macronutrient Intake*. Berthoud, H.-R. y Seeley, R.J. (Eds.). CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 361-387.
- Berthoud, H.R. y Seeley, R.J., 2000. Neural and metabolic control of macronutrient intake. Berthoud, H.R. y Seeley, R.J. (Eds.), CRC press, Boca Raton.
- Billington, C.J., Briggs, J.E., Grace, M. y Levine, A.S., 1991. Effects of intracerebroventricular injection of NPY on energy metabolism. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 260, R321-R327.
- Bittencourt, J.C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J.L., Vale, W. y Sawchenko, P.E., 1992. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an

- immuno- and hybridization histochemical characterization. *The Journal of Comparative Neurology*, 319, 218–245.
- Bjénning, C., Farrell, A.P., Holmgren, S., 1991. Bombesin-like immunoreactivity in skates and the in vitro effect of bombesin on coronary vessels from the longnose skate, *Raja rhina*. *Regulatory Peptides*, 35, 207–219.
- Björnsson, B.T., 1997. The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance. *Fish Physiology and Biochemistry*, 17, 9–24.
- Björnsson, B.T., Thorarensen, H., Hirano, T., Ogasawara, T., Kristinsson, J.B., 1989. Photoperiod and temperature affect plasma growth hormone levels, growth, condition factor and hypoosmoregulatory ability of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) during parr-smolt transformation. *Aquaculture*, 82, 77–91.
- Björnsson, B.T., Stefansson, S.O. y Hansen, T., 1995. Photoperiod regulation of plasma growth hormone levels during parr-smolt transformation of Atlantic salmon: implications for hypoosmoregulatory ability and growth. *General and Comparative Endocrinology*, 100, 73–82.
- Björnsson, B.Th., Stefansson, G.V., Berge, Å.I., Hansen, T., Stefansson, S.O., 1998. Circulating growth hormone levels in Atlantic salmon smolts following seawater transfer: effects of photoperiod regime, salinity, duration of exposure and season. *Aquaculture*, 168, 121–137.
- Blanco Cachafeiro, M.C., 1995. La trucha. Cría industrial. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Blasco, J., Fernández-Borrás, J., Marimón, I. y Requena, A., 1996. Plasma glucose kinetics and tissue uptake in brown trout in vivo: effect of an intravascular glucose load. *Journal of Comparative Physiology*, 165B, 534–541.
- Blasco, J., Marimón, I., Viaplana, I. y Fernández-Borrás, J., 2001. Fate of plasma glucose in tissues of brown trout in vivo: effects of fasting and glucose loading. *Fish Physiology and Biochemistry*, 24, 247–258.
- Blevins, J.E., Stanley, G. y Reidelberger, R.D., 2000. Brain regions where cholecystokinin suppresses feeding in rats. *Brain Research*, 860, 1–10.
- Blundell, J.E., 1977. Is there a role for serotonin (5-hydroxytryptamine) in feeding? *International Journal of Obesity*, 1, 15.
- Boadle-Biber, M. C., 1993. Regulation of serotonin synthesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 60, 1–15.
- Boden, G., Chen, X., Mozzoli, M. y Ryan, I., 1996. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81, 3419–3423.
- Bœuf, G. y Gaignon, J.L., 1989. Effects of rearing conditions on growth and thyroid hormones during smelting of Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquaculture*, 82, 29–38.
- Bœuf, G. y Le Bail, P.-Y., 1999. Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture*, 177, 129–152.
- Bœuf, G. y Payan, P., 2001. How should salinity influence fish growth? *Comparative Biochemistry and Physiology*, 130C, 411–423.
- Bœuf, G., Boujard, T. y Person-Le Ruyet, J., 1999. Control of the somatic growth in turbot. *Journal of Fish Biology* (Supp. A), 55, 128–147.

- Booth, D.A., 1977. Appetite and satiety as metabolic expectancies. En: *Food intake and chemical senses*. Katsubi, Y., Sato, M., Takagi, S.F. y Oomura, Y. (Eds.). University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 317-330.
- Booth, D.A., 1985. Food-conditioned eating preferences and aversions with interoceptive elements: conditioned appetites and satieties. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 443, 22-41.
- Booth, D.A., 1987. How to measure learned control of food or water intake. En: *Feeding and drinking*. Toates, F.M. y Rowland, N.E. (Eds.). Elsevier, Amsterdam, 111-149.
- Booth, D. y Baker, B.J., 1990. DL-Fenfluramine challenge to nutrient-specific textural preference conditioned by concurrent presentation of two diets. *Behavioral Neuroscience*, 104, 226-229.
- Booth, D. y Thibault, L., 2000. Macronutrient-specific hungers and satieties and their neural bases, learnt from pre- and post ingestional Effects of Eating particular foodstuffs. En: *Neural and metabolic control of macronutrient intake*. Berthoud, H.R. y Seeley, R.J. (Eds.). CRC press, Boca Raton, pp. 61-91.
- Borski, R.J., Yoshikawa, J., Madsen, S., Nishioka, R.S., Zabetian, C., Bern, H.A. y Grau, E.G., 1994. Effects of environmental salinity on pituitary growth hormone content and cell activity in the euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *General and Comparative Endocrinology*, 95, 483-494.
- Boujard, T., 1995. Diel rhythms of feeding activity in the European catfish, *Silurus glanis*. *Physiology & Behavior*, 58, 641-645.
- Boujard, T. y Leatherland, J.F., 1992a. Circadian pattern of hepatosomatic index, liver glycogen and lipid content, plasma non-esterified fatty acid, glucose, T₃, T₄, growth hormone and cortisol concentrations in *Oncorhynchus mykiss* held under different photoperiod regimes and fed using demand-feeders. *Fish Physiology and Biochemistry*, 10, 111-122.
- Boujard, T. y Leatherland J.F., 1992b. Circadian rhythms and feeding time in fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 35, 109-131.
- Boujard, T. y Leatherland, J.F., 1992c. Demand-feeding behaviour and diel pattern of feeding activity in *Oncorhynchus mykiss* held under different photoperiod regimes. *Journal of Fish Biology*, 40, 535-544.
- Boujard, T. y Médale, F., 1994. Regulation of voluntary feed intake in juvenile rainbow trout fed by hand or by self-feeders with diets containing two different protein/energy ratios. *Aquatic Living Resource*, 7, 211-215.
- Boujard, T. y Luquet, P., 1996. Rythmes alimentaires et alimentation chez les siluroidei. En: *The biology of catfishes*. Legendre, M., Proteau, J.-P. (eds). *Aquatic Living Resources*, 9, 113-120.
- Boujard, T., Keith, P. y Luquet, P., 1990. Diel cycle in *Hoplosternum littorale* (Teleostei): evidence for synchronization of locomotor, air breathing and feeding activity by circadian alternation of light and dark. *Journal of Fish Biology*, 36, 133-140.
- Boujard, T., Dugy, X., Genner, D., Gosset, C. y Grig, G., 1992. Description of a modular, low cost, eater meter for the study of feeding behavior and food-preferences in fish. *Physiology & Behavior*, 52, 1101-1106.

- Boujard, T., Brett, S., Lin, L. y Leatherland, J.F., 1993. Effect of restricted access to demand feeders on diurnal pattern of liver composition, plasma metabolites and hormone levels in *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiology and Biochemistry*, **11**, 337-344.
- Boujard, T., Gélinau, A., Corraze, G., 1995. Time of a single daily meal influences growth performance in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, **26**, 341-349.
- Boujard, T., Jourdan, M., Kentouri, M. y 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.
- Boulant, J., Mathieu, S., D'Amato, M., Abergel, A., Dapoigny, M. y Bommelaer, G., 1997. Cholecystokinin in transient lower oesophageal sphincter relaxation due to gastric distension in humans. *Gut*, **40**, 575-581.
- Bouloumie, A., Drexler, H.C., Lafontan, M. y Busse, R., 1998. Leptin, the product of *Ob* gene, promotes angiogenesis. *Circulation Research*, **83**, 1059-1066.
- Boutellier, S., Lutz, T.A., Volkert, M. y Scharrer, E., 1999. 2-Mercaptoacetate, an inhibitor of fatty acid oxidation, decreases the membrane potential in rat liver in vivo. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, **277**, R301-R305.
- Bovetto, S., Rouillard, C. y Richard, D., 1996. Role of CRH in the effects of 5-HT-receptor agonists on food intake and metabolic rate. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, **271**, R1231-R1238.
- Boyd, C.E. y Teichert-Coddington, D., 1992. Relationship between wind speed and reaeration in small aquaculture ponds. *Aquacultural Engineering*, **11**, 121-131.
- Boyd, K.A., O'donovan, D.G., Doran, S., Wishart, J., Chapman, I.M., Horowitz, M. y Feinle, C., 2003. High-fat diet effects on gut motility, hormone, and appetite responses to duodenal lipid in healthy men. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, **284**, G188-G196.
- Bradbury, M.J., McBurnie, M.I., Denton, D.A., Lee, K.F. y Vale, W.W., 2000. Modulation of urocortin-induced hypophagia and weight loss by corticotropin-releasing factor receptor 1 deficiency in mice. *Endocrinology*, **141**, 2715-2724.
- Brännäs, E. y Alanärä, A., 1994. Effect of reward level on individual variability in demand feeding activity and growth rate in Arctic charr and rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, **45**, 423-434.
- Bray, G.A., 1993. The nutrient balance hypothesis: peptides, sympathetic activity, and food intake. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **679**, 223-241.
- Brett, J.R., 1971. Energetic responses of salmo to temperatures. A study of some thermal relations in the physiology and freshwater ecology of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *American Zoologist*, **11**, 99-113.
- Brett, J.R., 1979. Environmental factors and growth. En: *Fish Physiology*, Vol. 8, Bioenergetics and Growth. Hoar, W.S., Randall, D.J. and Brett, J.R. (Eds.) Academic Press, New York, pp. 599-675.
- Broberger, C., 1999. Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript CART neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-con-

- centrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. *Brain Research*, 848, 101-113.
- Broberger, C. y Hökfelt, T., 2001. Hypothalamic and vagal neuropeptide circuitries regulating food intake. *Physiology and Behavior*, 74, 669-682.
- Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M. y Hökfelt, T., 1998. The neuropeptide Y agouti gene-related protein AGRP brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 95, 15043-15048.
- Brooks, A.I., Standifer, K.M., Cheng, J., Ciszewska, G. y Pasternak, G.W., 1994. Opioid binding in giant toad and goldfish brain. *Receptor*, 4, 55-62.
- Brown, K.S., Gentry, R.M. y Rowland, N.E., 1998. Central injection in rats of alpha-melanocyte-stimulating hormone analog: effects on food intake and brain Fos. *Regulatory Peptides*, 78, 89-94.
- Brown, J.A., Moore, W.M. y Quabius, E.S., 2001. Physiological effects of saline waters on zander. *Journal of Fish Biology*, 59, 1544-1555.
- Bubenik, G.A., 1980. Localization of melatonin in the digestive tract of the rat. Effect of maturation, diurnal variation, melatonin treatment and pinealectomy. *Hormone Research*, 12, 313-323.
- Bubenik, G.A., 1986. The effect of serotonin, N-acetylserotonin and melatonin on spontaneous contractions of isolated rat intestine. *Journal of Pineal Research*, 3, 41-54.
- Bubenik, G.A. y Dhanvantari, S., 1989. Influence of serotonin and melatonin on some parameters of gastrointestinal activity. *Journal of Pineal Research*, 7, 333-344.
- Bubenik, G.A. y Pang, S.F., 1994. The role of serotonin and melatonin in gastrointestinal physiology: Ontogeny, regulation and food intake, and mutual serotonin-melatonin feedback. *Journal of Pineal Research*, 16, 91-99.
- Bubenik, G.A. y Brown, G.M., 1997. Pinealectomy reduces melatonin levels in the serum but not in the gastrointestinal tract of rats. *Biological Signal*, 6, 40-44.
- Bubenik, G.A. y Pang, S.F., 1997. Melatonin levels in the gastrointestinal tissues of fish, amphibians and a reptile. *General and Comparative Endocrinology*, 106, 415-419.
- Bubenik, G.A., Ball, R.O. y Pang, S.F., 1992. The effect of food deprivation on brain and gastrointestinal tissue levels of tryptophan, serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, and melatonin. *Journal of Pineal Research*, 12, 7-16.
- Bubenik, G.A., Niles, L.P., Pang, S.F., Pentney, P.J., 1993. Diurnal variation and binding characteristics of melatonin in the mouse brain and gastrointestinal tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 104C, 221-224.
- Bubenik, G.A., Pang, S.F., Hacker, R.R. y Smith, P.S., 1996. Melatonin concentrations in serum and their relationship to the intake and passage of food. *Journal of Pineal Research*, 21, 251-256.
- Bubenik, G.A., Ayles, H.L., Friendship, R.M., Brown, G.M. y Ball, R.O., 1998. Relationship between melatonin levels in plasma and gastrointestinal tissues and the incidence and severity of gastric ulcers in pigs. *Journal of Pineal Research*, 24, 62-66.
- Bubenik, G.A., Hacker, R.R., Brown, G.M., Bartos, L., 1999. Melatonin concentrations in the

- luminal fluid, mucosa, and muscularis of the bovine and porcine gastrointestinal tract. *Journal of Pineal Research*, 29, 56-63.
- Buchan, A.M., 1999. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut III. Endocrine cell recognition of luminal nutrients. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 277, G1103-G1107.
- Buckel, J.A., Steinberg, N.D. y Conover, D.O., 1995. Effects of temperature, salinity, and fish size on growth and consumption of juvenile bluefish. *Journal of Fish Biology*, 47, 696-706.
- Buentello, J.A., Gatlin III, D.M. y Neill, W.H., 2000. Effects of water temperature and dissolved oxygen on daily feed consumption, feed utilization and growth of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 182, 339-352.
- Burel, C., Le-Ruyet, J.P., Gaumet, F., Le Roux, A., Sévère, A. y Boeuf, G., 1996. Effects of temperature on growth and metabolism in juvenile turbot. *Journal of Fish Biology*, 49, 678-692.
- Burel, C., Robin, J. y Boujard, T., 1997. Can turbot, *Psetta maxima*, be fed with self-feeders? *Aquatic Living Resources*, 10, 381-384.
- Burgevin, M.C., Loquet, I., Quarteronet, D. y Habert-Ortoli, E., 1995. Cloning, pharmacological characterization, and anatomical distribution of a rat cDNA encoding for a galanin receptor. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, 6, 33-41.
- Burggraf, K.K., Willing, A. E. y Koopmans, H. S., 1997. The effects of glucose or lipid infused intravenously or intragastrically on voluntary food intake in the rat. *Physiology & Behavior*, 61, 787-793.
- Burka, J.F., Blair, R.J.M. y Hogan, J.E., 1988. Characterization of the muscarinic and serotonergic receptors of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 67, 477- 482.
- Burton-Freeman, B. y Schneeman, B.O., 1996. Lipids infused into the duodenum of rats at varying rates influences food intake and body weight gain. *Journal of Nutrition*, 126, 2934-2939.
- Burton-Freeman, B., Gietzen, D.W. y Schneeman, B.O., 1997. Meal pattern analysis to investigate the satiating potential of fat, carbohydrate, and protein in rats. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 273, R1916-R1922.
- Burton-Freeman, B. y Gietzen, D.W. y Schneeman, B.O., 1999. Cholecystokinin and serotonin receptors in the regulation of fat-induced satiety in rats. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 276, R429-R434.
- Cahill, G.M. y Besharse, J.C., 1990. Circadian regulation of melatonin in the retina of *Xenopus laevis*: limitation by serotonin availability. *Journal of Neurochemistry*, 54, 716-719.
- Calapai, G., Corica, F., Corsonello, A., Sautebin, L., Di Rosa, M., Campo, G.M., Buemi, M., Mauro, V.N. y Caputi, A.P., 1999. Leptin increases serotonin turnover by inhibition of brain nitric oxide synthesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 104, 975-982.
- Campfield, L.A., Smith, F.J., Guisez, Y., Devos, R. y Burn, P., 1995. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, 269, 546-549.

- Cao, Q.-P., Duguay, S., Plisetskaya, E., Steiner, D.F. y Chan, S.J., 1990. Nucleotide sequence and growth hormone-regulated expression of salmon insulin-like growth factor I RNA. *Molecular Endocrinology*, 3, 2005-2010.
- Capilla, E., Médale, F., Navarro, I., Panseerat, S., Vachot, C., Kaushik, S. y Gutiérrez, J., 2003. Muscle insulin binding and plasma levels in relation to liver glucokinase activity, glucose metabolism and dietary carbohydrates in rainbow trout. *Regulatory Peptides*, 110, 123-132.
- Carlson, N.R., 1998. Ingestive Behavior: Eating. En: *Physiology and Behavior*. Allyn and Bacon, Boston. pp. 376-408.
- Castonguay, T.W. y Brown, L.M., 2000. Effects of food deprivation, starvation, and exercise on dietary selection in the rat. En: *Neural and metabolic control of macronutrient intake*. Berthoud, H.-R. y Seeley, R.J. (Eds.). CRC Press, Boca Raton, pp. 219-232.
- Cerdá-Reverter, J.M., Zanuy, S., Carrillo, M. y Kah, O., 1996. Development of enzyme immunoassays for 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and L-thyroxine: time course studies on the effect of food deprivation on plasma thyroid hormones in two marine teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). *General and Comparative Endocrinology*, 103, 290-300.
- Cerdá-Reverter, J.M., Anglade, I., Martínez-Rodríguez, G., Mazurais, D., Munzo-Cueto, J.M., Carillo, M., Kah, O. y Zuany, S., 2000. Characterization of neuropeptide Y expression in the brain of a perciform fish the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 19, 197-210.
- Cerdá-Reverter, J.M., Schiöth, H.B. y Peter, R.E., 2003. The central melanocortin system regulates food intake in goldfish. *Regulatory Peptides*, 115, 101-113.
- Chang, C.F. y Lin, S.J., 1995. Immersion in bovine insulin stimulates growth in tilapia. *Reproduction, Nutrition, Development*, 35, 95-103.
- Chaouloff, F., 1993. Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. *Brain Research Reviews*, 18, 1-32.
- Chapelot, D., Marmonier, C., Thomas, F. y Hanotin, C., 2000. Modalities of the food intake-reducing effect of sibutramine in humans. *Physiology & Behavior*, 68, 299-308.
- Chapman, I.M., Goble, E.A., Wittert, G.A., Morley, J.E. y Horowitz, M., 1998. Effect of intravenous glucose and euglycemic insulin infusions on short-term appetite and food intake. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 274, R596-R603.
- Chehab, F.F., Lim, M.E. y Lu, R., 1996. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nature Genetics*, 12, 318-320.
- Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L.A., Wolf, E.A., Weng, X., Ellis, S.J., Lakey, N.D., Cullpepper, J., Moore, K.J., Breitbart, R.E., Duyk, G.M., Tepper, R.I. y Morgenstern, J.P., 1996. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in *db/db* mice. *Cell*, 84, 491-495.
- Chervinski, J., 1974. Sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linne) and (Pisces, Serranidae) a 'police-fish' in freshwater ponds and its adaptability to various saline conditions. *Bamidgeh*, 26, 110-113.

- Cheung, C.C., Clifton, D.K. y Steiner, R.A., 1997. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology*, 138, 4489-4492.
- Chik, C.L., Ho, A.K. y Brown, G.M., 1986. Effect of food restriction on circadian rhythms of circulating tryptophan and serotonin in rats. *Journal of Neural Transmission*, 66, 261-269.
- Choi, Y.-H. y Anderson, G.H., 2001. An interaction between hypothalamic glucagon-like peptide-1 and macronutrient composition determines food intake in rats. *Journal of Nutrition*, 131, 1819-1825.
- Christiansen, J.S. y Jobling, M., 1990. The behaviour and the relationship between food intake and growth in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L., subjected to sustained exercise. *Canadian Journal of Zoology*, 68, 2185-2191.
- Chuang, J.I. y Lin, M.T., 1994. Pharmacological effects of melatonin treatment on both locomotor activity and brain serotonin release in rats. *Journal of Pineal Research*, 17, 11-16.
- Cohen, B., Novick, D., Rubenstein, M., 1996. Modulation of insuline activities by leptin. *Science*, 274, 1185-1188.
- Cole, J.L., Leventhal, L., Pasternak, G.W., Bowen, W.D. y Bodnar, R.J., 1995. Reductions in body weight following chronic central opioid receptor subtype antagonists during development of dietary obesity in rats. *Brain Research*, 678, 168-176.
- Colin, D.A., Nonnotte, G., Leray, C. y Nonnotte, L., 1985. Na transport and enzyme activities in the intestine of the freshwater and seawater adapted trout (*Salmo gairdneri* R.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 81A, 695-698.
- Conides, A.J., Parpoura, A.R. y Fotis, G., 1997. Study on the effects of salinity on the fry of the euryhaline species gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 12, 297-303.
- Cook, R.F. y Eales, J.G., 1987. Effects of feeding and photocyclus on diel changes in plasma thyroid hormone levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Experimental Zoology*, 242, 161-169.
- Cook, J.T., Sutterlin, A.M. y McNiven, M.A., 2000. Effect of food deprivation on oxygen consumption and body composition of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 188, 47-63.
- Cooke, H.J., 1986. Neurobiology of the intestinal mucosa. *Gastroenterology*, 90, 1057-1081.
- Cooper, S.J. y Dourish, C.T., 1990. Multiple cholecystokinin (CCK) receptors and CCK-monoamine interactions are instrumental in the control of feeding. *Physiology & Behavior*, 48, 849-857.
- Corp, E.S., McQuade, J., Moran, T.H. y Smith, G.P., 1993. Characterization of type A and type B CCK receptor binding sites in rat vagus nerve. *Brain Research*, 623, 161-166.
- Corp, E.S., Curcio, M., Gibb, J. y Smith, G.P., 1997. The effect of centrally administered CCK-receptor antagonists on food intake in rats. *Physiology and Behavior*, 61, 823-827.
- Costa, A., Poma, A., Martignoni, E., Nappi, G., Ur, E. y Grossman, A., 1997. Stimulation of

- corticotrophin-releasing hormone release by the obese (ob) gene product, leptin, from hypothalamic explants. *Neuroreport*, 8, 1131-1134.
- Couceyro, P., Paquet, M., Koylu, E., Kuhar, M.J. y Smith, Y., 1998. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide immunoreactivity in myenteric plexus neurons of the rat ileum and colocalization with choline acetyltransferase. *Synapse*, 30, 1-8.
- Covasa, M. y Ritter, R.C., 2000. Adaptation to high-fat diet reduces inhibition of gastric emptying by CCK and intestinal oleate. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 278, R166-R170.
- Covasa, M. y Ritter, R.C., 2000. Satiation in response to macronutrient signals from the intestine: mechanisms and implications for macronutrient selection. En: *Neural and Metabolic Control of Macronutrient Intake*. Berthoud, H.-R. y Seeley, R.J. (Eds.). CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 263-278.
- Covasa, M., Marcuson, J.K. y Ritter, R.C., 2001. Diminished satiation in rats exposed to elevated levels of endogenous or exogenous cholecystokinin. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 280, R331-R337.
- Cox, J.E., Tyler, W.J., Randich, A., Kelm, G.R., Bharaj, S.S., Jandacek, R.J. y Meller, S.T., 2000. Suppression of food intake, body weight, and body fat by jejunal fatty acid infusions. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 278, R604-R610.
- Crawley, J. N., 1995. Biological actions of galanin. *Regulatory Peptides*, 59, 1-16.
- Crawley, J. y Corwin, R.L., 1994. Biological actions of cholecystokinin. *Peptides*, 15,731-755.
- Crawley, J.N., Austin, M.C., Fiske, S.M., Martin, B., Consolo, S., Berthold, M., Langel, U., Fisone, G. y Barfai, T., 1990. Activity of centrally administered galanin fragments on stimulation of feeding behavior and on galanin receptor binding in the rat hypothalamus. *The Journal of Neuroscience*, 10, 3695-700.
- Crawley, J.N., Fiske, S.M., Durieux, C., Derrien, M. y Roques, B.P., 1991. Centrally administered cholecystokinin suppresses feeding through a peripheral-type receptor mechanism. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 257, 1076-1080.
- Cross-Mellor, S.K., Kent, W.D.T., Ossenkopp, K.-P. y Kavaliers, M., 1999. Differential effects of lipopolysaccharide and cholecystokinin on sucrose intake and palatability. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 277, R705-R715.
- Currie, P.J. y Coscina, D.V., 1996. Regional differences in neuropeptide Y-induced feeding and energy substrate utilization. *Brain Research*, 737, 238-242.
- Currie, P.J. y Coscina, D.V., 1997. Stimulation of 5-HT(2A/2C) receptors within specific hypothalamic nuclei differentially antagonizes NPY-induced feeding. *Neuroreport*, 8, 3759-3762.
- Currie, P.J. y Coscina, D.V., 1998. 5-Hydroxytryptaminergic receptor agonists: effects on neuropeptide Y potentiation of feeding and respiratory quotient. *Brain Research*, 803, 212-217.

- Currie, P.J., Fletcher, P.J. y Coscina, D.V., 1994. Administration of 8-OH-DPAT into the mid-brain raphe nuclei: effects on medial hypothalamic NE-induced feeding. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 266, R1645-R1651.
- Cusin, I., Zakrzewska, K.E., Boss, O., Mizzin, P., Giacobino, J.-P., Ricquier, D., Jeanrenaud, B. y Rohner-Jeanrenaud, F., 1998. Chronic central leptin infusion enhances insulin-stimulated glucose metabolism and favors the expression of uncoupling proteins. *Diabetes*, 47, 1014-1019.
- D'Alessio, D.A., Kieffer, T.J., Taborsky, G.J. Jr. y Havel, P.J., 2001. Activation of the parasympathetic nervous system is necessary for normal meal-induced insulin secretion in rhesus macaques. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86, 1253-1259.
- Daniels, H.V., Berlinsky, D.L., Hodson, R.G. y Sullivan, C.V., 1996. Effects of stocking density, salinity, and light intensity on growth and survival of Southern flounder *Paralichthys lethostigma* larvae. *Journal of World Aquaculture Society*, 27, 153-159.
- Dark, J., Rayha, L.L., Clarke-Lane, I. y Kimler, V., 1980. Melatonin and lighting condition: absence of long-term effects on food intake and body weight regulation in the albino rat. *Physiology & Behavior*, 25, 855-857.
- Date, Y., Kojima, M., Hosoda, H., Sawaguchi, A., Mondal, M.S., Suganuma, T., Matsukura, S., Kangawa, K. y Nakazato, M., 2000. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*, 141, 4255-4261.
- Date, Y., Nakazato, M., Murakami, N., Kojima, M., Kangawa, K. y Matsukura, S., 2001. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 280, 904-907.
- Davenport, C.J. y Carpio, J., 1982. Taste and tactile recordings from the ramus recurrens facialis innervating flank taste buds in the catfish. *Journal of Comparative Physiology*, 147A, 217-229.
- Davies, L. y Marks, J.L., 1994. Role of hypothalamic neuropeptide Y gene expression in body weight regulation. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 266, R1687-R1691.
- De Boeck, G., Alsop, D. y Wood, C., 2001. Cortisol effects on aerobic and anaerobic metabolism, nitrogen excretion, and whole-body composition in juvenile rainbow trout. *Physiological and Biochemical Zoology*, 74, 858-868.
- de Castro, J.M., 2000. Macronutrient selection in free-feeding humans: evidences for long-term regulation. En: *Neural and Metabolic Control of Macronutrient Intake*. Berthoud, H.-R. y Seeley, R.J. (Eds.). CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 361-387.
- de Lecea, L., Kilduff, T.S., Peyron, C., Gao, X.-B., Foye, P.E., Danielson, P.E., Fukuhara, C., Battenberg, E.L.F., Gautvik, V.T., Bartlett, F.S., Frankel, W.N., van den Pol, A.N., Bloom, F.E., Gautvik, K.M. y Sutcliffe, J.G., 1998. The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 95, 322-327.
- De Pedro, N. y Björnsson, B.T., 2001. Regulation of food intake by neuropeptides and hor-

- mones. En: *Food Intake in Fish*. Houlihan, D., Boujard, T. y Jobling, M. (Eds.). Blackwell Science Ltd., Oxford, pp. 269-296.
- De Pedro, N., Alonso-Gómez, A.L., Gancedo, B., Delgado, M.J. y Alonso-Bedate, M., 1993. Role of corticotropin-releasing factor (CRF) as a food intake regulator in goldfish. *Physiology & Behavior*, 53, 517-520.
- De Pedro, N., Céspedes, M.V., Delgado, M.J. y Alonso-Bedate, M., 1995a. The galanin-induced feeding stimulation is mediated via $\alpha 2$ -adrenergic receptors in goldfish. *Regulatory Peptides*, 57, 77-84.
- De Pedro, N., Delgado, M.J. y Alonso-Bedate, M., 1995b. Central administration of b-endorphin increases food intake in goldfish: pretreatment with the opioid antagonist naloxone. *Regulatory Peptides*, 55, 189-195.
- De Pedro, N., Gancedo, B., Alonso-Gómez, A.L., Delgado, M.J. y Alonso-Bedate, M., 1995c. Alterations in food intake and thyroid tissue content by corticotropin-releasing factor in *Tinca tinca*. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 51, 71-76.
- De Pedro, N., Céspedes, M.V., Delgado, M.J. y Alonso-Bedate, M., 1996. Muopioid receptor is involved in beta-endorphin-induced feeding in goldfish. *Peptides*, 17, 421-424.
- De Pedro, N., Alonso-Gómez, A.L., Gancedo, B., Valenciano, A.I., Delgado, M.J. y Alonso-Bedate, M., 1997. Effect of α -helical-CRF_{p-41} on feeding in goldfish: involvement of cortisol and catecholamines. *Behavioral Neuroscience*, 111, 398-403.
- De Pedro, N., Delgado, M.J., Pinillos, M.L. y Alonso-Bedate, M., 1998a. α_1 -adrenergic and dopaminergic receptors are involved in the anorectic effect of corticotropin-releasing factor in goldfish. *Life Sciences*, 62, 1801-1808.
- De Pedro, N., Pinillos, M.L., Valenciano, A.I., Alonso-Bedate, M., Delgado, M.J., 1998b. Inhibitory effect of serotonin on feeding behavior in goldfish: involvement of CRF. *Peptides*, 19, 505-511.
- De Pedro, N., López-Patiño, M.A., Gujjarro, A.I., Pinillos, M.L., Delgado, M.J. y Alonso-Bedate, M., 2000. NPY receptors and opioidergic system are involved in NPY-induced feeding in goldfish. *Peptides*, 21, 1495-1502.
- Dean, D.B., Whitlow, Z.W. y Borski, R.J., 2003. Glucocorticoid receptor upregulation during seawater adaptation in a euryhaline teleost, the tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *General and Comparative Endocrinology*, 132, 112-118.
- Delgado, M.J., Alonso-Gómez, A.L., Gancedo, B., De Pedro, N., Valenciano, A.I. y Alonso-Bedate, M., 1993. Serotonin N-acetyltransferase (NAT) activity and melatonin levels in the frog retina are not correlated during the seasonal cycle. *General and Comparative Endocrinology*, 92, 143-150.
- Demski, L.S. y Knigge, K.M., 1971. The telencephalon and hypothalamus of the bluegill (*Lepomis macrochirus*): evoked feeding, aggressive and reproductive behavior with representative frontal sections. *The Journal of Comparative Neurology*, 143, 1-16.
- Dendrinis, P. y Thorpe, J.P., 1985. Effects of reduced salinity on growth and body composition in the European bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *Aquaculture*, 49, 333-358.
- Denson, M.R. y Smith, T.I.J., 1997. Diet and light intensity effects on survival, growth and pigmentation of Southern flounder *Paralichthys lethostigma*. *Journal of World Aquaculture Society*, 28, 366-371.

- Deutsch, J.A., Moore, B.O. y Heinrichs, S.C., 1989. Unlearned specific appetite for protein. *Physiology & Behavior*, 46, 619-624.
- Días, J., Álvarez, M.J., Díez, A., Arzel, J., Corraze, G., Bautista, J.M. y Kaushik, S.J., 1998. Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein/energy in juvenile European sea-bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 161, 169-186.
- Dinan, T. G., 1996. Serotonin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Life Sciences*, 58, 1683-1694.
- Donahay, J.C., Van Dijk, G., Woods, S.C. y Seeley, R.J., 1998. Intraventricular GLP-1 reduces short but not long-term food intake or body weight in lean and obese rats. *Brain Research*, 779, 75-83.
- Donaldson, E.M., Fagerlund, U.H.M., Higgs, D.A. y McBride, J.R., 1979. Hormonal enhancement of growth. En: *Fish physiology, vol 8, bioenergetics and growth*. Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett, J.R. (Eds.). Academic Press, New York, pp. 455-597.
- Dores, R.M., McDonald, L.K., Stevenson, T.C. y Sei, C.A., 1990. The molecular evolution of neuropeptides: prospects for the 90's. *Brain, Behavior and Evolution*, 36, 80-99.
- Douglas, J. y Daoud, S., 1996. Characterization of the human cDNA and genomic DNA encoding CART: a cocaine- and amphetamine-regulated transcript. *Gene*, 169, 241-245.
- Douglas, J., McKinzie, A.A. y Couceyro, P., 1995. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *Journal of Neuroscience*, 15, 2471-2481.
- Dourish, C.T., Rycroft, W. y Iversen, S.D., 1989. Postponement of satiety by blockade of brain cholecystokinin (CCK-B) receptors. *Science*, 245, 1509-1511.
- Drewe, J., Gadiant, A., Rovati, C. y Beglinger, C., 1992. Role of circulating cholecystokinin in control of fat-induced inhibition of food intake in humans. *Gastroenterology*, 102, 1654-1659.
- Drucker, D.J., 1998. Glucagon-like peptides. *Diabetes*, 47, 159-169.
- Dryden, S., McCarthy, H.D., Malabu, U.H., Ware, M. y Williams, G., 1993. Increased neuropeptide Y concentrations in specific hypothalamic nuclei of the rat following treatment with methysergide: evidence that NPY may mediate serotonin's effects on food intake. *Peptides*, 14, 791-796.
- Dryden, S., Frankish, H.M., Wang, Q. y Williams, G., 1996. Increased feeding and neuropeptide Y (NPY) but not NPY mRNA levels in the hypothalamus of the rat following central administration of the serotonin synthesis inhibitor p-chlorophenylalanine. *Brain Research*, 724, 232-237.
- Dube, M.G., Horvath, T.L., Leranath, C., Kalra, P.S. y Kalra, S.P., 1994. Naloxone reduces the feeding evoked by intracerebroventricular galanin injection. *Physiology & Behavior*, 56, 811-813.
- Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A.F., Beil, F.T., Shen, J., Vinson, C., Rueger, J.M. y Karsenty, G., 2000. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*, 100, 197-207.
- Duhault, J., Baulanger, M., Chamorro, S., Boutin, J.A., Zuana, O.D., Douillet, E., Fauchère, J.-L., Félétou, M., Germain, M., Husson, B., Vega, A.M., Renard, P. y Tisserand, F.,

2000. Food intake regulation in rodents: Y5 or Y1 NPY receptors or both? *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 78, 173-185.
- Dutil, J.D., Lambert, Y. y Boucher, E., 1997. Does higher growth rate in Atlantic cod (*Gadus morhua*) at low salinity result from lower standard metabolic rate or increased protein digestibility? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54, 99-103.
- Echevarría, G., Martínez-Bebíá, M. y Zamora, S., 1997. Evolution of biometric indices and plasma metabolites during prolonged starvation in european sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118A, 111-123.
- Edwards, S. y Stevens, R., 1991. Peripherally administered 5-hydroxytryptamine elicits the full behavioural sequence of satiety. *Physiology & Behavior*, 50, 1075-1077.
- Edwards, C.M.B., Abusnana, S., Sunter, D., Murphy, K.G., Ghatei, M.A. y Bloom, S.R., 1999. The effect of the orexins on food intake: Comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *Journal of Endocrinology*, 160, R7-R12.
- Egawa, M., Yoshimatsu, H. y Bray, G.A., 1991. Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 260, R328-R334.
- Eilertson, C.D., Carneiro, N.M., Kittilson, J.D., Comley, C. y Sheridan, M.A., 1996. Cholecystokinin, neuropeptide Y and galanin modulate the release of pancreatic somatostatin-25 and somatostatin-14 in vitro. *Regulatory Peptides*, 63, 105-112.
- Einarsson, S., Jönsson, A.C. y Davies, P.S., 1997. Seasonal variation in trypsin activity in juvenile Atlantic salmon upper and lower modal groups. *Journal of Fish Biology*, 51, 1209-1218.
- Eipper, B.A. y Mains, R.E., 1980. Structure and biosynthesis of proadrenocorticotropin /endorphin and related peptides. *Endocrine Reviews*, 1, 1-27.
- Eison, A.S., Freeman, R.P., Guss, V.B., Mullins, U.L. y Wright, R.N., 1995. Melatonin agonists modulate 5-HT2A receptor-mediated neurotransmission: behavioral and biochemical studies in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 273, 304-308.
- Elias, C.F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R.S., Couceyro, P.R., Kuhar, M.J., Saper, C.B. y Elmquist, J.K., 1998a. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron*, 21, 1375-1385.
- Elias, C.F., Saper, C.B., Maratos-Flier, E., Tritos, N.A., Lee, C., Kelly, J., Tatro, J.B., Hoffman, G.E., Ollmann, M.M., Barsh, G.S., Sakurai, T., Yanagisawa, M., Elmquist, J.K., 1998b. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *The Journal of Comparative Neurology*, 402, 442-459.
- Elliott, J.M., 1991. Tolerance and resistance to thermal stress in juvenile Atlantic salmon *Salmo salar*. *Freshwater Biology*, 25, 61-70.
- Elmquist, J.K., Bjorback, C., Ahima, R.S., Flier, J.S. y Saper, C.B., 1998a. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 395, 535-547.
- Elmquist, J.K., Ahima, R.S., Elias, C.F., Flier, J.S. y Saper, C.B., 1998b. Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.*, 95, 741-746.

- Emilsson, V., Liu, Y.-L., Cawthorne, M.A., Morton, N.M. y Davenport, M., 1997. Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes*, 46, 313-316.
- Emond, M., Schwartz, G.J., Ladenheim, E.E. y Moran, T.H., 1999. Central leptin modulates behavioral and neural responsivity to CCK. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 276, R1545-R1549.
- Emond, M., Ladenheim, E.E., Schwartz, G.J. y Moran, T.H., 2001. Leptin amplifies the feeding inhibition and neural activation arising from a gastric nutrient preload. *Physiology & Behavior*, 72, 123-128.
- Eriksson, L.O., 1978. Nocturnalism versus diurnalism- dualism within individuals. En: *Rhythmic Activity of Fishes*. Thorpe, J.E. (ed). Academic Press, London, pp. 69-89.
- Evans, K.R. y Vaccarino, F.J., 1990. Amphetamine- and morphine-induced feeding: Evidence for involvement of reward mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 14, 9-22.
- Ewing, R.D., Sheahan, J.E., Lewis, M.A. y Palmisano, A.N., 1998. Effects of rearing density and raceway conformation on growth, food conversion, and survival of juvenile spring chinook salmon. *The Progressive Fish-Culturist*, 60, 167-178.
- Fagerlund, U.H.M., Higgs, D.A., McBride, J.R., Plotnikoff, M.D. y Dosanjh, B.H., 1980. The potential for using the anabolic hormones 17-alpha-methyltestosterone and/or 3,5,3'-triiodo-L-thyronine in the fresh water rearing coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and the effects of subsequent seawater performance. *Canadian Journal of Zoology*, 58, 1424-1432.
- Falcón, J., Thibault, C., Bégay, V., Zachmann, A. y Collin, J., 1992. Regulation of the rhythmic melatonin secretion by fish pineal photoreceptor cells. En: *Rhythms in Fishes*. Ali, M.A. (Ed). Plenum Press, New York, pp. 167-198.
- Farrell, W.J., Böttger, B., Ahmadi, F. y Finger, T.E., 2002. Distribution of cholecystokinin, calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y, and galanin in the primary gustatory nuclei of the goldfish. *The Journal of Comparative Neurology*, 450, 103-114.
- Fathi, Z., Corjay, M.H., Shapira, H., Wada, E., Berry, R., Jensen, R., Viallet, J., Sausville, E.A. y Battery, J.F., 1993. BRS-3: a novel bombesin receptor subtype selectively expressed in testis and lung carcinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 5979-5984.
- Feinle, C., Chapman, I.M., Wishart, J. y Horowitz, M., 2002. Plasma glucagon-like peptide-1 (GLP-1) responses to duodenal fat and glucose infusions in lean and obese men. *Peptides*, 23, 1491-1495.
- Fernstrom, J.D. y Wurtman, R.J., 1973. Control of brain 5-HT content by dietary carbohydrates. En: *Serotonin and Behaviour*. Barchas, J. y Usdin, E. (Eds.). Academic Press, New York, pp. 121.
- Fernstrom, M.H. y Fernstrom, J.D., 1995. Brain tryptophan concentrations and serotonin synthesis remain responsive to food consumption after the ingestion of sequential meals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 61, 312-319.
- Figlewicz, D.P., Stein, L.J., Woods, S.C. y Porte, D.Jr., 1985. Acute and chronic gastrin-rele-

- asing peptide decreases food intake in baboons. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 248, R578-R583.
- Figlewicz, D.P., Sipols, A.J., Seeley, R.J., Chavez, M., Woods, S.C. y Porte, D. Jr., 1995. Intraventricular insulin enhances the meal-suppressive efficacy of intraventricular cholecystokinin octapeptide in the baboon. *Behavioral Neuroscience*, 109, 567-569.
- Flatt, J.P., 1987. The difference in the storage capacities for carbohydrate and for fat, and its implications in the regulation of body weight. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 499, 104-123.
- Fletcher, P.J., Currie, P.J., Chambers, J.W. y Coscina, D.V., 1993. Radiofrequency lesions of the PVN fail to modify the effects of serotonergic drugs on food intake. *Brain Research*, 630, 1-9.
- Flore, L. y Keckeis, H., 1998. The effect of water current on foraging behaviour of a rheophilic cyprinid, *Chondrostoma nasus* (L.), during ontogeny: evidence of a trade-off between energetic gain and swimming costs. *Regulated Rivers: Research & Management*, 14, 141-154.
- Flynn, F.W., 1991. Effects of fourth ventricle bombesin injection on meal-related parameters and grooming behavior. *Peptides*, 12, 761-765.
- Foss, A., Evensen, T.H., Imsland, A.K. y Øiestad, V., 2001. Effects of reduced salinities on growth, food conversion efficiency and osmoregulatory status in the spotted wolffish. *Journal of Fish Biology*, 59, 416-426.
- Foster, L.A., 1997. Sham intake of lipid and sucrose (2 bottle presentation), when a duodenal infusion (lipid, sucrose, or saline) was initiated before, simultaneously with, or after, drink presentation. *Appetite*, 29, 395A.
- Foster, L.A., 2000. The effects of nutrient preloads on subsequent macronutrient selection in animal models. En: *Neural and Metabolic Control of Macronutrient Intake*. Berthoud, H.-R. y Seeley, R.J. (Eds.). CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 117-128.
- Foster, A.R., Houlihan, D.F., Gray, C., Medale, F., Fauconneau, B., Kaushik, S.J. y Le Bail, P.-Y., 1991a. The effects of ovine growth hormone on protein turnover in rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, 82, 111-120.
- Foster, L.A., Ames, N.K. y Emery, R.S., 1991b. Food intake and serum insulin responses to intraventricular infusions of insulin and IGF-I. *Physiology & Behavior*, 50, 745-749.
- Foster, L.A., Nakamura, K., Greenberg, D. y Norgren, R., 1996. Intestinal fat differentially suppresses sham feeding of different gustatory stimuli. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 270, R1122-R1125.
- Fowler, C.J. y Fraser, G.L., 1994. m-, d-, k-opioid receptors and their subtypes. A critical review with emphasis on radioligand binding experiments. *Neurochem. Int.*, 24, 401-426.
- Fraser, N.H.C. y Metcalfe, N.B., 1997. The costs of becoming nocturnal: feeding efficiency in relation to light intensity in juvenile Atlantic salmon. *Functional Ecology*, 11, 385-391.
- Fraser, R.A., Attardo, D. y Harvey, S., 1990. Growth hormone receptors in hypothalamic and extra-hypothalamic tissues. *Journal of Molecular Endocrinology*, 5, 231-238.
- Fraser, N.H.C., Metcalfe, N.B. y Thorpe, J.E., 1993. Temperature-dependent switch between

- en diurnal and nocturnal foraging in salmon. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 252, 135-139.
- Fraser, N.H.C., Heggenes, J., Metcalfe, N.B. y Thorpe, J.E., 1995. Low summer temperatures cause juvenile Atlantic salmon to become nocturnal. *Canadian Journal of Zoology*, 73, 446-451.
- Frederich, R.C., Lollmann, B., Hamann, A., Napolitano-Rosen, A., Kahn, B.B., Lowell, B.B. y Flier, J.S., 1995. Expression of *ob* mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, 96, 1658-1663.
- Fringer, T.E., 1978. Gustatory pathways in the bullhead catfish. II Facial lobe connections. *The Journal of Comparative Neurology*, 180, 691-706.
- Fry, F.E.J., 1971. The effects of environmental factors on the physiology of fish. En: *Fish Physiology*, Vol. 4. Hoar, W.S. and Randall, D.J. (Eds.) Academic Press, New York, pp. 1-98.
- Fryer, J.N. y Lederis, K., 1986. Control of corticotropin secretion in teleost fishes. *American Zoologist*, 26, 1017-1026.
- Fryer, J.N. y Peter, R.E., 1977. Hypothalamic control of ACTH secretion in goldfish. III. Hypothalamic cortisol implant studies. *General and Comparative Endocrinology*, 33, 215-225.
- Furuta, M., Funabashi, T. y Kimura, F., 2001. Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 288, 780-785.
- García de Yébenes, E., Li, S., Fournier, A., St-Pierre, S. y Pelletier, G., 1995. Regulation of proopiomelanocortin gene expression by neuropeptide Y in the rat arcuate nucleus. *Brain Research*, 674, 112-116.
- García, J., Hankins, W.G. y Rusiniak, K.W., 1974. Behavioral regulation of the milieu interne in man and rat. *Science*, 185, 824-831.
- García-Allegue, R., Madrid, J.A. y Sánchez-Vázquez, F.J., 2001. Melatonin rhythms in European sea bass plasma and eye: influence of seasonal photoperiod and water temperature. *Journal of Pineal Research*, 31, 68-75.
- Gardner, J.D. y Jensen, R.T. Cholecystokinin receptor antagonists. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 246: G471-G476, 1984.
- Gauthier, J.-F., Tataranni, P.A. y Reiman, E.M., 1998. Neuroanatomical correlates of taste in fasted humans using positron emission tomography. *International Journal of Obesity*, 24, S34.
- Gehrke, P.C., 1994. Influence of light intensity and wavelength on phototactic behavior of larval silver perch *Bidyanus bidyanus* and golden perch *Macquaria ambigua* and the effectiveness of light traps. *Journal of Fish Biology*, 44, 741-751.
- Gélineau, A. y Boujard, T., 2001. Oral administration of cholecystokinin receptor antagonists increase feed intake in rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 58, 716-724.
- Gélineau, A., Mambrini, M., Leatherland, J.F. y Boujard, T., 1996. Effect of feeding time on hepatic nuclei acid, plasma T₃, T₄, and GH concentrations in rainbow trout. *Physiology & Behavior*, 59, 1061-1067.
- Gibbs, J. y Smith, G.P., 1988. The actions of bombesin-like peptides on food intake. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 547, 210-216.

- Gibbs, J., Frauser, D.J., Rowe, E.A., Rolls, B.J., Rolls, E.T. y Maddison, S.P., 1979. Bombesin suppresses feeding in rats. *Nature*, 282, 208-210.
- Gietzen, D.W., 2000. Amino acid recognition in the central nervous system. En: *Neural and Metabolic Control of Macronutrient Intake*. Berthoud, H.-R. y Seeley, R.J. (Eds.). CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 339-357.
- Gobbi, J.I.F., De Luca, L.A. Jr., Johnson, A.K. y Menani, J.V., 2001. Interaction of serotonin and cholecystokinin in the lateral parabrachial nucleus to control sodium intake. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 280, R1301-R1307.
- Gómez, J.M., Boujard, T., Brœuf, G., Solari, A. y Le Bail, P.Y., 1997. Individual diurnal plasma profiles of thyroid hormones in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to cortisol, growth hormone, and growth rate. *General and Comparative Endocrinology*, 107, 74-83.
- Goodman, H.M., 1993. Growth hormone and metabolism. En: *The Endocrinology of Growth, Development, and Metabolism in Vertebrates*. Schreibman, M.P., Scanes, C.G., Pang, P.K.T. (Eds.). Academic Press, San Diego, pp. 93-115.
- Granger, D.N., Richardson, P.D.I., Kwietys, P.R. y Mortillaro, N.A., 1980. Intestinal blood flow. *Gastroenterology*, 78, 837-863.
- Gray, E.S., Young, G. y Bern, H.A., 1990. Radioreceptor assay for growth hormone in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and its application to the study of stunting. *Journal of Experimental Zoology*, 256, 290-296.
- Greenberg, D., Smith, G.P. y Gibbs, J., 1987. Infusion of CCK-8 into hepatic-portal vein fails to reduce food intake in rats. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 252, R1015-R1018.
- Greenberg, D., Smith, G.P. y Gibbs, J., 1990. Intraduodenal infusions of fats elicit satiety in sham-feeding rats. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 259, R110-R118.
- Greenberg, D., Smith, G.P. y Gibbs, J., 1993. Intravenous triglycerides fail to elicit satiety in sham-feeding rats. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 264, R409- R413.
- Gregory, T.R. y Wood, C.M., 1999. The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming performance of juvenile rainbow trout. *Physiological Zoology*, 72, 286-295.
- Grundemar, L., 1997. Multiple receptors and multiple actions. En: *Neuropeptide Y and Drug Development*. Grundemar, L. y Bloom, S.R. (Eds.), Academic Press, London, pp. 1-14.
- Guijarro, A.I., Delgado, M.J., Pinillos, M.L., López-Patiño, M.A., Alonso-Bedate, M. y De Pedro, N., 1999. Galanin and b-endorphin as feeding regulators in cyprinids: effect of temperature. *Aquaculture Research*, 30, 483-489.
- Gutiérrez, J. y Plisetskaya, E.M., 1991. Insulin binding to liver plasma membranes in salmonids with modified plasma insulin levels. *Canadian Journal of Zoology*, 69, 2745-2750.
- Gutiérrez, J., Pérez, J., Navarro, I., Zanuy, S. y Carrillo, M., 1991. Changes in plasma gluc-

- gons and insulin associated with fasting in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 9, 107-112.
- Gutt, J., 1985. The growth of juvenile flounders (*Paralichthys flesus* L.) at salinities of 0, 5, 15, and 35‰. *Journal of Applied Ichthyology*, 1, 17-26.
- Gutzwiller, J.-P., Drewe, J., Hildebrand, P., Rossi, L., Lauper, J.Z. y Beglinger, C., 1994. Effect of intravenous human gastrin-releasing peptide on food intake in humans. *Gastroenterology*, 106, 1168-1173.
- Gutzwiller, J.-P., Drewe, J., Ketterer, S., Hildebrand, P., Krautheim, A. y Beglinger, C., 2000. Interaction between CCK and a preload on reduction of food intake is mediated by CCK-A receptors in humans. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279, R189-R195.
- Håkansson, M.-L., Brown, H., Ghilardi, N., Skoda, R.C. y Meister, B., 1998. Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *The Journal of Neuroscience*, 18, 559-572.
- Hahne, W.F., Jensen, R.T., Lemp, G.F. y Gardner, J.D., 1981. Proglumide and berzotript: members of a different class of cholecystokinin receptor antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 78, 6304-6308.
- Halaas, J.L., Gajwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K. y Friedman, J.M., 1995. Weight reducing effects of the plasma protein encoded by the *obese* gene. *Science*, 269, 543-546.
- Halford, J.C.G., Smith, B.K. y Blundell, J.E., 2000. Serotonin (5-HT) and serotonergic receptors in the regulation of macronutrient intake. En: *Neural and Metabolic Control of Macronutrient Intake*. Berthoud, H.-R. y Seeley, R.J. (Eds.). CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 425-446.
- Handeland, S.O., Berge, Å., Björnsson, B.Th., Lie, Ø. y Stefansson, S.O., 2000. Seawater adaptation by out-of-season Atlantic salmon (*Salmo salar*) L. smolts at different temperatures. *Aquaculture*, 181, 377-396.
- Hanson, E.S. y Dallman, M.F., 1995. Neuropeptide Y NPY may integrate responses of hypothalamic feeding systems and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Journal of Neuroendocrinology*, 7, 273-279.
- Hara, T.J., 1994. The diversity of chemical stimulation in fish olfaction and gustation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4, 1-35.
- Hardy, R.W., 2002. Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. En: *Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture*. Webster, C.D. & Lim, C. (eds). CAB International, Oxon. pp. 184-202.
- Hasegawa, S., Hirano, T., Iwata, M., Akiyama, T. y Arai, S., 1987. Osmoregulatory ability of chum salmon, *Oncorhynchus keta*, reared in fresh water for prolonged periods. *Fish Physiology and Biochemistry*, 4, 101-110.
- Hatzathanasiou, A., Paspatis, M., Houbart, M., Kestemont, P., Stafanakis, S. y 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.
- Havel, P.J., 1997. Glucose, but not fructose, infusion increases circulating leptin in propor-

- tion to adipose stores in rhesus monkeys. *Journal of Endocrinology & Diabetes*, 105 (Suppl. 3), 37-38.
- Havel, P.J., 2000. Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 59, 359-371.
- Havel, P.J., 2001. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Experimental Biology and Medicine*, 226, 963-977.
- Havel, P.J., Uriu-Hare, J.Y., Liu, T., Stanhope, K.L., Stern, J.S., Keen, C.L. y Ahren, B., 1998. Marked and rapid decreases of circulating leptin in streptozotocin diabetic rats: reversal by insulin. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 274, R1482-R1491.
- Havel, P.J., Townsend, R., Chaump, L. y Teff, K., 1999a. High-fat meals reduce 24-h circulating leptin concentrations in women. *Diabetes*, 48, 334-341.
- Havel, P.J., Stanhope, K.L., Moreno-Aliaga, M.J., Kras, K.M. y Evans, J., 1999b. Potential role for mitochondrial metabolism in regulating leptin production by cultured rat adipocytes. *Obesity Research*, 7, 63S.
- Haynes, A.C., Arch, J.R., Wilson, S., McClue, S. y Buckingham, R.E., 1998. Characterisation of the neuropeptide Y receptor that mediates feeding in the rat: a role for the Y5 receptor? *Regulatory Peptides*, 75, 355-361.
- Hazon, N. y Balment, J., 1998. Endocrinology. En: *The physiology of fishes*. Evans, D.H. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, pp. 441-463.
- Heilman, M.J. y Spieler, R.E., 1999. The daily feeding rhythm to demand feeders and the effects of timed meal-feeding on the growth of juvenile Florida pompano, *Trachinotus carolinus*. *Aquaculture*, 180, 53-64.
- Heinrichs, S.C. y Richard, D., 1999. The role of corticotropin-releasing factor and urocortin in the modulation of ingestive behavior. *Neuropeptides*, 33, 350-359.
- Heinrichs, S.C., Menzaghi, F., Pich, E.M., Hauger, R.L., Koob, G.F., 1993. Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y. *Brain Research*, 611, 18-24.
- Heinrichs, S.C., Menzaghi, F. y Koob, G.F., 1998. Neuropeptide Y-induced feeding and its control. *Vitamins and Hormones*, 54, 51-66.
- Helm, K.A., Rada, P. y Hoebel, B.G., 2003. Cholecystokinin combined with serotonin in the hypothalamus limits accumbens dopamine release while increasing acetylcholine: a possible satiation mechanism. *Brain Research*, 963, 290-297.
- Hengsawat, K., Ward, F.J. y Jaruratjamorn, P., 1997. The effect of stocking density on yield, growth and mortality of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell 1822) cultured in cages. *Aquaculture* 152, 67-76.
- Henrick, C.J., 1905. The central gustatory paths in the brains of bony fishes. *The Journal of Comparative Neurology*, 15, 375-456.
- Herrmann, C., Göke, R., Richter, G., Fehmann, H.C., Arnold, R. y Göke, B., 1995. Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion*, 56, 117-126.

- Hidalgo, F., Nogales, J.J. y Ortega, A., 1993. Estudio preliminar del efecto de la intensidad luminosa sobre el crecimiento y el rendimiento alimentario en lubina (*Dicentrarchus labrax*). *Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura*, pp. 109-113.
- Hill, R.D. y Woodruff, G.N., 1990. Differentiation of central cholecystokinin receptor binding sites using the non-peptide antagonists MK-329 and L-365,260. *Brain Research*, 526, 276-283.
- Hillebrand, J.J.G., de Wied, D. y Adan, R.A.H., 2002. Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides*, 23, 2283-2306.
- Himick, B.A. y Eales, J.G., 1990. The acute effects of food and glucose challenge on plasma thyroxine and triiodothyronine levels in previously starved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*, 78, 34-41.
- Himick, B.A. y Peter, R.E., 1994a. CCK/gastrin-like immunoreactivity in brain and gut, and CCK suppression of feeding in goldfish. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 267, R841-R851.
- Himick, B.A. y Peter, R.E., 1994b. Bombesin acts to suppress feeding behavior and alter serum growth hormone in goldfish. *Physiology & Behavior*, 55, 65-72.
- Himick, B.A. y Peter, R.E., 1995a. Bombesin-like immunoreactivity in the forebrain and pituitary and regulation of anterior pituitary hormone release by bombesin in goldfish. *Neuroendocrinology*, 61, 365-376.
- Himick, B.A. y Peter, R.E., 1995b. Neuropeptide regulation of feeding and growth hormone secretion in fish. *Netherlands Journal of Zoology*, 45, 3-9.
- Himick, B.A., Vigna, S.R. y Peter, R.E., 1995. Characterization and distribution of bombesin binding sites in the goldfish hypothalamic feeding center and pituitary. *Regulatory Peptides*, 60, 167-176.
- Himick, B.A., Vigna, S.R. y Peter, R.E., 1996. Characterization of cholecystokinin binding sites in goldfish brain and pituitary. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 271, R137-R143.
- Hirosue, Y., Inui, A., Teranishi, A., Miura, M., Nakajima, M., Okita, M., Nakajima, Y., Himori, N., Baba, S. y Kasuga, M., 1993. Cholecystokinin octapeptide analogues suppress food intake via central CCK-A receptors in mice. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 265, R481-R486.
- Höfer, D., Püschel, B. y Drenckhahn, D., 1996. Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of α -gustducin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 93, 6631-6634.
- Hoggard, N., Hunter, L., Duncan, J.S., Williams, L.M., Trayhurn, P., Mercer, J.G., 1997. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 94, 11073-11078.
- Höglund, E., Balm, P. H. M. y Winberg, S., 2000. Skin darkening, a potential signal in subordinate arctic charr (*Salvelinus alpinus*): The regulation role of brain monoamines and pro-opiomelanocortin-derived peptides. *The Journal of Experimental Biology*, 203, 1711-1721.
- Höglund, E., Kolm, N. y Winberg, S., 2001. Stress-induced changes in brain serotonergic

- activity, plasma cortisol and aggressive behavior in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) is counteracted by L-DOPA. *Physiology & Behavior*, 74, 381-389.
- Höjesjö, J., Johnsson, J. y Axelsson, M., 1999. Behavioural and heart rate responses to food limitation and predation risk: an experimental study on rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 55, 1009-1019.
- Holloway, A.C. y Leatherland, J.F., 1997. The effects of N-methyl-D,L-aspartate and gonadotropin-releasing hormone on in vitro growth hormone release in steroid-primed immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 107, 32-43.
- Holloway, A.C. y Leatherland, J.F., 1998. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion in teleost fishes with emphasis on the involvement of gonadal sex steroids. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 8, 409-429.
- Holm, J.C., Refstie, T. y Bo, S., 1990. The effect of fish density and feeding regimes on individual growth rate and mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 89, 225-232.
- Holmgren, S. y Jönsson, A.-C., 1988. Occurrence and effects on motility of bombesin related peptides in the gastrointestinal tract of the atlantic cod, *Gadus morhua*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 89C, 249-256.
- Holmgren, S., Fritsche, R., Karila, P., Gibbins, I., Axelsson, M., Franklin, C., Grigg, G. y Nilsson, S., 1994. Neuropeptides in the Australian lungfish *Neoceratodus forsteri*: effects in vivo and presence in autonomic nerves. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 266, R1568-R1577.
- Holmqvist, B.I. y Carlberg, M., 1992. Galanin-receptors in the brain of a teleost: autoradiographic distribution of binding sites in the Atlantic salmon. *The Journal of Comparative Neurology*, 326, 44-60.
- Holst, J.J., 1997. Enteroglucagon. *Annu. Rev. Physiol.*, 59, 257-271.
- Holstein, B., 1982. Inhibition of gastric acid secretion in the Atlantic cod, *Gadus morhua*, by sulphated and desulphated gastrin, caerulein, and CCK-octapeptide. *Acta Physiologica Scandinavica*, 114, 453-459.
- Honda, T., Wada, E., Battey, J.F. y Wank, S.A., 1993. Differential gene expression of CCKA and CCK-B receptors in the rat brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 4, 143-154.
- Horvath, T.L., Naftolin, F., Kalra, S.P. y Leranth, C., 1992. Neuropeptide-Y innervation of b-endorphin-containing cells in the rat mediobasal hypothalamus: a light and electron microscopic double immunostaining analysis. *Endocrinology*, 131, 2461-2467.
- Horvath, T.L., Kalra, S.P., Naftolin, F. y Leranth, C., 1995. Morphological evidence for a galanin-opiate interaction in the rat mediobasal hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology*, 7, 579-588.
- Horvath, T.L., Naftolin, F., Leranth, C., Sahu, A. y Kalra, S.P., 1996. Morphological and pharmacological evidence for neuropeptide Y-galanin interaction in the rat hypothalamus. *Endocrinology*, 137, 3069-3077.
- Horvath, T.L., Bechmann, I., Naftolin, F., Kalra, S.P. y Leranth, C., 1997. Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations. *Brain Research*, 756, 283-286.

- Howard, A.D., Tan, C., Shiao, L.L., Palyha, O.C., McKee, K.K., Weinberg, D.H., Feighner, S.D., Cascieri, M.A., Smith, R.G., Van Der Ploeg, L.H.T. y Sullivan, K.A., 1997. Molecular cloning and characterization of a new receptor for galanin. *FEBS Letters*, 1997, 405, 285-290.
- Howerton, R.D. y Boid, C.E., 1992. Measurements of water circulation in ponds with gypsum blocks. *Aquacultural Engineering*, 11, 141-155.
- Hseu, J.R., Lu, F.I., Su, H.M., Wang, L.S., Tsai, C.L. y Hwang, P.P., 2003. Effect of exogenous tryptophan on cannibalism, survival and growth in juvenile grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture*, 218, 251-263.
- Hubel, K.A., 1985. Intestinal nerves and ion transport: stimuli, reflexes, and responses. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 248, G261-G271.
- Huether, G., 1994. Melatonin synthesis in the gastrointestinal tract and the impact of nutritional factors on circulating melatonin. En: *The aging clock. The pineal gland and other pacemakers in the progression of aging and carcinogenesis*. Pierpaoli, W., Regelson, W., Fabris, N. (Eds.). The New York Academy of Sciences, New York, pp. 146-158.
- Huether, G., Poeggeler, B., Reimer, R. y George, A., 1992. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Science*, 51, 945-953.
- Huether, G., Poeggeler, B., Adler, L. y Ruther, E., 1993. Effects of indirectly acting 5-HT receptor agonists on circulating melatonin levels in rats. *European Journal of Pharmacology*, 238, 249-254.
- Hui, L.H., Cheng, K.W. y Yu, K.L., 1999. Molecular cloning and characterization of goldfish b-endorphin and mu-opioid receptor. In *Proceedings of the 81st Annual Meeting of the Endocrine Society*, 12- 15 June, San Diego, CA, p. 127 (abstract).
- Iigo, M. y Aida, K., 1995. Effects of season, temperature and photoperiod on plasma melatonin rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of Pineal Research*, 18, 62-68.
- Iigo, M., Kezuka, H., Suzuki, T., Tabata, M. y Aida, K., 1994. Melatonin signal transduction in the goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 18, 563-569.
- Iigo, M., Kitamura, S., Ikuta, K., Sánchez-Vázquez, F.J., Ohtani-Kaneko, R., Hara, M., Hirata, K., Tabata, M. y Aida, K., 1998. Regulation by light and darkness of melatonin secretion from the superfused Masu salmon (*Oncorhynchus masou*) pineal organ. *Biological Rhythm Research*, 29, 86-97.
- Imeryüz, N., Yegen, B.C., Bozkurt, A., Coskam, T., Villanueva-Penacarrillo, M.L. y Ulusoy, N.B., 1997. Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 273, G920-G927.
- Imslund, A.K., Jonassen, T.M., Kadowaki, S., Berntssen, M. y Stefansson, S.O., 2000a. Intraspecific differences in physiological efficiency of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Journal of the World Aquaculture Society*, 31, 285-296.
- Imslund, A.K., Foss, A., Nævdal, G., Cross, T., Bonga, S.W., van Ham, E.H. y Stefansson,

- S.O., 2000b. Countergradient variation in growth and food conversion efficiency of juvenile turbot. *Journal of Fish Biology*, 57, 1216-1226.
- Imslund, A.K., Foss, A., Sveinsbø, B., Jonassen, T.M. y Stefansson, S.O., 2001a. Intraspecific differences in RNA/DNA ratios and metabolism of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of the World Aquaculture Society*, 32, 1-10.
- Imslund, A.K., Foss, A., Gunnarsson, S., Berntssen, M.H.G., Gerald, R.F., Bonga, S.W., Ham, E.V., Nævdal, G. y Stefansson, S.O., 2001b. The interaction of temperature and salinity on growth and food conversion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 198, 353-367.
- Ingram, S.M., Krause, R.G., Baldino, F. Jr., Skeen, L.C. y Lewis, M.E., 1989. Neuronal localization of cholecystokinin mRNA in the rat brain by using in situ hybridization histochemistry. *The Journal of Comparative Neurology*, 287, 260-272.
- Ingvartsen, K.L. y Boisclair, Y.R., 2001. Leptin and the regulation of food intake, energy homeostasis and immunity with special focus on periparturient ruminants. *Domestic Animal Endocrinology*, 21, 215-250.
- Inui, A., 1999a. Neuropeptide Y feeding receptors: are multiple receptors involved? *Trends in Pharmacological Sciences*, 20, 43-46.
- Inui, A., 1999b. Feeding and body-weight regulation by hypothalamic neuropeptides-mediation of the actions of leptin. *Trends in Neuroscience*, 22, 62-67.
- Inui, A., 2000. Transgenic approach to the study of body weight regulation. *Pharmacological Reviews*, 52, 35-61.
- Inui, A., Okita, M., Inoue, T., Sakatani, N., Oya, M., Morioka, H., Oimomi, M. y Baba, S., 1989. Effect of cholecystokinin octapeptide analogues on food intake in the dog. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 257, R746-R751.
- Inui, A., Okita, M., Nakajima, M., Inoue, T., Sakatani, N., Oya, M., Morioka, H., Okimura, Y., Chihara, K. y Baba, S., 1991. Neuropeptide regulation of feeding in dogs. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 261, R588-R594.
- Irwin, S., O'Halloran, J. y FitzGerald, R.D., 1999. Stocking density, growth and growth variation in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque). *Aquaculture*, 178, 77-88.
- Ishibashi, T., Hahn, D.W., Srivastava, L., Kumaresan, P. y Turner, C.W., 1966. Effect of pinealectomy and melatonin on feed consumption and thyroid hormone secretion rate. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 122, 644-647.
- Jacklet, J.W., 1982. Circadian clock mechanisms. En: *Biological Timekeeping*. Brady, J. (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 173-188.
- Jacob, W.F. y Taylor, M.H., 1983. The time course of seawater acclimation in *Fundulus heteroclitus* L. *The Journal of Experimental Zoology*, 228, 33-39.
- Jacobowitz, D.W. y O'Donohue, T.L., 1978. α -Melanocyte stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of the rat brain. *Proceedings of the National Academy of Science of U.S.A.*, 75, 6300-6304.
- Jain, M.R., Horvath, T.L., Kalra, P.S. y Kalra, S.P., 2000. Evidence that NPY Y1 receptors are

- involved in stimulation of feeding by orexins (hypocretins) in sated rats. *Regulatory peptides*, 87, 19-24.
- Jeanningros, R., 1982. Vagal unitary responses to intestinal amino acid infusions in the anesthetized cat: a putative signal for protein induced satiety. *Physiology & Behavior*, 28, 9-21.
- Jensen, J., 2001. Regulatory peptides and control of food intake in non-mammalian vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 128, 471-479.
- Jensen, J. y Conlon, J.M., 1992. Isolation and primary structure of gastrin-releasing peptide from a teleost fish, the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Peptides*, 13, 995-999.
- Jensen, P.B., Kristensen, P., Clausen, J.T., Judge, M.E., Hastrup, S., Thim, L., Wulff, B.S., Foged, C., Jensen, J., Holst, J.J. y Madsen, O.D., 1999. The hypothalamic satiety peptide CART is expressed in anorectic and non-anorectic pancreatic islet tumors and in the normal islet of Langerhans. *FEBS Letters*, 447, 139-143.
- Jhanwar-Uniyal, M., Beck, B., Jhanwar, Y.S., Burlet, C. y Leibowitz, S.F., 1993. Neuropeptide Y projection from arcuate nucleus to parvocellular division of paraventricular nucleus: Specific relation to the ingestion of carbohydrate. *Brain Research*, 631, 97-106.
- Jobling, M., 1994. *Fish Bioenergetics* Vol. XIV Chapman & Hall, London.
- Jobling, M., 1997. Temperature and growth: modulation of growth rate via temperature rate. En: *Global Warming: Implications for freshwater and marine fish*. Wood, C.M. y McDonald, D.G. (Eds.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 225-253.
- Jobling, M. y Koskela, J., 1996. Interindividual variations in feeding and growth in rainbow trout during restricted feeding and in a subsequent period of compensatory growth. *Journal of Fish Biology*, 49, 658-667.
- Jobling, M., Christiansen, J.S., Jørgensen, E.H. y Arnesen, A.M., 1993. The application of X-radiography in feeding and growth studies with fish: a summary of experiments conducted on Arctic Charr. *Reviews in Fisheries Science*, 1, 223-237.
- Jobling, M., Koskela, J. y Pirhonen, J., 1998. Feeding time, feed intake and growth of Baltic salmon, *Salmo salar*, and brown trout, *Salmo trutta*, reared in monoculture and duoculture at constant low temperature. *Aquaculture*, 163, 73-84.
- Johnson, R.M., Johnson, T.M. y Londraville, R.L., 2000. Evidence for leptin expression in fishes. *Journal of Experimental Zoology*, 286, 718-724.
- Jonsson, J.J. y Björnsson, B.T., 1994. Growth hormone increases growth rate, appetite and dominance in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Animal Behaviour*, 48, 177-186.
- Jonsson, J.J., Höjesjö, J. y Fleming, I.A., 2001. Behavioural and heart rate responses to predation risk in wild and domesticated Atlantic salmon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58, 788-794.
- Jonassen, T.M., 2002. Effects of photoperiod, stocking density and diet on growth in young spotted wolffish (*Anarhichas minor olafsen*). *Aquaculture International*, 10, 411-420.
- Jonassen, T.M., Pittman, K. y Imsland, A.K., 1997. Seawater acclimation of tilapia, *Oreochromis spilurus spilurus* Günther, fry and fingerlings. *Aquaculture Research*, 28, 205-214.

- Jonassen, T.M., Imsland, A.K., Kadowaki, S. y Stefansson, S.O., 2000. Interaction of temperature and photoperiod on growth of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *Aquaculture Research*, **31**, 219-227.
- Jönsson, E., Johnsson, I.J. y Björnsson, B.Th., 1996. Growth hormone increases predation exposure of rainbow trout. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B.*, **263**, 647-651.
- Jönsson, E., Johnsson, I.J. y Björnsson, B.Th., 1998. Growth hormone increases aggressive behaviour in juvenile rainbow trout. *Hormones and Behavior*, **33**, 9-15.
- Jönsson, E., Johansson, V., Björnsson, B.T. y Winberg, S., 2003. Central nervous system actions of growth hormone on brain monoamine levels and behavior of juvenile rainbow trout. *Hormones and Behavior*, **43**, 367-374.
- Jørgensen, E.H. y Jobling, M., 1992. Feeding behaviour and effect of feeding regime on growth of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, **101**, 135-146.
- Jørgensen, E.H. y Jobling, M., 1993. Feeding in darkness eliminates density-dependent growth suppression in Arctic charr. *Aquaculture International*, **1**, 90-93.
- Jørgensen, E. H., Christiansen, J. S. y Jobling, M., 1993. Effects of stocking density on food intake, growth performance and oxygen consumption in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture*, **110**, 191-204.
- Jørgensen, E.H., Baardvik, B.M., Eliassen, R. y Jobling, M., 1996. Food acquisition and growth of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) in relation to spatial distribution of food. *Aquaculture*, **143**, 277-289.
- Juell, J.E., 1995. The behaviour of Atlantic Salmon in relation to efficient cage rearing. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **12**, 1-18.
- Juell, J.E., Furevik, D.M. y Bjørndal, Å., 1993. Demand feeding in Salmon farming by hydroacoustic food detection. *Aquacultural Engineering*, **12**, 155-167.
- Kaiser, M.J. y Hughnes, R.N., 1993. Factors affecting the behavioural mechanisms of diet selection in fishes. *Marine Behaviour and Physiology*, **23**, 105-118.
- Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Koda, A., Yamamoto, K., Kitajima, Y., Matsumoto, M., Minamitake, Y., Kikuyama, S. y Kangawa, K., 2001. Bullfrog ghrelin is modified by n-octanoic acid at its third threonine residue. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 40441-40448.
- Kaiyala, K.J., Woods, S.C. y Schwartz, M.W., 1995. New model for the regulation of energy balance and adiposity by the central nervous system. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **62**, 1123s-1134s.
- Kalra, S.P., 1997. Appetite and body weight regulation: Is it all in the brain? *Neuron*, **19**, 227-230.
- Kalra, S.P. Dube, M.G., Sahu, A., Phelps, C.P. y Kalra, P.S., 1991. Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.*, **88**, 10931-10935.
- Kalra, P.S., Norlin, M. y Kalra, S.P., 1995. Neuropeptide Y stimulates beta-endorphin release in the basal hypothalamus: role of gonadal steroids. *Brain Research*, **705**, 353-356.

- Kalra, S.P., Dube, M.G., Pu, S., Xu, B., Horvath, T.L. y Kalra, P.S., 1999. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine Reviews*, 20, 68-100.
- Kanatani, A., Ito, J., Ishihara, A., Iwaasa, H., Fukuroda, T., Fukami, T., MacNeil, D.J., Van der Ploeg, L.H. y Ihara, M., 1998. NPY-induced feeding involves the action of a Y1-like receptor in rodents. *Regulatory Peptides*, 75, 409-415.
- Kanwal, J.S. y Carpio, J., 1983. An electrophysiological investigation of the oro-pharyngeal (IX-X) taste system in the channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Journal of Comparative Physiology*, 150A, 345-357.
- Kanwal, J.S. y Carpio, J., 1988. Overlapping taste and tactile maps of the oropharynx in the vagal lobe of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Neurobiology*, 19, 211-222.
- Kanwal, J.S. y Finger, T.E., 1992. Central representation and projections of gustatory systems. En: *Fish Chemoreception*. Hara, T.J. (Ed.), Chapman & Hall, London, pp. 79-102.
- Karsenty, G., 2001. Leptin controls bone formation through a hypothalamic relay. *Recent Progress in Hormones Research*, 56, 401-415.
- Kara, M.H. y Derbal, F., 1996. Régime alimentaire du loup *Dicentrarchus labrax* (poisson moronidé) du golfe d'Annaba, Algérie. *Annales de l'Institut Oceanographique, Paris*, 72, 185-194.
- Kasumyan, A.O., 1997. Gustatory reception and feeding behavior in fish. *Journal of Ichthyology*, 37, 72-86.
- Kasumyan, A.O. y Taufik, L.R., 1994. Behavior reaction of juvenile sturgeons (Acipenseridae) to amino acids. *Journal of Ichthyology*, 34, 90-103.
- Kateb, C.C. y Merali, Z., 1992. A single meal elicits regional changes in bombesin like peptide levels in the gut and brain. *Brain Research*, 596, 10-16.
- Kaushik, S.J., 2002. European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. En: *Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture*. Webster, C.D. & Lim, C. (Eds). CAB International, Oxon. pp. 28-39.
- Kawauchi, H., Tsubokawa, M., Kanazawa, A. y Kitagawa, H., 1980. Occurrence of two different endorphins in the salmon pituitary. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 92, 1278-1288.
- Kawauchi, H., Kawazoe, I., Tsubokawa, M., Kishida, M. y Baker, B.I., 1983. Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature*, 305, 321-323.
- Kaye, W.H., 1997. Persistent alterations in behavior and serotonin activity after recovery from anorexia and bulimia nervosa. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 817, 162-178.
- Kelley, D.F., 1986. Bass nurseries on the west coast of the U.K. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 66, 439-464.
- Kelly, S.P. y Woo, N.Y.S., 1999. The response of sea bream following abrupt hyposmotic exposure. *Journal of Fish Biology*, 55, 732-750.
- Kelly, S.P., Chow, I.N.K. y Woo, N.Y.S., 1999. Effects of prolactin and growth hormone on strategies of hypoosmotic adaptation in a marine teleost, *Sparus sarba*. *General and Comparative Endocrinology*, 113, 9-22.

- Kennaway, D.J., Firth, R.J., Philipou, G., Matthews, C.D. y Seamark, R.F., 1977. A specific radioimmunoassay for melatonin in biological tissue and fluids and its validation by gas chromatography-mass spectrometry. *Endocrinology*, 101, 119-127.
- Kent, P., Anisman, H. y Merali, Z., 1998. Are bombesin-like peptides involved in the mediation of stress response? *Life Sciences*, 62, 103-114.
- Kestemont, P. y Baras, E., 2001. Environmental factors and feed intake: mechanisms and interactions. En: *Food Intake in Fish*. Houlihan, D., Boujard T. and Jobling, M. (Eds.), Blackwell Science, Cornwall, pp. 131-156.
- Kestemont, P., Jourdan, S., Houbart, M., Mèlar, C., Paspatis, M., Fontaine, P., Cuvier, A., Kentouri, M. y Baras, E., 2003. Size heterogeneity, cannibalism and competition in cultured predatory fish larvae: biotic and abiotic influences. *Aquaculture*, 227, 333-356.
- Kezuka, H., Iigo, I., Furukawa, K., Aida, K. y Hanyu, I., 1992. Effects of photoperiod, pinealectomy and opthalmectomy on circulating melatonin rhythms in the goldfish (*Carassius auratus*). *Zoological Science*, 9, 1147-1153.
- Khachaturian, H., Lewis, M.E., Shafer, M.K.H. y Watson, S.J., 1985. Anatomy of CNS opioid system. *Trends in Neuroscience*, 8, 111-119.
- Kieffer, T.J. y Habener, J.F., 1999. The glucagon-like peptides. *Endocrine Reviews*, 20, 876-913.
- Kilambi, R.V., 1980. Food consumption, growth and survival of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* at four salinities. *Journal of Fish Biology*, 17, 613-618.
- Kiliaan, A.J., Joosten, H.W.J., Bakker, R., Dekker, K. y Groot, J.A., 1989. Serotonergic neurons in the intestine of two teleost, *Carassius auratus* and *Oreochromis mossambicus*, and the effect of serotonin on transepithelial ion-selectivity and muscle tension. *Neuroscience*, 31, 817-824.
- Kiliaan, A.J., Holmgren, S., Jönsson, A.-C., Dekker, K. y Groot, J., 1992. Neurotensin, substance P, gastrin/cholecystokinin, and bombesin in the intestine of the tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and the goldfish (*Carassius auratus*): immunochemical detection and effects on electrophysiological characteristics. *General and Comparative Endocrinology*, 88, 351-363.
- Kiliaan, A.J., Holmgren, S., Jönsson, A.-C., Dekker, K. y Groot, J.A., 1993. Neuropeptides in the intestine of two teleost species (*Oreochromis mossambicus*, *Carassius auratus*): localization and electrophysiological effects on the epithelium. *Cell and Tissue Research*, 271, 123-124.
- Kiliaan, A.J., Scholten, G. y Groot, J.A., 1996. Ultrastructural study of the presence of vasoactive intestinal polypeptide and serotonin in mucosal nerves fibres and endocrine cells of the intestine of goldfish (*Carassius auratus*) and tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Cell and Tissue Research*, 283, 143-150.
- Kim, J.D. y Kaushik, S.J., 1992. Contribution of digestible energy from carbohydrates and estimation of protein/energy requirements for growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 106, 161-169.
- Kim, M.S., Small, C.J., Stanley, S.A., Morgan, D.G., Seal, L.J., Kong, W.M., Edwards, C.M., Abusnana, S., Sunter, D., Ghatei, M.A. y Bloom, S.R., 2000. The central melanocortin

- system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. *The Journal of Clinical Investigation*, 105, 1005-1011.
- Kiyohara, S., Yamashita, S., Lamb, C.F. y Finger, T., 1999. Distribution of trigeminal fibers in the primary facial gustatory center of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Brain Research*, 841, 93-100.
- Klaoudatos, S.D., Conides, A.J., 1996. Growth, food conversion, maintenance and long-term survival of gilthead sea bream, *Sparus auratus* L., juveniles after abrupt transfer to low salinity. *Aquaculture Research*, 27, 765-774.
- Klein, S., Coppack, S.W., Mohamed-Ali, V., Landt, M., 1996. Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes*, 45, 984-987.
- Koening, J.I., Hooi, S.C., Maiter, D.M., Martin, J.B., Gabriel, S.M., Strauss, R.M. y Kaplan, L.M., 1991. En: *Galanin: A New Multifunctional Peptide in the Neuroendocrine System*. Hokfelt, T., Bartfai, T., Jacobowitz, J.M. y Otteson, D. (Eds.). MacMillan, London, pp. 331-342.
- Kohbara, J.; Hidaka, I.; Morishita, T.; Miyajima, T., 2000. Gustatory and olfactory sensitivity to extracts of jack mackerel muscle in young yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture*, 181, 127-140.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H. y Kangawa, K., 1999. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402, 656-660.
- Kopin, A.S., Lee, Y.M., McBride, E.W., Miller, L.J., Lu, M., Lin, H.Y., Kolakowski, L.F. Jr y Beinborn, M., 1992. Expression cloning and characterization of the canine parietal cell gastrin receptor. *Proceeding of the National Academy of Science of USA*, 89, 3605-3609.
- Kopin, A.S., Mathes, W.F., McBride, E.W., Nguyen, M., Al-Haider, W., Schmitz, F., Bonner-Weir, S., Kanarek, R. y Beinborn, M., 1999. The cholecystokinin-A receptor mediates inhibition of food intake yet is not essential for the maintenance of bodyweight. *The Journal of Clinical Investigation*, 103, 383-391.
- Koskela, J., Pirhonen, J. y Jobling, M., 1997. Feed intake, growth rate and body composition of juvenile Baltic salmon exposed to different constant temperature. *Aquaculture International*, 5, 351-360.
- Koylu, E.O., Couceyro, P.R., Lambert, P.D., Ling, N.C., DeSouza, E.B. y Kuhar, M.J., 1997. Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. *J. Neuroendocrinol*, 9, 823-833.
- Koylu, E.O., Couceyro, P.R., Lambert, P.D. y Kuhar, M.J., 1998. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 391, 115-132.
- Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., Larsen, P.J. y Hastrup, S., 1998. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*, 393, 72-76.
- Kudo, H., Tsuneyoshi, Y., Nagae, M., Adachi, S., Yamauchi, K., Ueda, U. y Kawamura, H., 1994. Detection of thyroid hormone receptors in the olfactory system and brain of wild masu salmon, *Oncorhynchus masou* (Brevoort), during smolting by in vitro autoradiography. *Aquaculture and Fisheries Management*, 25, 171-182.

- Kuhar, M.J. y Dall Vechia, S.E., 1999. CART peptides: novel addiction- and feeding-related neuropeptides. *Trends in Neuroscience*, 22, 316-320.
- Kulczykowska, E., 2002. A review of the multifunctional hormone melatonin and a new hypothesis involving osmoregulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 11, 321-330.
- Kyrkouli, S.E., Stanley, B.G. y Leibowitz, S.F., 1987. Bombesin induced anorexia: Sites of action in the rat brain. *Peptides*, 8, 237-241.
- Kyrkouli, S., Stanley, B.G., Seirafi, R.D. y Leibowitz, S.F., 1990a. Stimulation of feeding by galanin: anatomical localization and behavioral specificity of this peptides effect in the brain. *Peptides*, 11, 995-1001.
- Kyrkouli, S., Stanley, B.G., Hutchinson, R., Seirafi, R.D. y Leibowitz, S.F., 1990b. Peptide-amine interactions in the hypothalamic paraventricular nucleus: analysis of galanin and neuropeptide Y in relation to feeding. *Brain Research*, 521, 185-191.
- Ladenheim, E.E., Wirth, K.E. y Moran, T.H., 1996. Receptor subtype mediation of feeding suppression by bombesin-like peptides. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 54, 705-711.
- Lagardère, J.-P., Bégout, M.L., Lafaye, J.Y. y Villotte, J.-P., 1994. Influence of wind-produced noise on orientation in the sole *Solea solea*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51, 1258-1264.
- Laharrague, P., Larrouy, D., Fontanilles, A.M., Truel, N., Campfield, A., Tenenbaum, R., Galitzky, J., Corberand, J.X., Penicaud, L., Casteilla, L., 1998. High expression of leptin by human bone marrow adipocytes in primary culture. *The FASEB Journal*, 12, 747-752.
- Lai, Z., Emtner, M., Roos, P. y Nyberg, F., 1991. Characterization of putative growth hormone receptors in human choroid plexus. *Brain Research*, 546, 222-226.
- Lamb, C.F., 2001. Gustation and feeding behaviour. En: *Food intake in fish*. Houlihan, D.; Boujard, T.; Jobling, M. (Eds). Blackwell Science, Cornwall. pp. 108-130.
- Lamb, C.F. y Carpio, J., 1992. Convergence of oral and extraoral information in the superior secondary gustatory nucleus of the channel catfish. *Brain Research*, 588, 201-211.
- Lamb, C.F. y Carpio, J., 1993. Taste and tactile responsiveness of neurons in the posterior diencephalons of the channel catfish. *Journal of Comparative Neurology*, 337, 419-430.
- Lambert, Y. y Dutil, J.-D., 2001. Food intake and growth of adult Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) reared under different conditions of stocking density, feeding frequency and size-grading. *Aquaculture*, 192, 233-247.
- Lambert, P.D., Wilding, J.P., al-Dokhayel, A.A., Bohuon, C., Comoy, E., Gilbey, S.G. y Bloom, S.R., 1993. A role for neuropeptide-Y, dynorphin, and noradrenalin in the central control of food intake after food-deprivation. *Endocrinology*, 133, 29-32.
- Lambert, P.D., Wilding, J.P., Al-Dokhayel, A.A., Gilbey, S.G., Ghatei, M.A. y Bloom, S.R., 1994a. Naloxone-induced anorexia increases neuropeptide Y concentrations in the dorsomedial hypothalamus: evidence for neuropeptide Y-opioid interactions in the control of food intake. *Peptides*, 15, 657-660.
- Lambert, Y., Dutil, J.-D. y Munro, J., 1994b. Effects of intermediate and low salinity conditions on growth rate and food conversion of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51, 1569-1576.

- Lambert, P.D., Couceyro, P., McGirr, K.M., Vechia, S.E.D., Smith, Y. y Kuhar, M.J., 1998. CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse*, 29, 293-298.
- Lanari, D., Poli, B.M., Ballestrazzi, R., Lupi, P., D'Agaro, E. y Mecati, M., 1999. The effects of dietary fat and NFE levels on growing European seabass (*Dicentrarchus labrax*): growth rate, body and fillet composition, carcass traits and nutrient retention efficiency. *Aquaculture*, 179, 351-364.
- Landless, P.J., 1976. Demand feeding behaviour of rainbow trout. *Aquaculture*, 7, 11-25.
- Larhammar, D., 1996. Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regulatory Peptides*, 62, 1-11.
- Larson, E.T. y Summers, C.H., 2001. Serotonin reverses dominant social status. *Behavioural Brain Research*, 121, 95-102.
- Lauff, R.F. y Wood, C.M., 1996. Respiratory gas exchange, nitrogenous waste excretion, and fuel usage during starvation in juvenile rainbow trout. *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Comparative Physiology*, 165B, 542-551.
- Laurent, P. y Dunel-Erb, S., 1984. The pseudobranch: morphology and function. En: *Fish Physiology*. Hoar, W.S. (Ed.), Academic Press, New York, vol.10B, pp. 285-320.
- Lavin, J.H. y Read, N.W., 1995. The effect on hunger and satiety of slowing the absorption of glucose: relationship with gastric emptying and postprandial blood glucose and insulin responses. *Appetite*, 25, 89-96.
- Lavin, J.H., Wittert, G., Andrews, J., Yeap, B., Wishart, J.M., Morris, H.A., Morley, J.E., Horowitz, M. y Read, N.W., 1998. Interaction of insulin, glucagon-like peptide 1, gastric inhibitory polypeptide, and appetite in response to intraduodenal carbohydrate. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 591-598.
- Le Bail, P.Y. y Bœuf, G., 1997. What hormones may regulate food intake in fish? *Aquatic Living Resources*, 10, 371-379.
- Le Feuvre, R.A., Aisenthal, L. and Rothwell, N.J., 1991. Involvement of corticotropin-releasing factor (CRF) in the thermogenic and anorexic actions of serotonin (5-HT) y related compounds. *Brain Research*, 555, 245-250.
- Le Magnen, J., 1956. Hyperphagie provoquée chez le rat blanc par l'altération du mécanisme de satiété périphérique. *Comptes Rendus de la Société de Biologie*, 147, 1753-1757.
- Le Mével, J.C., Mabin, D., Hanley, A.M. y Conlon, J.M., 1998. Contrasting cardiovascular effects following central and peripheral injections of trout galanin in the trout. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 275, R1118-R1126.
- Leatherland, J.F., 1994. Reflections on the thyroidology of fishes: from molecules to human-kind. *Guelph Ichthyology Reviews*, 2, 1-67.
- Leatherland, J.F. y Nuti, R.N., 1981. Effects of bovine growth hormone on plasma free fatty acid concentration and liver, muscle and carcass lipid content in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Journal of Fish Biology*, 19, 487-498.
- Leatherland, J.F. y Farbridge, K.J., 1992. Chronic fasting reduces the response of the thyroid to growth hormone and TSH, and alters the growth hormone-related changes

- in hepatic 5'-mopnodeiodinase activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 87, 342-353.
- Lee, L.T.O., Nong, G., Chan, Y.H., Tse, D.L.Y. y Cheng, C.H.K., 2001. Molecular cloning of a teleost growth hormone receptor and its functional interaction with human growth hormone. *Gene*, 270, 121-129.
- Legate, N.J., Bonen, A. y Moon, T.W., 2001. Glucose tolerance and peripheral glucose utilization in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), the American eel (*Anguilla rostrata*) and the black bullhead catfish (*Ameiurus melas*). *General and Comparative Endocrinology*, 122, 48-59.
- Legris, G.J., Will, P.C. y Hopfer, U., 1982. Inhibition of amiloridesensitive sodium conductance by indoleamines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 2040-2050.
- Leibowitz, S.F., 1990. The role of serotonin in eating disorders. *Drugs*, 39: 33-48.
- Leibowitz, S.F., 2000. Macronutrients and brain peptides: what they do and how they respond. En: *Neural and Metabolic Control of Macronutrient Intake*. Berthoud, H.-R. y Seeley, R.J. (Eds.). CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 389-406.
- Leibowitz, S.F. y Alexander, J.T., 1998. Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight. *Biological Psychiatry*, 44, 851-864.
- Leibowitz, S.F. y Hoebel, B.G., 1998. Behavioral neuroscience and obesity. En: *The handbook of obesity*. Bray, G., Bouchard, C. y James, P.T. (Eds.). Marcel Dekker, New York, pp. 313-359.
- Leibowitz, S.F., Weiss, G.F., Walsh, U.A. y Viswanath, D., 1989. Medial hypothalamic serotonin: role in circadian patterns of feeding and macronutrient selection. *Brain Research*, 503, 132-140.
- Leibowitz, S.F., Weiss, G.F. y Suh, J.S., 1990. Medial hypothalamic nuclei mediate serotonin's inhibitory effect on feeding behavior. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 37, 735-742.
- Leibowitz, S.F., Akabayashi, A. y Wang, J., 1998a. Obesity on a high-fat diet: role of hypothalamic galanin in neurons of the anterior paraventricular nucleus projecting to the median eminence. *The Journal of Neuroscience*, 18, 2709-2719.
- Leibowitz, S.F., Akabayashi, A., Alexander, J.T. y Wang, J., 1998b. Gonadal steroids and hypothalamic galanin and neuropeptide Y: role in eating behavior and body weight control in female rats. *Endocrinology*, 139, 1771-1780.
- Leung, T.C., Ng, T.B. y Woo, N.Y.S., 1991. Metabolic effects of bovine growth hormone in the tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 99A, 633-636.
- Levine, A.S. y Billington, C.J., 1989. Opioids: are they regulators of feeding. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 575, 209-219.
- Levine, A.S. y Billington, C.J., 1997. Why do we eat? A neural systems approach. *Annual Review of Nutrition*, 17, 597-619.
- Li, E.T.S. y Anderson, G.H., 1982. Meal composition influences subsequent food selection in the young rat. *Physiology & Behavior*, 29, 779-783.
- Li, Y., Hao, Y. y Owyang, C., 1997. High-affinity CCK-A receptors on the vagus nerve media-

- te CCK-stimulated pancreatic secretion in rats. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 273, G679-G685.
- Likongwe, J.S., Stecko, T.D., Stauffer, J.R. y Carline, R.F., 1996. Combined effects of water temperature and salinity on growth and feed utilization of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus). *Aquaculture*, 146, 37-46.
- Lin, M.T., Chu, P.C. y Leu, S.Y., 1983. Effects of TSH, TRH, LH and LHRH on thermoregulation and food and water intake in the rat. *Neuroendocrinology*, 37, 206-211.
- Lin, X.W., Lin, H.R. y Peter, R.E., 1993. The regulatory effects of thyrotropin-releasing hormone on growth hormone secretion from the pituitary of common carp in vitro. *Fish Physiology and Biochemistry*, 11, 1-6.
- Lin, L., York, D.A y Bray, G.A., 1996. Comparison of Osborne-Mendel and S5B/PL strains of rat: central effects of galanin, NPY, beta-casomorphin and CRH on intake of high-fat and low-fat diets. *Obesity Research*, 4, 117-124.
- Lin, X., Volkoff, H., Narnaware, Y., Bernier, N.J., Peyon, P. y Peter, R.E., 2000. Brain regulation of feeding behavior and food intake in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 126, 415-434.
- Liu, L., Karkanas, G.B., Morales, J.C., Hawkins, M., Barzilai, N., Wang, J. Y Rossetti, L., 1998. Intracerebroventricular leptin regulates hepatic but not peripheral glucose fluxes. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 31160-31167.
- Londraville, R.L. y Duvall, C.S., 2002. Murine leptin injections increase intracellular fatty acid-binding protein in green sunfish (*Lepomis cyanellus*). *General and Comparative Endocrinology*, 129, 56-62.
- López-Patiño, M.A., Gujjarro, A.I., Isorna, E., Delgado, M.J., Alonso-Bedate, M. y De Pedro, N., 1999. Neuropeptide Y has a stimulatory action on feeding behavior in goldfish (*Carassius auratus*). *European Journal of Pharmacology*, 377, 147-153.
- López-Patiño, M.A., Gujjarro, A.I., Pinillos, M.L., et al., 1999. Is the opioid system involved in the regulation of feeding behavior and body weight in fish? *Dolor*, 14, 55.
- Lotti, V.J. y Chang, R.S.L., 1989. A new potent and selective non-peptide gastrin antagonist and brain cholecystokinin receptor (CCK-B) ligand: L-365,260. *European Journal of Pharmacology*, 162, 273-280.
- Lotti, V.J., Pendleton, R.G., Gould, R.J., Hanson, H.M., Chang, R.S.L. y Clineschmidt, B.V., 1987. In vivo pharmacology of L-364,718, a new potent nonpeptide peripheral cholecystokinin antagonist. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 241, 103-109.
- Lyttikäinen, T. y Ruohonen, K., 2001. The acute effect of cortisol implant on self-feeding activity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 32, 503-505.
- Magnhagen, C., 1988. Changes in foraging as a response to predation risk in two gobiid fish species, *Pomatoschistus minutes* and *Gobius niger*. *Marine Ecology Progress Series*, 49, 21-26. Citado en: Kestemont, P. y Baras, E., 2001. Environmental factors and feed intake: mechanism and interactions. En: Houlihan, D., Jobling, M., Boujard, T., editors. *Food intake in fish*. Great Britain: Blackwell Science Ltd.; 2001. p. 131-156.

- Mallekh, R., Lagardère, J.P., Bégout-Anras, M.L. y Lafaye, J.Y., 1998. Variability in appetite of turbot *Scophthalmus maximus* under intensive rearing conditions: the role of environmental factors. *Aquaculture*, 165, 123-138.
- Mamoun, A.H., Bergstrom, J. y Sodersten, P., 1997. Cholecystokinin octapeptide inhibits carbohydrate but not protein intake. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 273, R972-R980.
- Mancera, J.M. y McCormick, S.D., 1998. Evidence for growth hormone/insulin-like growth factor I axis regulation of seawater acclimation in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*. *General and Comparative Endocrinology*, 111, 103-112.
- Mancera, J.M. y McCormick, S.D., 1999. Influence of cortisol, growth hormone, insulin-like growth factor I and 3,3',5-triiodo-L-thyronine on hypoosmoregulatory ability in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 21, 25-33.
- Mancera, J.M., Fernández-Llebrez, P., Grondona, J.M. y Pérez-Figares, J.M., 1993. Influence of environmental salinity on prolactin and corticotropic cells in the euryhaline gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *General and Comparative Endocrinology*, 90, 220-231.
- Mancera, J.M., Pérez-Figares, J.M. y Fernández-Llebrez, P., 1994. Effect of cortisol on brackish water adaptation in the euryhaline gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 107A, 397-402.
- Mancera, J.M., Laiz Carrión, R. y Martín del Río, M.P., 2002. Osmoregulatory action of PRL, GH, and cortisol in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *General and Comparative Endocrinology*, 129, 95-103.
- Mancilla-Díaz, J.M., Escartín-Pérez, R.E., López-Alonso, V.E. y Cruz-Morales, S.E., 2002. Effect of 5-HT in mianserin-pretreated rats on the structure of feeding behavior. *European Neuropsychopharmacology*, 12, 445-451.
- Maragoudaki, D., Paspatis, M. y Kentouri, M., 1999. Influence of stocking density on growth of juvenile red porgy *Pagrus pagrus* L. under different feeding conditions. *Aquaculture Research*, 30, 501-508.
- Maragoudaki, D., Paspatis, M. y Kentouri, M., 2001. Growth and feeding responses of juvenile red porgy to restrictive self-feeding regimes. *Aquaculture International*, 9, 153-170.
- Mårtensson, L.G.E. y Andersson, R.G.G., 1996. A melatonin binding site modulates the $\alpha 2$ -adrenoceptor. *Life Science*, 58, 525-533.
- Martin, R.J., White, B.D. y Hulsey, M.G., 1991. The regulation of body weight. *American Scientist*, 79, 528-541.
- Martin, M.T., Azpiroz, F., Malagelada, J.-R., 1998. Melatonin in the gastrointestinal tract. *Thérapie*, 53, 453-458.
- Matson, C.A. y Ritter, R.C., 1999. Long-term CCK-leptin synergy suggests a role for CCK in the regulation of body weight. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 276, R1038-R1045.
- Matson, C.A., Wiater, M.F., Kuijper, J.L. y Weigle, D.S., 1997. Synergy between leptin and cholecystokinin (CCK) to control daily caloric intake. *Peptides*, 18, 1275-1278.
- Matson, C.A., Reid, D.F., Cannon, T.A. y Ritter, R.C., 2000. Cholecystokinin and leptin act

- synergistically to reduce body weight, *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 278, R882–R890.
- Matson, C.A., Reid, D.F. y Ritter, R.C., 2002. Daily CCK injection enhances reduction of body weight by chronic intracerebroventricular leptin infusion. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 282, R1368–R1373.
- Matsuno, A.Y. y Thibault, L., 1995. Effect of sucrose and fructose macronutrient diets on feeding behavior in rats. *Physiology & Behavior*, 58, 1277–1280.
- Matzinger, D., Gutzwiller, J.-P., Drewe, J., Orban, A., Engel, R., D'Amato, M., Rovati, L. y Beglinger, C., 1999. Inhibition of food intake in response to intestinal lipid is mediated by cholecystokinin in humans. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 277, R1718–R1724.
- Matzinger, D., Degen, L., Drewe, J., Meuli, J., Duebendorfer, R., Ruckstuhl, N., D'Amato, M., Rovati, L. y Beglinger, C., 2000. The role of long-chain fatty acids in regulating food intake and cholecystokinin release in humans. *Gut*, 46, 688–693.
- McDonald, T.J., Dupre, J., Tatemoto, K., Greenberg, G.R., Radziuk, J. y Mutt, V., 1985. Galanin inhibits insulin secretion and induces hyperglycemia in dogs. *Diabetes*, 34, 192–196.
- McCormick, S.D., 1996. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on salinity tolerance and gill Na⁺, K⁺-ATPase in atlantic salmon (*Salmo salar*): interaction with cortisol. *General and Comparative Endocrinology*, 101, 3–11.
- McCormick, S.D., 2001. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *American Zoologist*, 41, 781–794.
- McCormick, S.D., Sakamoto, T., Hasegawa, S. y Hirano, T., 1991. Osmoregulatory actions of insulin-like growth factor-I in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Endocrinology*, 130, 87–92.
- McCormick, S.D., Björnsson, B.T., Sheridan, M., Eilertson, C., Carey, J.B. y O'Dea, M., 1995. Increased daylength stimulates plasma growth hormone and gill Na⁺, K⁺-ATPase in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Comparative Physiology B*, 165, 245–254.
- McCormick, S.D., Moriyama, S. y Björnsson, B.Th., 2000. Low temperatures limits the photoperiod control of smolting an Atlantic salmon through endocrine mechanism. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 278, R1352–R1361.
- McCormick, S.D., O'Dea, M.F., Moeckela, A.M. y Björnsson, B.Th., 2003. Endocrine and physiological changes in Atlantic salmon smolts following hatchery release. *Aquaculture*, 222, 45–57.
- McCoy, J.G. y Avery, D.D., 1990. Bombesin: Potential integrative peptide for feeding and satiety. *Peptides*, 11, 595–607.
- McCoy, J.G., Stump, B. y Avery, D.D., 1990. Intake of individual macronutrients following IP injections of BBS and CCK in rats. *Peptides*, 11, 221–225.
- McDonald, T.J., Jonvall, H., Nilsson, G., Vagne, M., Ghatei, M., Bloom, S.R. y Mutt, V., 1979. Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 90, 227–233.

- McGowan, M.K., Andrews, K.M., Kelly, J. y Grossman, S.P., 1990. Effects of chronic intrahypothalamic infusion of insulin on food intake and diurnal meal patterning in the rat. *Behavioral Neuroscience*, 104, 373-385.
- McHugh, P.R. y Moran, T.H., 1986. The inhibition of feeding produced by direct intraintestinal infusion of glucose: Is this satiety? *Brain Research Bulletin*, 17, 415-418.
- McKay, L.R. y Gjerde, B., 1985. The effect of salinity on growth of rainbow trout. *Aquaculture*, 49, 325-331.
- McLaughlin, C.L. y Baile, C.A., 1981. Obese mice and the satiety effects of cholecystokinin, bombesin and pancreatic polypeptide. *Physiology & Behavior*, 26, 433-437.
- McMahon, L.R. y Wellman, P.J., 1998. PVN infusion of GLP-I-(7-36)amide suppresses feeding but does not induce aversion or alter locomotion in rats. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 274, R23-R29.
- Meeran, K., O'Shea, D., Edwards, C.M.B., Turton, M.D., Heath, M.M., Gunn, I., Abusnana, S., Rossi, M., Small, C.J., Goldstone, A.P., Taylor, G.M., Sunter, D., Steere, J., Choi, S.J., Ghatei, M.A. y Bloom, S.R., 1999. Repeated intracerebroventricular administration of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide or exendin-(9-39) alters body weight in the rat. *Endocrinology*, 140, 244-250.
- Mei, N., 1978. Vagal glucoreceptors in the small intestine of the cat. *Journal of Physiology, London*, 282, 485.
- Melone, J., 1986. Vagal receptors sensitive to lipids in the small intestine of the cat. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 17, 231.
- Menzaghi, F., Heinrichs, S.C., Pich, E.M., Tilders, F.J. y Koob, G.F., 1993. Functional impairment of hypothalamic corticotropin-releasing factor neurons with immunotargeted toxins enhances food intake induced by neuropeptide Y. *Brain Research*, 618, 76-82.
- Merali, Z., McIntosh, J. y Anisman, H., 1999. Role of bombesin-related peptides in the control of food intake. *Neuropeptides*, 33, 376-386.
- Mercer, J.G., Moar, K.M. y Hoggard, N., 1998. Localization of leptin receptor Ob-R messenger ribonucleic acid in the rodent hindbrain. *Endocrinology*, 139, 29-34.
- Mercer, J.G. y Speakman, J.R., 2001. Hypothalamic neuropeptide mechanisms for regulating energy balance: from rodent models to human obesity. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25, 101-116.
- Merchenthaler, I., López, F.J. y Negro-Vilar, A., 1993. Anatomy and physiology of central galanin-containing pathways. *Progress in Neurobiology*, 40, 711-769.
- Metcalfe, N.B., Huntingford, F.A. y Thorpe, J.E., 1987. The influence of predation risk on the feeding motivation and foraging strategy of juvenile Atlantic salmon. *Animal Behavior*, 35, 901-911.
- Meyer, J.H., Hlinka, M., Tabrizi, Y., DiMaso, N. y Raybould, H.E., 1998a. Chemical specificities and intestinal distributions of nutrient-driven satiety. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 275, R1293-R1307.
- Meyer, J.H., Hlinka, M., Khatibi, A., Raybould, H.E. y Tso, P., 1998b. Role of small intestine in caloric compensations to oil premeals in rats. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 275, R1320-R1333.
- Michel, M.C., Beck-Sickinger, A., Cox, H., Doods, H.N., Herzog, H., Larhammar, D., Quirion,

- R., Schwartz, T. y Westfall, T., 1998. XVI. International union of pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacological Reviews*, 50, 143-150.
- Miglavs, I. y Jobling, M., 1989. The effects of feeding regime on proximate body composition and patterns of energy deposition in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Journal of Fish Biology*, 35, 1-11.
- Minguez, J.M., Simonneaux, V. y Pevet, P., 1997. The role of the intracellular and extracellular serotonin in the regulation of melatonin production in rat pinealocytes. *Journal of Pineal Research*, 23, 63-71.
- Mojsov, S., Weir, G.C. y Habener, J.F., 1987. Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. *The Journal of Clinical Investigation*, 79, 616-619.
- Moltz, J.H. y MacDonald, J.K., 1985. Neuropeptide Y: Direct and indirect action on insulin secretion in the rat. *Peptides*, 6, 1155-1159.
- Mommsen, T.P., 1998. Growth and Metabolism. En: *The physiology of fishes*. Evans, D.H. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, pp. 65-97.
- Mommsen, T.P. y Moon, T.W., 1989. Metabolic actions of glucagon-family in liver. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7, 279-288.
- Mommsen, T.P. y Moon, T.W., 1990. Metabolic response of teleost hepatocytes to glucagon-like peptide and glucagon. *The Journal of Endocrinology*, 126, 109-115.
- Mommsen, T.P. y Plisetskaya, E.M., 1991. Insulin in fishes and agnathans: history, structure and metabolic regulation. *Reviews in Aquatic Sciences*, 4, 225-259.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M. y Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9, 211-268.
- Monnet, F.P., 2002. Melatonin modulates [3H]serotonin release in the rat hippocampus: effects of circadian rhythm. *Journal of Neuroendocrinology*, 14, 194-199.
- Monnikes, H., Heymann-Monnikes, I. y Tache, Y., 1992. CRF in the paraventricular nucleus of the hypothalamus induces dose-related behavioral profile in rat. *Brain Research*, 574, 70-76.
- Montero, D., Izquierdo, M.S., Tort, L., Robaina, L. y 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.
- Moon, T.W., 2001. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comparative Biochemistry and Physiology*, 129B, 243-249.
- Moons, L., Batten, T.F. y Vandesande, F., 1992. Comparative distribution of substance P (SP) and cholecystokinin (CCK) binding sites and immunoreactivity in the brain of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Peptides*, 13, 37-46.
- Moran, T.H., 2000. Cholecystokinin and satiety: current perspectives. *Nutrition*, 16, 858-865.
- Moran, T.H., Robinson, P.H., Goldrich, M.S. y McHugh, P.R., 1986. Two brain cholecystokinin receptors: implications for behavioral actions. *Brain Research*, 362, 175-179.

- Moran, T.H., Katz, L.F., Plata-Salaman, C.R. y Schwartz, G.J., 1998. Disordered food intake and obesity in rats lacking cholecystokinin A receptors. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 274, R618-R625.
- Moretti, A., Pedini Fernández-Criado, M., Cittolin, G. y Guidastri, R., 1999. Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream. Volume 1. FAO, Roma.
- Morgan, J.D., Sakamoto, T., Grau, E.G. y Iwama, G.K., 1997. Physiological and respiratory responses of the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to salinity acclimation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 117A, 391-398.
- Morimoto, I., Yamamoto, S., Kai, K., Fujihira, T., Morita, E. y Eto, S., 2000. Centrally administered murine-leptin stimulates the hypothalamus-pituitary-adrenal axis through arginine-vasopressin. *Neuroendocrinology*, 71, 366-374.
- Morin, P.P., Andersen, O., Haug, E. y Doving, K.B., 1994. Changes in serum free thyroxine, prolactin, and olfactory activity during induced smoltification in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51, 1985-1992.
- Mork, O.I., 1982. Growth of three salmonid species in mono- and double culture (*Salmo salar* L., *S. trutta* L. and *S. gairdneri* Rich.). *Aquaculture*, 27, 141-147.
- Morley, J.E., 1987. Neuropeptide regulation of appetite and weight. *Endocrine Reviews*, 8, 256-287.
- Morley, J.E. y Levine, A.S., 1982. Corticotrophin releasing factor, grooming and ingestive behavior. *Life Sciences*, 31, 1459-1464.
- Morley, J.E., Bartness, T.J., Gosnell, B.A. y Levine, A.S., 1985. Peptidergic regulation of feeding. *International Reviews of Neurobiology*, 27, 207-298.
- Mountjoy, K.G., Mortrud, M.T., Low, M.J., Simerly, R.B. y Cone, R.D., 1994. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Molecular Endocrinology*, 8, 1289-1308.
- Mueller, W.M., Gregoire, F.M., Stanhope, K.L., Mobbs, C.V., Mizuno, T.M., Warden, C.H., Stern, J.S. y Havel, P.J., 1998. Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. *Endocrinology*, 139, 551-558.
- Mullen, B.J. y Martin, R.J., 1992. The effect of dietary fat on diet selection may involve central serotonin. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 263, R559-R563.
- Muoio, D.M., Dohn, G.L., Fiedorek, F.T. Jr, Tapscott, E.B. y Coleman, R.A., 1997. Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes*, 46, 1360-1363.
- Muruzabal, F.J., Fruhbeck, G., Gomez-Ambrosi, J., Archanco, M. y Burrell, M.A., 2002. Immunocytochemical detection of leptin in non-mammalian vertebrate stomach. *General and Comparative Endocrinology*, 128, 149-152.
- Mustonen, A.-M., Nieminen, P. y Hyvärinen, H., 2002. Leptin, ghrelin, and energy metabolism of the spawning burbot (*Lota lota*, L.). *Journal of Experimental Zoology*, 293, 119-126.
- Nagalia, S.R., Barry, B.J., Creswick, K.C., Eden, P., Taylor, J.T. y Spindel, E.R., 1995. Cloning of a receptor for amphibian [Phe13]bombesin distinct from the receptor for gastrin-releasing peptide: Identification of a fourth bombesin receptor subtype (BB4). *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 92, 6205-6209.

- Nagata, A., Ito, M., Iwata, N., Kuno, J., Takano, H., Minowa, O., Chihara, K., Matsui, T. y Noda, T., 1996. G protein-coupled cholecystokinin-B/gastrin receptors are responsible for physiological cell growth of the stomach mucosa in vivo. *Proceeding of the National Academy of Science of USA*, 93, 11825–11830.
- Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang, A.C.Y., Cohen, S.N. y Numa, S., 1979. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-b-lipotropin precursor. *Nature*, 278, 423–427.
- Nakano, K., Tagawa, M., Takemura, A. y Hirano, T., 1998. Temporal changes in liver carbohydrate metabolism associated with seawater transfer in *Oreochromis mossambicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 119B, 721–728.
- Nambu, T., Sakurai, T., Mizukami, K., Hosoya, Y., Yanagisawa, M. y Goto, K., 1999. Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Research*, 827, 243–260.
- Narnaware, Y.K. y Peter, R.E., 2001a. Effects of food deprivation and refeeding on neuropeptide Y mRNA levels in goldfish. *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*, 129, 633–637.
- Narnaware, Y.K. y Peter, R.E., 2001b. Neuropeptide Y stimulates food consumption through multiple receptors in goldfish. *Physiology & Behavior*, 74, 185–190.
- Narnaware, Y.K., Peyon, P.P., Lin, X.W. y Peter, R.E., 2000. Regulation of food intake by neuropeptide Y (NPY) in goldfish. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 279, R1025–R1034.
- Näslund, E., Bogefors, J., Skogar, S., Grybäck, P., Jacobsson, H., Hoist, J.J. y Hellström, P.M., 1999. Glucagon-like peptide-1 slows solid gastric emptying with inhibition of insulin, C-peptide, glucagon and peptide YY release in humans. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 277, R910–R916.
- Näslund, E., Hellström, P.M. y Kral, J.G., 2001. The gut and food intake: an update for surgeons. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 5, 556–567.
- Nauck, M.A., Niedereichholz, U., Ettler, R., Holst, J.J., Ørskov, C., Ritzel, R. y Schmeigel, W.H., 1997. Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 273, E981–E988.
- Navarro, I. y Moon, T.W., 1994. Glucagon binding to hepatocytes isolated from two teleost fishes, the American eel and the brown bullhead. *The Journal of Endocrinology*, 140, 217–227.
- Navarro, I. y Gutiérrez, J., 1995. Fasting and starvation. En: *Biochemistry and molecular biology of fishes*. Hochachka, P.W. y Mommsen, T.P. (Eds). Elsevier, Amsterdam, vol. 4, pp. 393–434.
- Navarro, I., Carneiro, M.N., Parrizas, M., Maestro, J., Planas, J. y Gutiérrez, J., 1993. Post-feeding levels of insulin and glucagons in trout (*Salmo trutta fario*). *Comparative Physiology and Biochemistry*, 104A, 398–393.
- Navarro, I., Leibush, B., Moon, T.W., Plisetskaya, E.M., Baños, N., Méndez, E., Planas, J.V. y Gutiérrez, J., 1999. Insulin, insulin-like growth factor I (IGF-I) and glucagon: the evolution of their receptors. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 122B, 137–153.

- Nichols, D.J., Weisbart, M. y Quinn, J., 1985. Cortisol kinetics and fluid distribution in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *The Journal of Endocrinology*, 107, 57-69.
- Nicieza, A.G. y Metcalfe, N.B., 1997. Effects of light level and growth history on attack distances of visually foraging juvenile salmon in experimental tanks. *Journal of Fish Biology*, 51, 643-649.
- Nordrum, S., Bakke-McKellep, A.M., Krogdahl, Å. y Buddington, R.K., 2000. Effects of soybean meal and salinity on intestinal transport of nutrients in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 125B, 317-335.
- Nordvedt, R. y Holm, J.C., 1991. Atlantic salmon in duoculture with Arctic charr: decreased aggression enhances growth and stocking density potential. *Aquaculture*, 98, 355-361.
- Notenboom, C.D., Garaud, J.C., Doerr-Schott, J. y Terlou, M., 1981. Localization by immunofluorescence of a gastrin-like substance in the brain of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell & Tissue Research*, 214, 247-255.
- O'Connor, P.K., Reich, B. y Sheridan, M.A., 1993. Growth hormone stimulates hepatic lipid mobilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Comparative Physiology*, 163B, 427-431.
- Ogawa, Y., Masuzaki, H., Isse, N., Okazaki, T., Mori, K., Shigemoto, M., Stoh, N., Tamura, N., Hosoda, K., Yoshimasa, Y., Jingami, H., Kawada, T. y Nakao, K., 1995. Molecular cloning of rat obese cDNA and augment gene expression in genetically obese Zucker fatty (*fa/fa*) rats. *The Journal of Clinical Investigation*, 96, 1647-1652.
- Okawara, Y., Morley, S.D., Burzio, L.O., Zwiers, H., Lederis, K. y Richter, D., 1988. Cloning and séquence analysis of cDNA for corticotropin-releasing factor precursor from the teleost fish *Catostomus commersoni*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 85, 8439-8443.
- Okawara, Y., Ko, D., Morley, S.D., Richter, D. y Lederis, K.P., 1992. In situ hybridization of corticotropin-releasing factor-encoding messenger RNA in the hypothalamus of the white sucker, *Catostomus commersoni*. *Cell and Tissue Research*, 267, 545-549.
- Okuta, A., Ando, H., Ueda, H. y Urano, A., 1996. Two types of cDNAs encoding proopiomelanocortin of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. *Zoological Science*, 13, 421-427.
- Olsson, C. y Holmgren, S., 2001. The control of gut motility. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 128A, 481-503.
- Olsson, C., Aldman, G., Larsson, A. y Holmgren, S., 1999. Cholecystokinin affects gastric emptying and stomach motility in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *The Journal of Experimental Biology*, 202, 161-170.
- Orlando, G., Brunetti, L. y Chiara, D.N., 2001. Effects of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide, leptin and orexins on hypothalamic serotonin release. *European Journal of Pharmacology*, 430, 269-272.
- Orosco, M., Gerozissis, K. y Nicolaidis, S., 2000a. Effects of pure macronutrient diets on 5-HT release in the rat hypothalamus: relationship to insulin secretion and possible mechanism for feedback control of fat and carbohydrate ingestion. En: *Neural and*

- Metabolic Control of Macronutrient Intake*. Berthoud, H.-R. y Seeley, R.J. (Eds.). CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 447-454.
- Orosco, M., Rouch, C. y Gerozissis, K., 2000b. Activation of hypothalamic insulin by serotonin is the primary event of the insulin-serotonin interaction involved in the control of feeding. *Brain Research*, 872, 64-70.
- Orozco, A., Villalobos, P. y Valverde, R.C., 2002. Environmental salinity selectively modifies the outer-ring deiodinating activity of liver, kidney and gill in the rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 131A, 387-395.
- Orskov, C., Poulsen, S.S., Møller, M. y Holst, J.J., 1996. Glucagonlike peptide I receptors in the subfornical organ and the area postrema are accessible to circulating glucagon-like peptide I. *Diabetes*, 45, 832-835.
- Osborn, R.H., Simpson, T.H. y Youngson, A.F., 1978. Seasonal and diurnal rhythms of thyroidal status in the rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 12, 531-540.
- Ozaki, Y. y Lynch, H.J., 1976. Presence of melatonin in plasma and urine of pinealectomized rats. *Endocrinology*, 99, 641-644.
- Øverli, Ø., Winberg, S., Damsgård, B. y Jobling, M., 1998. Food intake and spontaneous swimming activity in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.): Role of brain serotonergic activity and social interaction. *Canadian Journal of Zoology*, 76, 1366-1370.
- Øverli, Ø., Harris, C. A. y Winberg, S., 1999. Short-term effects of fights for social dominance and the establishment of dominant-subordinate relationships on brain monoamines and cortisol in rainbow trout. *Brain, Behavior and Evolution*, 54, 263-275.
- Pages, N., Gourch, A., Orosco, M., Comoy, E., Bohuon, C., Rodriguez, M., Martinez, J., Jacquot, C. y Cohen, Y., 1990. Changes in brain neuropeptide Y induced by cholecystokinin peptides. *Neuropeptides*, 17, 141-145.
- Palmer, T.N. y Ryman, B.E., 1972. Studies on glucose intolerance in fish. *Journal of Fish Biology*, 4, 311-319.
- Papoutsoglou, S.E., Paraskeva-Papoutsoglou, E. y Alexis, M.N., 1987. Effect of density on growth rate and production of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) over a full rearing period. *Aquaculture*, 66, 9-17.
- Parker, D.B., Power, M.E., Swanson, P., Rivier, J. y Sherwood, N.M., 1997. Exon skipping in the gene encoding pituitary adenylate cyclase-activating peptide in salmon alters the expression of two hormones that stimulate growth hormone release. *Endocrinology*, 138, 414-423.
- Párrizas, M., Planas, J., Plisetskaya, E.M. y Gutiérrez, J., 1994a. Insulin receptor and its tyrosine kinase activity in skeletal muscle of carnivorous and omnivorous fish. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 266, R1944-R1950.
- Párrizas, M., Baños, N., Baró, J., Planas, J. y Gutiérrez, J., 1994b. Up-regulation of insulin binding in fish skeletal muscle by high insulin levels. *Regulatory Peptides*, 53, 211-222.
- Partridge, G.J. y Jenkins, G.I., 2002. The effect of salinity on growth and survival of juvenile black bream (*Acanthopagrus butcheri*). *Aquaculture*, 210, 219-230.

- Paspatis, M. y 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.
- Paspatis, M., Boujard, T., Maragoudaki, D., Blanchard, G. y Kentouri, M., 2003. Do stocking density and feed reward level affect growth and feeding of self-fed juvenile European sea bass?. *Aquaculture*, 216, 103-113.
- Patiño, R., Schrek, C.B., Banks, J.L. and Zaugg, W.S. 1987. Effects of density on the developmental physiology of smolting coho salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, 115, 828-837.
- Pavlidis, M., Berry, M., Divanach, P. y Kentouri, M., 1997. Diel pattern of haematocrit, serum metabolites, osmotic pressure, electrolytes and thyroid hormones in sea bass and sea bream. *Aquaculture International*, 5, 237-247.
- Pavlidis, M., Paspatis, M., Koistinen, M., Paavola, T. y Divanach, P., 1999. Diel rhythms of serum metabolites and thyroid hormones in red porgy held in different photoperiod regimes. *Aquaculture International*, 7, 29-44.
- Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T. y Collins, F., 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in *ob/ob* mice. *Science*, 269, 540-543.
- Peng, C. y Peter, R.E., 1997. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion and growth in fish. *Zoological Studies*, 36, 79-89.
- Peng, C., Gallin, W., Peter, R.E., Blomqvist, G. y Larhammar, D., 1994. Neuropeptide Y gene expression in the goldfish brain: distribution and regulation by ovarian steroids. *Endocrinology*, 134, 1095-1103.
- Pentney, R.T. y Bubenik, G.A., 1995. Melatonin reduces the severity of dextran-induced colitis in mice. *Journal of Pineal Research*, 19, 31-39.
- Peres, H. y Oliva-Teles, A., 1999a. Effect of dietary lipid level on growth performance and feed utilization by European seabass juveniles (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 179, 325-334.
- Peres, H. y Oliva-Teles, A., 1999b. Influence of temperature on protein utilization in juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 170, 337-348.
- Peres, H. y Oliva-Teles, A., 2002. Utilization of raw and gelatinized starch by European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 205, 287-299.
- Peres, H., Gonçalves, P. y Oliva-Teles, A., 1999. Glucose tolerance in seabream (*Sparus aurata*) and in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 179, 415-432.
- Perez, C., Ackroff, K. y Sclafani, A., 1996. Carbohydrate- and protein-conditioned flavor preferences: effects of nutrient preloads. *Physiology & Behavior*, 59, 467-474.
- Pérez, L., González, M., Jover, M. y Fernández, J.C., 1997. Growth of European seabass fingerlings (*Dicentrarchus labrax*) fed extruded diets containing varying levels of protein, lipid and carbohydrate. *Aquaculture*, 156, 183-193.
- Pérez-Sánchez, J., 2000. The involvement of growth hormone in growth regulation, energy homeostasis and immunefunction in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*): a short review. *Fish Physiology and Biochemistry*, 22, 135-144.
- Pérez-Sánchez, J., Martí-Palanca, H. Y Le Bail, P.-Y., 1994. Homologous growth hormone

- (GH) binding in gilthead seabream (*Sparus auratus*). Effect of fasting and refeeding on hepatic GH-binding and plasma somatomedin-like immunoreactivity. *Journal of Fish Biology*, 44, 287-301.
- Person-Le Ruyet, J., Pichavant, K., Vacher, C., Le Bayon, N., Sévère, A. y Bœuf, G., 2002. Effects of O₂ supersaturation on metabolism and growth in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 205, 373-383.
- Peschke, E., Peschke, D., Hammer, T. y Csernus, V., 1997. Influence of melatonin and serotonin on glucose-stimulated insulin release from perfused rat pancreatic islets in vitro. *Journal of Pineal Research*, 23, 156-163.
- Peter, R.E., 1979. The brain and feeding behavior. En: *Fish Physiology*. Hoar, W.S. y Randall, D.J., (Eds.). Academic Press, New York, VIII. pp. 121-159.
- Peter, R.E. y Marchant, T.A., 1995. The endocrinology of growth in carp and related species. *Aquaculture*, 129, 299-321.
- Peterson, M.S., Comyns, B.H., Rakocinski, C.F. y Fulling, G.L., 1999. Does salinity affect somatic growth in early juvenile Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus* (L.)?. *Journal of Experimental Marine Biology*, 238, 199-207.
- Peterson-Curtis, T.L., 1997. Effects of salinity on survival, growth, metabolism, and behavior in juvenile hogchokers, *Trinectes maculatus fasciatus* (Achiroidae). *Environmental Biology of Fishes*, 49, 323-331.
- Pettersson, L.B., Andersson, K. y Nilsson, K., 2001. The diel activity of crucian carp, *Carassius carassius*, in relation to chemical cues from predators. *Environmental Biology of Fishes*, 61, 341-345.
- Peyon, P., Lin, X., Himick, B.A. y Peter, R.E., 1998. Molecular cloning and expression of cDNA encoding brain preprocholecystokinin in goldfish. *Peptides*, 19, 199-210.
- Peyon, P., Saied, H., Lin, X. y Peter, R.E., 1999. Postprandial variation in cholecystokinin gene expression in goldfish brain. *Molecular Brain Research*, 74, 190-196.
- Peyron, C., Tighe, D.K., van den Pol, A.N., de Lecea, L., Heller, H.C., Sutcliffe, J.G. y Kilduff, T.S., 1998. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *The Journal of Neuroscience*, 18, 9996-10015.
- Phillips, R.J. y Powley, T.L., 1996. Gastric volume rather than nutrient content inhibits food intake. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 271, R766-R769.
- Pichavant, K., Person-Le Ruyet, J., Le Bayon, N., Sévère, A., Le Roux, A., Quémener, L., Maxime, V., Nonnotte, G. y Bœuf, G., 2000. Effects of hypoxia on growth and metabolism of juvenile turbot. *Aquaculture*, 188, 103-114.
- Pickett, G.D. y Pawson, M.G., 1994. Sea bass. Biology, exploitation and conservation. Chapman & Hall, London.
- Pinillos, M.L., De Pedro, N., Alonso-Gómez, A.L., Alonso-Bedate, M. y Delgado, M.J., 2001. Food intake inhibition by melatonin in goldfish (*Carassius auratus*). *Physiology & Behavior*, 72, 629-634.
- Pirhonen, J., Schreck, C.B. y Reno, P.W., 2003. Can smolting be assessed by food intake in steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)? *Aquaculture Research*, 34, 1459-1463.

- Pivni?ka, K. y ?ern?, K., 1997. Peces. Especies de todo el mundo. Susaeta Ediciones, Republica Checa.
- Plant, T.M., 2001. Leptin, growth hormone, and the onset of primate puberty. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86, 458-460.
- Plisetskaya, E.M. y Duguay, S.J., 1993. Pancreatic hormones and metabolism in ectotherm vertebrates. Current views. En: *The endocrinology of growth, development, and metabolism in vertebrates*. Schreibman, M.P., Scanes, C.G. y Pang, P.K.T. (Eds.). Academic Press, New York, pp. 265-287.
- Plisetskaya, E.M. y Mommsen, T.P., 1996. Glucagon and glucagon-like peptides in fishes. *International Review of Cytology*, 168, 187-257.
- Plisetskaya, E., Woo, N.Y.S. y Murat, J.-C., 1983. Thyroid hormones in cyclostomes and fish and their role in regulation of intermediary metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 74A, 179-187.
- Plisetskaya, E.M., Swanson, P., Bernard, M.G. y Dickhoff, W.W., 1988. Insulin in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during the parr to smolt transformation. *Aquaculture*, 72, 151-164.
- Plisetskaya, E.M., Fabri, E., Moon, T.W., Gutiérrez, J. y Ottolenghi, C., 1993. Insulin binding to isolated hepatocytes of Atlantic salmon and rainbow trout. *Fish Physiology and Biochemistry*, 11, 401-409.
- Pontet, A., Danger, J.M., Dubourg, P., Pettetier, G., Vaudry, H., Galas, A. y Kah, O., 1989. Distribution and characterization of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the brain and pituitary of the goldfish. *Cell and Tissue Research*, 255, 529-538.
- Pontoire, C., Bernard, M., Silvain, C., Collin, J.P. y Voisin, P., 1993. Characterization of melatonin binding sites in chicken and human intestines. *European Journal of Pharmacology*, 247, 111-118.
- Porte Jr., D., Seeley, R.J., Woods, S.C., Baskin, D.G., Figlewicz, D.P. y Schwartz, M.W., 1998. Obesity, diabetes and the central nervous system. *Diabetologia*, 41, 863-881.
- Posner, B.I., Kelly, P.A., Shiu, R.P. y Friesen, H.G., 1974. Studies of insulin, growth hormone and prolactin binding: tissue distribution, species variation and characterization. *Endocrinology*, 96, 521-531.
- Presse, F., Nahon, J.L., Fischer, W.H. y Vale, W., 1990. Structure of the human melanin concentrating hormone mRNA. *Molecular Endocrinology*, 4, 632-637.
- Presse, F., Sorokovsky, I., Max, J.P., Nicoladis, S. y Nahon, J.L., 1996. Melanin-concentrating hormone is a potent anorectic peptide regulated by food deprivation and glucopenia in the rat. *Neuroscience*, 71, 735-745.
- Prunet, P., Boeuf, G., Bolton, J.P. y Young, G., 1989. Smoltification and seawater adaptation in Atlantic salmon (*Salmo salar*): plasma prolactin, growth hormone and thyroid hormones. *General and Comparative Endocrinology*, 74, 355-364.
- Qu, D., Ludwig, D.S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Mathes, M.F., Przypek, J., Kanarek, R. y Maratos-Flier, E., 1996. A role for melanin-concentrating hormone in the regulation of feeding behaviour. *Nature*, 380, 243-246.
- Raber, J., Chen, S., Mucke, L. y Feng, L., 1997. Corticotropin-releasing factor and adreno-

- corticotrophic hormone as potential central mediators of OB effects. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 15057–15060.
- Raubenheimer, D. y Tucker, D., 1997. Associative learning by locusts: pairing of visual cues with consumption of protein and carbohydrate. *Animal Behaviour*, 54, 1449–1459.
- Raybould, H.E., 1999. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut I. Sensing of lipid by the intestinal mucosa. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 277, G751–G755.
- Reddy, P.K. y Leatherland, J.F., 1994. Does the time of feeding affect the diurnal rhythms of plasma hormone and glucose concentration and hepatic glycogen content of rainbow trout? *Fish Physiology and Biochemistry*, 13, 133–140.
- Refstie, T., 1982. The effect of feeding thyroid hormones on saltwater tolerance and growth rate of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Zoology*, 60, 2706–2712.
- Reidelberger, R.D., Kelsey, L., Heimann, D. y Hulce, M., 2003. Effects of peripheral CCK receptor blockade on gastric emptying in rats. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 284, R66–R75.
- Reinecke, M., Schmid, A., Ermatinger, R. y Löffing, C.D., 1997. Insuline-like growth factor I in the teleost *Oreochromis mossambicus*, the tilapia: Gene sequence, tissue expression, and cellular localization. *Endocrinology*, 138, 3613–3619.
- Reiter, R.J., 1991. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and its physiological interactions. *Endocrine Reviews*, 12, 151–180.
- Reiter, R.J., Oh, H.-S. y Fujimori, O., 1996. Melatonin. Its intracellular and genomic actions. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 7, 22–27.
- Reiter, R.J., Tan, D., Osuna, C. y Gatto, E., 2000. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *Journal of Biomedical Science*, 7, 444–458.
- Ribelayga, C., Pévet, P. y Simonneaux, V., 1998. Possible involvement of neuropeptide Y in the seasonal control of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in the pineal gland of the European hamster (*Cricetus cricetus*). *Brain Research*, 801, 137–142.
- Richter, C.P., 1922. A behavioristic study of the activity of the rat. *Comparative Psychology Monographs*, 1, 1–55.
- Richter, C.P., Holt, L.E. y Barelare, B., 1938. Nutritional requirements for normal growth and reproduction in rats studied by the self-selection method. *American Journal of Physiology*, 122, 734–744.
- Riley, L.G., Richman III, N.H., Hirano, T. y Grau, E.G., 2002. Activation of the growth hormone/insulin-like growth factor axis by treatment with 17 α -methyltestosterone and seawater rearing in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *General and Comparative Endocrinology*, 127, 285–292.
- Ringe, E., 1991. Hatchery-reared landlocked Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), from lake Takvatn reared in fresh water and sea water II. The effect of salinity on the digestibility of protein, lipid and individual fatty acids in a capelin roe diet and commercial feed. *Aquaculture*, 93, 135–142.
- Roche, H., Charr, K. y Peres, G., 1989. The effect of a gradual decrease in salinity on the significant constituents of tissue in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* fishes). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 93A, 785–789.

- Rodgerds, B.D., Helms, L.M. y Grau, E.G., 1992. Effects of fasting, medium glucose and amino acid concentrations on prolactin and growth hormone release, *in vitro*, from the pituitary of the tilapia *Oreochromis mossambicus*. *General and Comparative Endocrinology*, 86, 344-351.
- Rogers, P., McKibbin, P.E. y Williams, G., 1991. Acute fenfluramine administration reduces neuropeptide Y concentrations in specific hypothalamic regions of the rat: possible implications for the anorectic effect of fenfluramine. *Peptides*, 12, 251-255.
- Rolls, B.J., 1995. Carbohydrates, fats, and satiety. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 61 (Suppl. 4), 960S-967S.
- Rolls, E.T., 2000. Taste, olfactory, visual and somatosensory representations of the sensory properties of foods in the brain, and their relation to the control of food intake. En: *Neural and Metabolic Control of Macronutrient Intake*. Berthoud, H.-R. y Seeley, R.J. (Eds.). CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 247-262.
- Rolls, B.J., Rowe, E.A., Rolls, E.T., Kingston, B., Megson, A. y Gunary, R., 1981. Variety in a meal enhances food intake in man. *Physiology & Behavior*, 26, 215-221.
- Rolls, B.J., Rowe, E.A. y Rolls, E.T., 1982. How sensory properties of foods affect human feeding behavior. *Physiology & Behavior*, 29, 409-417.
- Rolls, B.J., Hetherington, M. y Burley, V.J., 1988. The specificity of satiety: the influence of foods of different macronutrient content on the development of satiety. *Physiology & Behavior*, 43, 145-153.
- Rolls, B.J., Kim, S., McNelis, A.L., Fischman, M.W., Foltin, R.W. y Moran, T.H., 1991. Time course of preloads high in fat or carbohydrate on food intake and hunger ratings in humans. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 260, R756-R763.
- Rosenblum, P.M. y Callard, I.P., 1988. The endogenous opioid peptide system in male brown bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus* Lesueur: characterization of naloxone binding and the response to naloxone during the annual reproductive cycle. *The Journal of Experimental Zoology*, 245, 244-255.
- Rossi, M., Choi, S.J., O'Shea, D., Miyoshi, T., Ghatei, M.A. y Bloom, S.R., 1997. Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight. *Endocrinology*, 138, 351-355.
- Rotllant, J., Balm, P.H.M., Wendelaar Bonga, S.E., Pérez-Sánchez, J.P. y Tort, L., 2000. A drop in ambient temperature results in a transient reduction of interrenal ACTH responsiveness in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 23, 265-273.
- Rozin, P.J., 1968. Are carbohydrate and protein intakes separately regulated. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, 65, 23-29.
- Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2001. Macronutrient self-selection in European sea bass using macroencapsulated nutrients. *Fourth and Final Workshop of COST 827 action on Voluntary Food Intake in Fish*, Reykjavik, 44.
- Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2003a. Nocturnal feeding reduces sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) pellet-catching ability. *Aquaculture*, 220, 697-705.
- Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2003b. Macronutrient selection through

- postingestive signals in sea bass fed on gelatine capsules. *Physiology & Behavior*, 78, 795-803.
- Rubio, V.C., Boluda-Navarro, D., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2003c. Serotonin affects the quantity and the quality of macronutrient selection in European sea bass *Dicentrarchus labrax*, L. *World Aquaculture 2003*, Salvador da Bahia, 656.
- Rubio, V.C., Vivas, M., Sánchez-Mut, A., Sánchez-Vázquez, F.J., Covès, D., Dutto, G. y Madrid, J.A., 2004a. Self-feeding of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) under laboratory and farming conditions using a string sensor. *Aquaculture*, 233, 393-403.
- Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2004b. Oral administration of melatonin reduces food intake and modifies macronutrient selection in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Journal of Pineal Research*, (in press).
- Ruibal, C., Soengas, J.L. y Aldegunde, M., 2002. Brain serotonin and the control of food intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects of changes in plasma glucose levels. *Journal of Comparative Physiology*, 188A, 479-484.
- Ruohonen, K. y Grove, D.J., 2001. In situ study of gastric emptying using X-radiography and macrocapsules. *Aquaculture Research*, 32, 491-493.
- Ruohonen, K., Grove, D.J. y McIlroy, J.T., 1997. The amount of food ingested in a single meal by rainbow trout offered chopped herring, dry and wet diets. *Journal of Fish Biology*, 51, 93-105.
- Russell, C.D., Petersen, R.N., Rao, S.P., Ricci, M.R., Prasad, A., Zhang, Y., Brolin, R.E., Fried, S.K., 1998. Leptin expression in adipose tissue from obese humans: depot-specific regulation by insulin and dexamethasone. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 275, E507-E515.
- Saad, M.F., Khan, A., Sharma, A., Michael, R., Riad-Gabriel, M.G., Boyadjian, R., Jinagouda, S.D., Steil, G.M. y Kamdar V., 1998. Physiological insulinemia acutely modulates plasma leptin. *Diabetes*, 47, 544-549.
- Sahu, A., 1998. Leptin decreases food intake induced by melanin-concentrating hormone (MCH), galanin (GAL), and neuropeptide Y (NPY) in the rat. *Endocrinology*, 139, 4739-4742.
- Sahu, A., 2002. Interactions of neuropeptide Y, hypocretin-1 (orexin A) and melanin-concentrating hormone on feeding in rats. *Brain Research*, 944, 232-238.
- Sakamoto, T. y Hirano, T., 1991. Growth hormone receptors in the liver and osmoregulatory organs of rainbow trout: characterization and dynamics during adaptation to seawater. *Journal of Endocrinology*, 130, 425-434.
- Sakamoto, T. y Hirano, T., 1993. Expression of insulin-like growth factor-I gene in osmoregulatory organs during seawater adaptation of the salmonid fish: Possible mode of osmoregulatory action of growth hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 90, 1912-1916.
- Sakamoto, T., Shepherd, B.S., Madsen, S.S., Nishioka, R.S., Siharath, K., Richman, N.H., Bern, H.A. y Grau, E.G., 1997. Osmoregulatory actions of growth hormone and prolactin in an advanced teleost. *General and Comparative Endocrinology*, 106, 95-101.

- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., Williams, S.C., Richardson, J.A., Kozlowski, G.P., Wilson, S., Arch, J.R.S., Buckingham, R.E., Haynes, A.C., Carr, S.A., Annan, R.S., McNulty, D.E., Liu, W.-S., Terrett, J.A., Elshourbagy, N.A., Bergsma, D.J. y Yanagisawa, M., 1998. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92, 537-585.
- Salbert, G., Chauveau, I., Bonnec, G., Valotaire, Y. y Jégo, P., 1992. One of the two trout proopiomelanocortin messenger RNAs potentially encodes new peptides. *Molecular Endocrinology*, 6, 1605-1613.
- Sánchez-Vázquez, F.J. y Tabata, M., 1998. Circadian rhythms of demand-feeding and locomotor activity in rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 52, 255-267.
- Sánchez-Vázquez, F.J., Madrid, J.A. y Zamora, S., 1995. Circadian rhythms of feeding activity in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.: dual phasing capacity of diel demand-feeding pattern. *Journal of Biological Rhythms*, 10, 256-266.
- Sánchez-Vázquez, F.J., Iigo, M., Madrid, J.A., Zamora, S. y Tabata, M., 1997. Daily cycles in plasma and ocular melatonin in demand-fed sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Journal of Comparative Physiology*, 167B, 409-415.
- Sánchez-Vázquez, F.J., Azzaydi, M., Martínez, F.J., Zamora, S. y Madrid, J.A., 1998a. Annual rhythms of demand-feeding activity in sea bass: Evidence of a seasonal phase inversion of the diel feeding pattern. *Chronobiology International*, 15, 607-622.
- Sánchez-Vázquez, F.J., Yamamoto, T., Akiyama, T., Madrid, J.A. y Tabata, M., 1998b. Selection of macronutrients by goldfish operating self-feeders. *Physiology & Behavior*, 65, 211-218.
- Sánchez-Vázquez, F.J., Yamamoto, T., Akiyama, T., Madrid, J.A. y Tabata, M., 1999. Macronutrient self-selection through demand-feeders in rainbow trout. *Physiology & Behavior*, 66, 45-51.
- Sanders, N.M. y Ritter, S., 2000. Repeated 2-deoxy-D-glucose-induced glucoprivation attenuates Fos expression and glucoregulatory responses during subsequent glucoprivation. *Diabetes*, 49, 1865-1874.
- Sanders, D.C., Chaturvedi, A.K., Hordinsky, J.R. 1998. Aeromedical aspects of melatonin – An overview. Washington, DC: U.S. Department of Transportation, Federal Aviation Administration, 1998 March Report No.: DOT/FAA/AM-98/10. Available from: National Technical Information Service, Springfield, VA 22161.
- Sandyk, R. y Kay, S.R., 1991. "Down regulation" of 5-HT₂ receptors: possible role of melatonin and significance for negative schizophrenia. *The International Journal of Neuroscience*, 56, 209-214.
- Sargent, J., Henderson, R.J. y Tocher, D.R., 1989. The lipids. En: *Fish Nutrition*. Halver, J.E. (Ed.), Academic Press, San Diego, pp. 154-209.
- Saunders, R.L. y Henderson, E.B., 1970. Influence of photoperiod on smolt development and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Fish Research Board Canadian*, 27, 1295-1311.
- Saunders, R.L., Specker, J.L. y Komourdjan, M.P., 1989. Effects of photoperiod on growth and smelting in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 82, 103-117.

- Savage, G.E., Roberts, M.G., 1975. Behavioural effects of electrical stimulation of the hypothalamus of the goldfish (*Carassius auratus*). *Brain, Behavior and Evolution*, 12, 42-56.
- Schick, R.R., Yaksh, T.L. y Go, V.L.W., 1986. An intragastric meal releases the putative satiety factor cholecystokinin from hypothalamic neurons in cats. *Brain Research*, 370, 349-353.
- Schick, R.R., Reilly, W.M., Roddy, D.R., Yaksh, T.L. y Go, V.L.W., 1987. Neuronal cholecystokinin-like immunoreactivity is postprandially released from primate hypothalamus. *Brain Research*, 418, 20-26.
- Schick, R.R., Samsami, S., Zimmermann, J.P., Eberl, T., Endres, C., Schusdziarra, V. y Classen, V., 1993. Effect of galanin on food intake in rats: involvement of lateral and ventromedial hypothalamic sites. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 264, R355-R361.
- Schick, R.R., Schusdziarra, V., Yaksh, T.L. y Go, V.L.W., 1994. Brain regions where cholecystokinin exerts its effect on satiety. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 713, 242-254.
- Schulte, B.A. y Bakus, G.J., 1992. Predation deterrence in marine sponges: laboratory versus field studies. *Bulletin of Marine Sciences*, 50, 205-211.
- Schwartz, M.W. y Seeley, R.J., 1997. The new biology of body weight regulation. *Journal of the American Dietetic Association*, 97, 54-58.
- Schwartz, D.H., Hernandez, B.G. y Hoebel, B.G., 1990. Serotonin release in lateral and medial hypothalamus during feeding and its anticipation. *Brain Research Bulletin*, 25, 797-802.
- Schwartz, G.J., McHugh, P.R. y Moran, T.H., 1991a. Integration of vagal afferent responses to gastric loads and cholecystokinin in rats. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 261, R64-R69.
- Schwartz, M.W., Bergman, R.N., Kahn, S.E., Taborsky, G.J. Jr., Fisher, L.D., Sipols, A.J., Woods, S.C., Steil, G.M. y Porte, D. Jr., 1991b. Evidence for entry of plasma insulin into cerebrospinal fluid through an intermediate compartment in dogs: quantitative aspects and implications for transport. *The Journal of Clinical Investigation*, 88, 1272-1281.
- Schwartz, M.W., Figlewicz, D.P., Baskin, D.G., Woods, S.C. y Porte Jr., D., 1992a. Insulin in the brain: A hormonal regulator of energy balance. *Endocrine Reviews*, 13, 387-414.
- Schwartz, M.W., Sipols, A.J., Marks, J.L., Sanacora, G., White, J.D., Scheurink, A., Kahn, S.E., Baskin, D.G., Woods, S.C., Figlewicz, D.P. y Porte, D.J., 1992b. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology*, 130, 3608-3616.
- Schwartz, M.W., Figlewicz, D.P., Woods, S.C., Porte, D.J. y Baskin, D.G., 1993. Insulin, neuropeptide Y, and food intake. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 692, 60-71.
- Schwartz, M.W., Figlewicz, D.P., Baskin, D.G., Woods, S.C. y Porte Jr, D., 1994. Insulin and the central regulation of energy balance: update 1994. *Endocrine Reviews*, 2, 109-113.

- Schwartz, M.W., Dallman, M.F. y Woods, S.C., 1995. Hypothalamic response to starvation: implications for the study of wasting disorders. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 269, R949-R957.
- Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Campfield, L.A., Burn, P. y Baskin, D.G., 1996. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *The Journal of Clinical Investigation*, 98, 1101-1106.
- Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Woods, S.C., Weigle, D.S., Campfield, L.A., Burn, P. y Baskin, D.G., 1997. Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes*, 46, 2119-2123.
- Schwartz, M.W., Baskin, D.G., Kaiyala, K.J. y Woods, S.C., 1999a. Model for the regulation of energy balance and adiposity by the central nervous system. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69, 584-596.
- Schwartz, G.J., Salorio, C.F., Skoglund, C. y Moran, T.H., 1999b. Gut vagal afferent lesions increase meal size but do not block gastric preload-induced feeding suppression. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 274, R1623-R1629.
- Sclafani, A., 1991. Starch and sugar tastes in rodents: an update. *Brain Research Bulletin*, 27, 383-386.
- Sclafani, A., 1997. Learned controls of ingestive behavior. *Appetite*, 29, 153-158.
- Sclafani, A., 2000. Macronutrient-conditioned flavor preferences. En: *Neural and metabolic control of macronutrient intake*. Berthoud, H.R. y Seeley, R.J. (Eds.). CRC press, Boca Raton, pp. 93-106.
- Sclafani, A. y Aravich, P.F., 1983. Macronutrient self-selection in three forms of hypothalamic obesity. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 244, R686-R694.
- Sclafani, A., Cardieri, C., Tucker, K., Blusk, D. y Ackroff, K., 1993. Intra-gastric glucose but not fructose conditions robust flavor preferences in rats. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 265, R320-R325.
- Seeley, R.J. y Berthoud, H.-R., 2000. Neural and metabolic control of macronutrient selection: consensus and controversy. En: *Neural and Metabolic Control of Macronutrient Intake*. Berthoud, H.-R. y Seeley, R.J. (Eds.). CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 489-496.
- Sefkow, A.J., Distefano, J.J., Himick, B.A., Brown, S.B. y Eales, J.G., 1996. Kinetic analysis of thyroid hormone secretion and interconversion in the 5-day fasted rainbow trout, *O. mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 101, 123-138.
- Selmaoui, B., Oguine, A. y Thibault, L., 2001. Food access schedule and diet composition alter rhythmicity of serum melatonin and pineal NAT activity. *Physiology & Behavior*, 74, 449-455.
- Shaji, A.V. y Kulkarni, S.K., 1998. Evidence of gabaergic modulation in melatonin-induced short-term memory deficits and food consumption. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 20, 311-319.
- Shearer, K.D., 1994. Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. *Aquaculture*, 119, 63-88.

- Shepherd, B.S., Sakamoto, T., Nishioka, R.S., Richman, N.H., Mori, I., Madsen, S.S., Chen, T.T., Hirano, T., Bern, H.A. y Grau, E.G., 1997a. Somatotrophic actions of the homologous growth hormone (tGH) and prolactin (tPRL₁₇₇) in the euryhaline teleost, *Oreochromis mossambicus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 94, 2068-2072.
- Shepherd, B.S., Ron, B., Burch, A., Sparks, R., Richman III, N.H., Shimoda, S.K., Stetson, M.H., Lim, C. y Grau, E.G., 1997b. Effects of salinity, dietary level of protein and 17 α -methyltestosterone on growth hormone (GH) and prolactin (tPRL₁₇₇ and tPRL₁₈₃) levels in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 17, 279-288.
- Sheridan, M.A., 1986. Effects of thyroxine, cortisol, growth hormone and prolactin on lipid mobilization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), during smoltification. *General and Comparative Endocrinology*, 64, 220-238.
- Shide, D.J., Caballero, B., Reidelberger, R. y Rolls, B.J., 1995. Accurate energy compensation for intragastric and oral nutrients in lean males. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 61, 754-764.
- Shima, T., Suzuki, N., Yamamoto, T. y Furuta, H., 2001. A comparative study of self-feeder and automatic feeder: effects on the growth performance of rainbow trout fry. *Aquaculture Research*, 32 (Suppl. 1), 142-146.
- Shimabukuro, M., Koyama, K., Chen, G., Wang, M.-Y., Trieu, F., Lee, Y., Newgard, C.B. y Unger, R.H., 1997. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 94, 4637-4641.
- Shimeno, S., Kheyyali, D. y Shikata, T., 1995. Metabolic response to dietary lipid to protein ratios in common carp. *Fisheries Science*, 61, 977-980.
- Shimizu, H. y Bray, G.A., 1990. Effects of insulin on hypothalamic monoamine metabolism. *Brain Research*, 510, 251-258.
- Shintani, M., Ogawa, Y., Ebihara, K., Aizawa-Abe, M., Miyanaga, F., Takaya, K., Hayashi, T., Inoue, G., Hosoda, K., Kojima, M., Kangawa, K. y Nakao, K., 2001. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes*, 50, 227-232.
- Shor-Posner, G., Grinker, J.A., Marinescu, C., Brown, O. Y Leibowitz, S.F., 1986. Hypothalamic serotonin in the control of meal patterns and macronutrient selection. *Brain Research Bulletin*, 17, 663-671.
- Shor-Posner, G., Ian, C., Brennan, G., Cohn, T., Moy, H., Ning, A. y Leibowitz, S.F., 1991. Self-selecting albino rats exhibit differential preferences for pure macronutrient diets: characterization of three subpopulations. *Physiology & Behavior*, 50, 1187-1195.
- Shrimpton, J.M. y McCormick, S.D., 1998. Seasonal differences in plasma cortisol and gill corticosteroid receptors in upper and lower mode juvenile Atlantic salmon. *Aquaculture*, 168, 205-219.
- Sierra-Honigsmann, M.R., Nath, A.K., Murakami, C., Garcia- Cardena, G., Papapetropoulos, A., Sessa, W.C., Madge, L.A., Schechner, J.S., Schwabb, M.B., Polverini, P.J. y Flores-Riveros, J.R., 1998. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science*, 281, 1683-1686.

- Silverstein, J.T. y Plisetskaya, E.M., 2000. The effects of NPY and insulin on food intake regulation in fish. *American Zoologist*, 40, 296-308.
- Silverstein, J.T., Breininger, J., Baskin, D.G. y Plisetskaya, E.M., 1998. Neuropeptide Y-like expression in the salmon brain increases with fasting. *General and Comparative Endocrinology*, 110, 157-165.
- Simansky, K.J., 1995. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behavioural Brain Research*, 73, 37-42.
- Simansky, K.J., 1996. 5-HT receptor subtypes influencing feeding and drinking: focus on the periphery. En: *Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behavior*. Cooper, S.J. y Clifton, P.G. (Eds.). Academic Press, London, pp. 59-97.
- Simon, E.J. y Hiller, J.M., 1994. Opioid peptides and opioid receptors. En: *Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects*. Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W. y Molinoff, P.B. (Eds.). Raven Press, New York, 321-339.
- Simpson, S.J. y White, P.R., 1990. Associative learning and locust feeding: evidence for a "learned hunger" for protein. *Animal Behaviour*, 40, 506-513.
- Simpson, S.J. y Raubenheimer, D., 2000. Geometric models of macronutrient selection. En: *Neural and Metabolic Control of Macronutrient Intake*. Berthoud, H.-R. y Seeley, R.J. (Eds.). CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 29-42.
- Simth, A.I. y Funder, J.W., 1988. Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocrine Reviews*, 9, 159-179.
- Singer, L.K., York, D.A. y Bray, G.A., 1998. Macronutrient selection following 2-deoxy-D-glucose and mercaptoacetate administration in rats. *Physiology & Behavior*, 65, 115-121.
- Sipols, A.J., Baskin, D.G. y Schwartz, M.W., 1995. Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes*, 44, 147-151.
- Skofitsch, G., Jacobowitz, D.M. y Zamir, N., 1985. Immunohistochemical localization of a melanin concentrating hormone-like peptide in the rat brain. *Brain Research Bulletin*, 15, 635-649.
- Skyrud, T., Andersen, O., Aleström, P. y Gautvik, K.M., 1989. Effects of recombinant human growth hormone and insulin-like growth factor I on body growth and blood metabolites in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *General and Comparative Endocrinology*, 75, 247-255.
- Smedh, U., Hakansson, M.L., Meister, B. y Uvnas-Moberg, K., 1998. Leptin injected into the fourth ventricle inhibits gastric emptying. *Neuroreport*, 9, 297-301.
- Smith, R.J.F., 1992. Alarm signals in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2, 33-63.
- Smith, G.P. y Gibbs, J., 1994. Satiating effect of cholecystokinin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 713, 236-241.
- Smith, I.P., Metcalfe, N.B., Huntingford, F.A. y Kadri, S., 1993. Daily and seasonal patterns in the feeding behaviour of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in a sea cage. *Aquaculture*, 117, 165-178.
- Smith, B.K., York, D.A. y Bray, G.A., 1999. Activation of hypothalamic serotonin receptors

- reduced intake of dietary fat and protein but not carbohydrate. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 277, R802-R811.
- Sobhani, I., Bado, A., Vissuzaine, C., Buyse, M., Kermorgant, S., Laigneau, J.-P., Attoub, S., Lehy, T., Henin, D., Mignon, M. Y Lewin, M.J.M., 2000. Leptin secretion and leptin receptors in the human stomach. *Gut*, 47, 178-183.
- Soderberg, C., Pieribone, V.A., Dahlstrand, J., Brodin, L. y Larhammar, D., 1994. Neuropeptide role of both peptide YY and neuropeptide Y in vertebrates suggested by abundant expression of their mRNA in a cyclostome brain. *Journal of Neuroscience Research*, 37, 633-640.
- Söderberg, C., Wraith, A., Ringvall, M., Yan, Y.L., Postlethwaith, J.M., Brodin, L. y Larhammar, D., 2000. Zebrafish genes for neuropeptide Y and peptide YY reveal origin by chromosomes duplication from an ancestral gene linked to the homeobox cluster. *Journal of Neurochemistry*, 75, 908-918.
- Soengas, J.L., Barciela, P., Fuentes, J., Otero, J., Andrés, M.D. y Aldegunde, M., 1993. Changes in muscle carbohydrate metabolism in domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after transfer to seawater. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 104B, 173-179.
- Soengas, J.L., Barciela, P., Fuentes, J., Otero, J., Andrés, M.D. y Aldegunde, M., 1993. The effect of seawater transfer in liver carbohydrate metabolism of domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 105B, 337-343.
- Soengas, J.L., Otero, J., Fuentes, J., Andrés, M.D. y Aldegunde, M., 1991. Preliminary studies on carbohydrate metabolism changes in domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) transferred to diluted seawater (12 p.p.t.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 98B, 53-57.
- Somoza, G.M. y Peter, R.E., 1991. Effects of serotonin on gonadotropin and growth hormone release from in vitro perfused goldfish pituitary fragments. *General and Comparative Endocrinology*, 82, 103-110.
- Sorensen, P.W. y Caprio, J., 1998. Chemoreception. En: *The Physiology of Fishes*. Evans, D.H. (Ed.). CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 375-406.
- Spannagel, A.M., Nakano, I., Tawil, T., Chey, W.Y., Liddle, R.A. y Green, G.M., 1996. Adaptation to fat markedly increase pancreatic secretory response to intraduodenal fat in rats. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 270, G128-G135.
- Speare, D.J., MacNair, N. y Hammel, K.L., 1995. Demonstration of tank effect on growth indices of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during an ad libitum feeding trial. *American Journal of Veterinary Research*, 56, 1372-1379. Citado en: Kestemont, P. y Baras, E., 2001. Environmental factors and feed intake: mechanism and interactions. En: Houlihan, D., Jobling, M., Boujard, T., editors. *Food intake in fish*. Great Britain: Blackwell Science Ltd.; 2001. p. 131-156.
- Spieler, R.E. y Noeske, T.A., 1984. Effects of photoperiod and feeding schedule on diel variations of locomotor activity, cortisol, and thyroxine in goldfish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 113, 528-539.

- ween salinity, dietary carbohydrate source and carbohydrate concentration on the digestibility of macronutrients and energy in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 163, 347-359.
- Storr, M., Schusdziarra, V. y Allescher, H.-D., 2000. Inhibition of small conductance K⁺-channels attenuated melatonin-induced relaxation of serotonin-contracted rat gastric fundus. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 78, 799-806.
- Stradmeyer, L., Metcalfe, N.B. y Thorpe, J.E., 1988. Effect of food pellet shape and texture on the feeding response of juvenile Atlantic salmon. *Aquaculture*, 73, 217-228.
- Stricker, E.M., 2000. Specific appetites and homeostatic systems. En: *Neural and Metabolic Control of Macronutrient Intake*. Berthoud, H.-R. y Seeley, R.J. (Eds.). CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 361-387.
- Suresh, A.V. y Lin, C.K., 1992. Tilapia culture in saline water: a review. *Aquaculture*, 106, 201-226.
- Swanson, C., 1996. Early development of milkfish: effects of salinity on embryonic and larval metabolism, yolk absorption and growth. *Journal of Fish Biology*, 48, 405-421.
- Swithers, S.E., 1997. Development of independent ingestive responding to blockade of fatty acid oxidation in rats. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 273, R1649-R1656.
- Tandler, A., Anav, F.A. y Choshniak, I., 1995. The effect of salinity on growth rate, survival and swimbladder inflation in gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae. *Aquaculture*, 135, 343-353.
- Tang-Christensen, M., Larsen, P.J., Geke, R., Flink-Jensen, A., Jessop, D.S., Møler, M., Sheikh, S.P., 1996. Central administration of GLP-I-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 271, R848-R856.
- Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K.J., Smutko, J.S., Mays, G.C., Woolf, E.A., Monroe, C.A. y Tepper, R.I., 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, 83, 1263-1271.
- Tataranni, P.A., Gautier, J.-F., Chen, K., Uecker, A., Bandy, D., Salbe, A.D., Pratley, R.E., Lawson, M., Reiman, E.M. y Ravussin, E., 1999. Neuroanatomical correlates of hunger and satiation in humans using positron emission tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.*, 96, 4569-4574.
- Tatemoto, K., 1982. Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.*, 79, 5485-5489.
- Tatemoto, K., Rökaeus, A., Jörnvall, H., McDonald, T.J. y Mutt, M., 1983. Galanin-a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Letters*, 164, 124-128.
- Tatro, J.B., 1990. Melanotropin receptors in the brain are differentially distributed and recognize both corticotropin and α -melanocyte stimulating hormone. *Brain Research*, 536, 124-132.
- Teff, K.L., Young, S.N. y Blundell, J.E., 1989. The effect of protein or carbohydrate breakfast on subsequent plasma amino acid levels, satiety and nutrient selection in normal males. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 34, 829-837.

- Telles, M.M., Guimarães, R.B. y Ribeiro, E.B., 2003. Effect of leptin on the acute feeding-induced hypothalamic serotonergic stimulation in normal rats. *Regulatory Peptides*, **115**, 11-18.
- Tempel, D.L. y Leibowitz, S.F., 1990a. Galanin inhibits insulin and corticosterone release after injection in the PVN. *Brain Research*, 536, 353-357.
- Tempel, D.L. y Leibowitz, S.F., 1990b. Diurnal variations in the feeding responses to norepinephrine, neuropeptide Y and galanin in the PVN. *Brain Research Bulletin*, **25**, 821-825.
- Tempel, D.L., Leibowitz, K.L. y Leibowitz, S.F., 1988. Effects of PVN galanin on macronutrient selection. *Peptides*, **9**, 309-314.
- Tena-Sempere, M., Barreiro, M.L., Gonzáles, L.C., Gaytán, F., Zhang, F.-P., Caminos, J.E., Pinilla, L., Casanueva, F.F., Diéguez, C. y Aguilar, E., 2002. Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology*, **143**, 717-725.
- Thetmeyer, H., Waller, U., Black, K.D., Inselmann, S. y Rosenthal, H., 1999. Growth of European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. under hypoxic and oscillating oxygen conditions. *Aquaculture*, **174**, 355-367.
- Thibault, L., 1994. Dietary carbohydrates: effects on self-selection, plasma glucose and insulin, and brain indoleaminergic system in the rat. *Appetite*, **23**, 275-286.
- Thibault, L. y Booth, D.A., 1999. Macronutrient-specific dietary selection in rodents and its neural bases. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **23**, 457-528.
- Thibault, L., Nagai, K., Hashida, A., Yanaiharu, N. y Nakagawa, H., 1990. Satiation due to CCK-8 derivate infusion into VMH is related to specific macronutrient selection. *Physiology & Behavior*, **47**, 911-915.
- Thibault, L., Mok, E., Nagai, K. y Wong, C.Y., 1999. Serotonin infusion in the SCN reduces casein ingestion in rats. *Physiology & Behavior*, **68**, 37-45.
- Thiessen, D.L., Campbell, G.L. y Tyler, R.T., 2003. Utilization of thin distillers' solubles as a palatability enhancer in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets containing canola meal or air-classified pea protein. *Aquaculture Nutrition*, **9**, 1-10.
- Thim, L., Kristensen, P., Nielsen, P.F., Wulff, B.S. y Clausen, J.T., 1999. Tissue-specific processing of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptides in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, **96**, 2722-2727.
- Thompson, R.H. y Swanson, L.W., 1998. Organization of inputs to the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a reexamination with Fluorogold and PHAL in the rat. *Brain Research Reviews*, **27**, 89-118.
- Thorpe, J.E., 1978. Rhythmic activity of fishes. Academic Press, London.
- Toguyeni, A., Fauconneau, B., Boujard, T., Fostier, A., Kuhn, E.R., Mol, K.A. y Baroiller, J.F., 1997. Feeding behaviour and food utilisation in tilapia, *Oreochromis niloticus*: effect of sex-ratio and relationship with the endocrine status. *Physiology & Behavior*, **62**, 273-279.
- Torreón Atienza, M., Chatzifotis, S. y Divanach, P., 2004. Macronutrient selection by sharp snout seabream (*Diplodus puntazzo*). *Aquaculture*, **232**, 481-491.
- Trigazis, L., Ortmann, A. y Anderson, G.H., 1997. Effect of a cholecystokinin- A receptor blocker on protein-induced food intake suppression in rats. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, **272**, R1826-R1833.

- Trigazis, L., Vaccarino, F.J., Greenwood, C.E. y Anderson, G.H., 1999. CCK-A receptor antagonists have selective effects on nutrient-induced food intake suppression in rats. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 276, R323-R330.
- Tritos, N.A., Vicent, D., Gillette, J., Ludwig, D.S., Flier, E.S. y Maratos-Flier, E., 1998. Functional interactions between melanin-concentrating hormone, neuropeptide Y, and anorectic neuropeptides in the rat hypothalamus. *Diabetes*, 47, 1687-1692.
- Trivedi, P., Yu, H., MacNeil, D.J., Van der Ploeg, L.H.T. y Guan, X.M., 1998. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Letters*, 438, 71-75.
- Trudeau, V.L., 1998. Everything you wanted to know about sex a perspective on the first symposium on Comparative Neuroendocrinology of Vertebrate Reproduction and Growth: Molecular, Cellular and Organismal Aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 119, 411-416.
- Tschöp, M., Smiley, D.L. y Heiman, M.L., 2000. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 407, 908-913.
- Tschöp, M., Devanarayan, V., Weyer, C., Tataranni, P.A., Ravussin, E. y Heiman, M.L., 2001. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes*, 50, 707-709.
- Turton, M.D., O'Shea, D., Gunn, I., Beak, S.A., Edwards, C.M., Meeran, K., Choi, S.J., Taylor, G.M., Heath, M.M., Lambert, P.D., Wilding, J.P., Smith, D.M., Ghatei, M.A., Herbert, J. y Bloom, S.R., 1996. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*, 379, 69-72.
- Uehara, Y., Shimizu, H., Ohtani, K., Sato, N. y Mori, M., 1998. Hypothalamic corticotropin-releasing hormone is a mediator of the anorexigenic effect of leptin. *Diabetes*, 47, 890-893.
- Underhay, J.R. y Burka, J.F., 1997. Effects of pH on contractility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal muscle in vitro. *Fish Physiology and Biochemistry*, 16, 233-246, 1997.
- Utida, S., Hirano, T., Oide, H., Ando, M., Johnson, D.W. y Bern, H.A., 1972. Hormonal control of the intestine and urinary bladder in teleost osmoregulation. *General and Comparative Endocrinology Suppl.* 3, 317-327.
- Vaccarino, A.L. y Kastin, A.J., 2000. Endogenous opiates: 1999. *Peptides*, 21, 1975-2034.
- Valente, L.M.P., Fauconneau, B. y Gomes, E.F.S., 1998. Voluntary feed intake, feed and nutrient utilisation in slow and fast growing rainbow trout strains. *Aquatic Living Resources*, 11, 93-99.
- Valente, L.M.P., Fauconneau, B., Gomes, E.F.S. y 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.
- Vallarino, M., 1985. Occurrence of b-endorphin-like immunoreactivity in the brain of the teleost, *Boops boops*. *General and Comparative Endocrinology*, 60, 63-69.
- Vallarino, M., Feuilloy, M., Vandesande, F. y Vaudry, H., 1991. Immunochemical mapping of galanin-like immunoreactivity in the brain of the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. *Peptides*, 12, 351-357.
- Van Dam, A.A. y Pauly, D., 1995. Simulation of the effects of oxygen on food consumption

- and growth of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*, 26, 427-440.
- van der Boon, J., van den Thillart, G.E.E.J.M. and Addink, A.D.F. 1991. The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100A: 47-53.
- van Dijk, G., Chavez, M., Reidy, C.A. y Woods, S.C., 2000. En: *Neural and Metabolic Control of Macronutrient Intake*. Berthoud, H.-R. y Seeley, R.J. (Eds.). CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 361-387.
- Van Zeggeren, A. y Li, E.T.S., 1990. Food intake and choice in lean and obese Zucker rats after intragastric carbohydrate preloads. *Journal of Nutrition*, 120, 309-316.
- Van't Hof, T.J. y Gwinner, E., 1999. Influence of pinealectomy and pineal stalk deflection on circadian gastrointestinal tract melatonin rhythms in zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *Journal of Biological Rhythm*, 14, 185-189.
- Vaughan, G.M. y Reiter, R.J., 1986. Pineal dependence of the Syrian hamster's nocturnal serum melatonin surge. *Journal of Pineal Research*, 3, 9-14.
- Vaughan, J.M., Fischer, W.H., Hoeger, C., Rivier, J. y Vale, W., 1989. Characterization of melanin-concentrating hormone from rat hypothalamus. *Endocrinology*, 125, 1660-1665.
- Vigna, S.R., Fisher, B.L., Morgan, J.L.M. y Rosenquist, G.L., 1985. Distribution and molecular heterogeneity of cholecystokinin-like immunoreactive peptides in the brain and gut of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 82, 143-146.
- Vehanen, T., 2003. Adaptive flexibility in the behaviour of juvenile Atlantic salmon: short-term responses to food availability and threat from predation. *Journal of Fish Biology*, 63, 1034-1045.
- Vivas, M., Sánchez-Vázquez, F.J., García García, B. y Madrid, J.A., 2003. Macronutrient self-selection in European sea bass in response to dietary protein or fat restriction. *Aquaculture Research*, 34, 271-280.
- Voigt, J.P., Sohr, R. y Fink, H., 1998. CCK-8S facilitates 5-HT release in the rat hypothalamus. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 59, 179-182.
- Volkoff, H. y Peter, R.E., 2000. Effects of CART peptides on food consumption, feeding and associated behaviors in the goldfish, *Carassius auratus*: actions on neuropeptide Y- and orexin A-induced feeding. *Brain Research*, 887, 125-133.
- Volkoff, H. y Peter, R.E., 2001a. Characterization of two forms of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide precursors in goldfish: molecular cloning and distribution, modulation of expression by nutritional status, and interactions with leptin. *Endocrinology*, 142, 5076-5078.
- Volkoff, H. y Peter, R.E., 2001b. Interactions between orexin A, NPY and galanin in the control of food intake of the goldfish, *Carassius auratus*. *Regulatory Peptides*, 101, 59-72.
- Volkoff, H., Bjorklund, J.M. y Peter, R.E., 1999. Stimulation of feeding behavior and food consumption in the goldfish, *Carassius auratus*, by orexin-A and orexin-B. *Brain Research*, 846, 204-209.

- Volkoff, H., Peyon, P., Lin, X. y Peter, R.E., 2000. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a brain bombesin/gastrin-releasing peptide-like peptide in goldfish. *Peptides*, 21, 639-648.
- Volkoff, H., Eykelbosh, A.J. y Peter, R.E., 2003. Role of leptin in the control of feeding of goldfish *Carassius auratus*: interactions with cholecystokinin, neuropeptide Y and orexin A, and modulation by fasting. *Brain Research*, 972, 90-109.
- Von Schrenck, T., Heinz-Erian, P., Moran, T.H., Mantey, S.A., Gardner, J.D. y Jensen, R.T., 1989. Neuromedin B receptor in the esophagus: evidence for subtypes of bombesin receptors. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 256, G747-G758.
- Wabitsch, M., Jensen, P.B., Blum, W.F., Christoffersen, C.T., Englaro, P., Heinze, E., Rascher, W., Teller, W., Tornqvist, H., Hauner, H., 1996. Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes*, 45, 1435-1438.
- Wade, P.R., Tamir, H., Kirchgeßner, A.L. y Gershon, M.D., 1994. Analysis of the role of 5-HT in the enteric nervous system using anti-idiotopic antibodies to 5-HT receptors. *American Journal of Physiology*, 266, G403-G416.
- Walsh, J.H., Wong, H.C. y Dockray, G.J., 1979. Bombesin-like peptides in mammals. The *FASEB Journal*, 38, 2315-2319.
- Wang, J.F. y Koopmans, H.S., 1995. Alterations of energy and substrate metabolism in rats with large and sustained changes in daily food intake. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 269, R1475-R1480.
- Wang, Q., Bing, C., Al-Barazanji, K., Mossakowska, D.E., Wang, X.M., McBay, D.L., Neville, W.A., Taddayon, M., Pickavance, L., Dryden, S., Thomas, M.E., McHale, M.T., Gloyer, I.S., Wilson, S., Buckinghame, R., Arch, J.R., Trayhurn, P. y Williams, G., 1997a. Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptide Y neurons in the control of food intake and energy homeostasis in the rat. *Diabetes*, 46, 335-341.
- Wang, C., Hashemi, T., He, C., Strader, C. y Bayne, M., 1997b. Molecular cloning and pharmacological characterization of a new galanin receptor subtype. *Molecular Pharmacology*, 52, 337-343.
- Wang, J.O., Lui, H., Po, H. y Fan, L., 1997c. Influence of salinity on food consumption, growth and energy conversion efficiency of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *Aquaculture*, 148, 115-124.
- Wang, L., Martínez, V., Barrachina, M.D. y Taché, Y., 1998. Fos expression in the brain induced by peripheral injection of CCK or leptin plus CCK in fasted lean mice. *Brain Research*, 791, 157-166.
- Wang, Y., Barton, B.A., Thim, L., Nielsen, P.F. y Conlon, J.M., 1999a. Purification and characterization of galanin and scyliorhinin I from the hybrid sturgeon, *Scaphirhynchus platyrhynchus* ? *Scaphirhynchus albus* (Acipenseriformes). *General and Comparative Endocrinology*, 113, 38-45.
- Wang, Z.W., Zhou, Y.T., Kakuma, T., Lee, Y., Higa, M., Kalra, S.P., Dube, M.G., Kalra, P.S. y Unger, R.H., 1999b. Comparing the hypothalamic and extrahypothalamic actions of endogenous hyperleptinemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 96, 10373-10378.

- Wang, L., Barachina, D., Martínez, V., Wei, J.Y. y Taché, Y., 2000. Synergistic interaction between CCK and leptin to regulate food intake. *Regulatory Peptides*, 92, 79-85.
- Wank, S.A., Harkins, R., Jensen, R.T., Shapira, H., de Weerth, A. y Slattery, T., 1992a. Purification, molecular cloning and functional expression of the cholecystokinin receptor from rat pancreas. *Proceeding of the National Academy of Science of USA*, 89, 3125-3129.
- Wank, S.A., Pisegna, J.R. y de Weerth, A., 1992b. Brain and gastrointestinal cholecystokinin receptor family: structure and functional expression. *Proceeding of the National Academy of Science of USA*, 89, 8691-8695.
- Ward, A.S., Comer, S.D., Haney, M., Fischman, M.W. y Foltin, R.W., 1999. Fluoxetine-maintained obese humans: effect on food intake and body weight. *Physiology & Behavior*, 66, 815-821.
- Warwick, Z.S., McGuire, C.M., Bowen, K.J. y Synowski, S.J., 2000. Behavioral components of high-fat diet hyperphagia: meal size and postprandial satiety. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 278, R196-R200.
- Washburn, B.S., Bruss, M.L., Avery, E.H. y Freedland, R.A., 1992. Effects of estrogen on whole animal and tissue glucose use in female and male rainbow trout. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 263: R1241-R1247.
- Wegert, S. y Caprio, J., 1991. Receptor sites for amino acids in the facial taste systems of the channel catfish. *Journal of Comparative Physiology*, 168A, 201-211.
- Weiss, G.F. y Leibowitz, S.F., 1988. The impact of serotonergic agonist on nocturnal patterns of macronutrient selection. *Neuroscience Abstracts*, 14, 613.
- Welch, I., Saunders, K. y Read, N.W., 1985. Effect of ileal and intravenous infusions of fat emulsions on feeding and satiety in human volunteers. *Gastroenterology*, 89, 1293-1297.
- Welch, C.C., Grace, M.K., Billington, C.J. y Levine, A.S., 1994. Preference and diet type affect macronutrient selection in neuropeptide Y-stimulated rats. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 266, R426-R433.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77, 591-625.
- Werner, E.E., Gilliam, J.F., Hall, D.J. y Mittelbach, G.G., 1983. An experimental test of the effects of predation risk on habitat use in fish. *Ecology*, 64, 1540-1548.
- Wettergren, A., Wejdemann, M., Meisner, S., Stadil, F. y Holst, J.J., 1997. The inhibitory effect of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 7-36 amide on gastric acid secretion in humans depends on an intact vagal innervation. *Gut*, 40, 597-601.
- Wettergren, A., Wejdemann, M. y Holst, J.J., 1998. Glucagon-like peptide-1 inhibits gastro-pancreatic function by inhibiting central parasympathetic outflow. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 275, G984-G992.
- White, J.D., 1993. Neuropeptide Y: a central regulator of energy homeostasis. *Regulatory Peptides*, 49, 93-107.
- White, B.D., Dean, R.G. y Martin, R.J., 1994. Low protein diet increase neuropeptide Y

- gene expression in the basomedial hypothalamus of rats. *The Journal of Nutrition*, 124, 1152-1160.
- Wilson, R.P., 1994. Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture*, 124, 67-80.
- Wilson, R.P., Poe, W.E., Nemetz, T.G. y MacMillan, J.R., 1988. Effect of recombinant bovine growth hormone administration on growth and body composition of channel catfish. *Aquaculture*, 73, 229-236.
- Winberg, S. y Nilsson, G.E., 1993. Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behaviour and stress reactions, with particular reference to fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 106C, 597-614.
- Winberg, S. y Nilsson, G. E., 1996. Multiple high-affinity binding sites for [³H]serotonin in the brain of a teleost fish, the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *The Journal of Experimental Biology*, 199, 2429-2435.
- Winberg, S. y Lepage, O., 1998. Elevation of brain 5-HT activity, POMC expression and plasma cortisol in socially subordinate rainbow trout. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 43, R645-R654.
- Winberg, S., Nilsson, G.E., Spruijt, B. M. y Höglund, U., 1993. Spontaneous locomotor activity in Arctic charr measured by computerized imaging technique: role of brain serotonergic activity. *The Journal of Experimental Biology*, 179, 213-232.
- Winberg, S., Nilsson, A., Hylland, P., Söderstrom, V. y Nilsson, G. E., 1997. Serotonin as a regulator of hypothalamic-pituitary-interrenal activity in teleost fish. *Neuroscience Letters*, 230, 113-116.
- Winberg, S., Øverli, Ø. y Lepage, O., 2001. Suppression of aggression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary L-tryptophan. *The Journal of Experimental Biology*, 204, 3867-3886.
- Woldbye, D.P.D. y Larsen, P.J., 1998. The how and Y of eating. *Nature Medicine*, 4, 671-672.
- Wolden-Hanson, T., Mitton, D.R., McCants, R.L., Yellon, S.M., Wilkinson, C.W., Matsumoto, A.M. y Rasmussen, D.D., 2000. Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinology*, 141, 487-497.
- Wolkowitz, O.M., Gertz, B., Weingartner, H., Beccaria, L., Thompson, K. y Liddle, R.A., 1990. Hunger in humans induced by MK-329, a specific peripheral-type cholecystokinin receptor antagonist. *Biological Psychiatry*, 28, 169-173.
- Woltman, T. y Reidberger, R., 1999. Role of cholecystokinin in the anorexia produced by duodenal delivery of peptone in rats. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 276, R1701-R1709.
- Wong, A.O.L., Chang, J.P. y Peter, R.E., 1993. In vitro and in vivo evidence that dopamine exerts growth hormone-releasing activity in goldfish. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 264, E925-E932.
- Woo, N.Y.S. y Kelly, S.P., 1995. Effects of salinity and nutritional status on growth and metabolism of *Sparus sarba* in a closed seawater system. *Aquaculture*, 135, 229-238.
- Woods, S.C., Seeley, R.J., Porte Jr., D. y Schwartz, M.W., 1998. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*, 280, 1378-1383.

- Wraith, A., Törnsten, A., Chardon, P., Harbitz, I., Chowdhary, B.P., Andersson, L., Lundin, L.-G. y Larhammar, D., 2000. Evolution of the neuropeptide Y receptor family: gene and chromosome duplications deduced from the cloning and mapping of five receptor subtype genes in pig. *Genome Research*, 10, 302-310.
- Wren, A.M., Small, C.J., Ward, H.L., Murphy, K.G., Dakin, C.L., Taheri, S., Kennedy, A.R., Roberts, G.H., Morgan, D.G., Ghatei, M.A. y Bloom, S.R., 2000. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*, 141, 4325-4328.
- Wright Jr, J.R., O'Hali, W., Yang, H., Han, X.X. y Bonen, A., 1998. GLUT-4 deficiency and absolute peripheral resistance to insulin in the teleost fish tilapia. *General and Comparative Endocrinology*, 111, 20-27.
- Wurtman, R.J. y Fernstrom, J.D., 1974. Effects of diet on brain neurotransmitters. *Nutrition Reviews*, 32, 193-208.
- Yaghoubian, S., Filosa, M.F. y Youson, J.H., 2001. Proteins immunoreactive with antibody against a human leptin fragment are found in serum and tissues of the sea lamprey, *Petromyzon marinus* L. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 129B, 777-785.
- Yamakana, A., Kunii, K., Nambu, T., Tsujino, N., Sakai, A., Matsuzaki, I., Miwa, Y., Goto, K. y Sakurai, T., 2000. Orexin-induced food intake involves neuropeptide Y pathway. *Brain Research*, 859, 404-409.
- Yamamoto, T., Shima, T., Furuita, H., Shiraishi, M., Sánchez-Vázquez, F.J. y Tabata, M., 2000. Self-selection of diets with different amino acid profiles by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 187, 375-386.
- Yamamoto, T., Shima, T., Furuita, H., Shiraishi, M., Sánchez-Vázquez, F.J. y Tabata, M., 2001. Influence of decreasing water temperature and shortening of the light phase on macronutrient self-selection by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and common carp *Cyprinus carpio*. *Fisheries Science*, 67, 420-429.
- Yamamoto, T., Shima, T., Furuita, H. y Suzuki, N., 2002. Influence of feeding diets with and without fish meal by hand and by self-feeders on feed intake, growth and nutrient utilization of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 214, 289-305.
- Yamamoto, T., Shima, T., Furuita, H. y Suzuki, N., 2003. Effect of water temperature and short-term fasting on macronutrient self-selection by common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 220, 655-666.
- Yamanaka, A., Sakurai, T., Katsumoto, T., Yanagisawa, M. y Goto, K., 1999. Chronic intracerebroventricular administration of orexin-A to rats increases food intake in daytime, but has no effect on body weight. *Brain Research*, 849, 248-252.
- Yamauchi, K., Nishioka, R.S., Young, G., Ogasawara, T., Hirano, T. y Bern, H.A., 1991. Osmoregulation and circulating growth hormone and prolactin in hypophysectomized coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) after transfer to fresh water and seawater. *Aquaculture*, 92, 33-42.
- Yegen, B.C., Gurbuz, V., Coskun, T., Bozkurt, A., Kurtel, H., Alican, I. y Dockray, G.J., 1996. Inhibitory effects of gastrin releasing peptide on gastric emptying in rats. *Regulatory Peptides*, 61, 175-180.
- York, D.A., Lin, L., Smith, B.K. y Chen, J., 2000. Enterostatin as a regulator of fat intake. *En:*

- Neural and Metabolic Control of Macronutrient Intake*. Berthoud, H.-R. y Seeley, R.J. (Eds.). CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 295-308.
- Yoshihara, T., Honma, S. y Honma, K., 1996. Effects of restricted daily feeding on neuropeptide Y release in the rat paraventricular nucleus. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 270, E589-E595.
- Yox, D.P., Brenner, L. y Ritter, R.C., 1992. CCK-receptor antagonist attenuate suppression of sham feeding by intestinal nutrients. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 262, R554-R561.
- Yu, H.S. y Reiter, R.J., 1993. Melatonin. Biosynthesis, physiological effects and clinical application. CRC Press, Boca Raton, 1993.
- Zachmann, A., Ali, M.A. y Falcon, J., 1992. Melatonin and its effects in fishes: an overview. En: *Rhythms in fishes*. Ali, M.A. (Ed.). Plenum Press, New York, pp. 149-165.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. y Friedman, J.M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425-432.
- Zhsanova, I.V., Wang, S.Y., Leclair, O.U. y Danilova, N.P., 2001. Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish. *Brain Research*, 903, 263-268.
- Zhu, Y., Yamanaka, A., Kunii, K., Tsujino, N., Goto, K. y Sakurai, T., 2002. Orexin-mediated feeding behavior involves both leptin-sensitive and -insensitive pathways. *Physiology & Behavior*, 77, 251-257.
- Zierler, K., 1999. Whole body glucose metabolism. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 276, E409-E426.
- Zippel, U., Heidel, E. y Davidova, H., 1999. Action of cholecystokinin and serotonin on lateral hypothalamic neurons of rats. *European Journal of Pharmacology*, 379, 135-140.
- Zittel, T.T., Glatzle, J., Weimar, T., Kless, S., Becker, H.D. y Jehle, E.C., 2002. Serotonin receptor blockade increases food intake and body weight after total gastrectomy in rats. *Journal of Surgical Research*, 106, 273-281.
- Zoufal, R. y Taborsky, M., 1991. Fish foraging periodicity correlates with daily changes of diet quality. *Marine Biology*, 108, 193-196.

Anexos

Producción científica

9. Anexo I

El contenido de la presente Tesis Doctoral ha dado lugar a la siguiente producción científica.

9.1. Publicaciones

- Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2003. Macronutrient selection through postingestive signals in sea bass fed on gelatine capsules. *Physiology & Behavior*, 78, 795-803.
- Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2004. Oral administration of melatonin reduces food intake and modifies macronutrient selection in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Journal of Pineal Research*, (en prensa).
- Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2004. Serotonin affects the quantity and the quality of macronutrients selection in European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, (enviado).
- Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2004. Role of cholecystokinin and its antagonist proglumide on macronutrient selection in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, (enviado).
- Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2004. Influence of nutrient preload on encapsulated macronutrient selection in European sea bass. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, (enviado).
- Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2004. Fish macronutrient selection through post-ingestive signals: effect of macronutrient selective deprivation. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, (enviado).
- Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2004. Salinity influences food intake and modifies macronutrient selection in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Physiology & Behavior*, (enviado).

9.2. Comunicaciones a Congresos Nacionales.

- Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J., Zamora, S. y Madrid, J.A., 2001. Capacidad de la lubina de seleccionar una dieta completa a partir de macronutrientes encapsulados. *VIII Congreso Nacional de Acuicultura*. Santander. Comunicación Oral.
- Mendiola, P., Rubio, V.C., De Costa, J. y Zamora, S., 2001. Influencia del ejercicio inducido por corrientes en la selección de macronutrientes por la lubina (*Dicentrarchus labrax*). *VIII Congreso Nacional de Acuicultura*. Santander. Comunicación Escrita.
- Rubio, V.C., Boluda-Navarro, D., Sánchez-Vázquez, F.J., Zamora, S. y Madrid, J.A., 2001.

Efecto de precargas de macronutrientes sobre la posterior auto-selección de macronutrientes encapsulados en peces. *VIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nutrición*. La Manga del Mar Menor. Comunicación Escrita.

Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J., Zamora, S. y Madrid, J.A., 2003. La administración oral de melatonina reduce la ingesta de alimento y modifica la selección de macronutrientes en la lubina (*Dicentrarchus labrax*, L.). *IX Congreso Nacional de Acuicultura*. Cádiz. Comunicación Oral.

Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J., Zamora, S. y Madrid, J.A., 2003. Influencia de la colestistoquinina y su antagonista proglumide en la selección de macronutrientes en la lubina (*Dicentrarchus labrax*, L.). *IX Congreso Nacional de Acuicultura*. Cádiz. Comunicación Escrita.

Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J., Zamora, S. y Madrid, J.A., 2003. La salinidad influye en la ingesta de alimento y modifica la selección de macronutrientes en la lubina (*Dicentrarchus labrax*, L.). *IX Congreso Nacional de Acuicultura*. Cádiz. Comunicación Escrita.

9.3. Comunicaciones a Congresos Internacionales.

Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2001. Macronutrient self-selection in European sea bass using macroencapsulated nutrients. *Fourth workshop of the COST 827 action on voluntary food intake in fish*. Reykjavík, Iceland. Comunicación Oral.

Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2001. Melatonin modifies food intake and macronutrient self-selection in European sea bass feeding on gelatine capsules. *Fourth workshop of the COST 827 action on voluntary food intake in fish*. Reykjavík, Iceland. Comunicación Escrita.

Sánchez-Vázquez, F.J., Aranda, A., Vivas, M., Rubio, V.C. y Madrid, J.A., 2001. Self-design of diets in European farmed fish operating self-feeders. *JSFS International Commemorative Symposium*. Yokohama, Japón. Comunicación Oral.

Rubio, V.C., Boluda-Navarro, D., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2002. Influence of nutrient preload on encapsulated macronutrient selection in European sea bass. *10th International Symposium on Fish Nutrition*. Rodas, Grecia. Comunicación Escrita.

Rubio, V.C., Boluda-Navarro, D., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2002. Cholecystokinin affects the quantity and the quality of macronutrient selection in European sea bass. *10th International Symposium on Fish Nutrition*. Rodas, Grecia. Comunicación Escrita.

Rubio, V.C., Boluda-Navarro, D., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2003. Serotonin affects the quantity and the quality of macronutrient selection in European sea bass *Dicentrarchus labrax*, L. *World Aquaculture 2003*. Salvador da Bahia, Brasil. Comunicación Oral.

Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2003. Fish macronutrient selection through post-ingestive signals: effect of macronutrient selective fasting. *World Aquaculture 2003*. Salvador da Bahia, Brasil. Comunicación Escrita.

- Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2004. Indoleamines reduce food intake and modify macronutrient self-selection in European sea bass. *5th International Symposium on Fish Endocrinology*. Castellón, España. Comunicación Oral.
- Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2004. Effects of cholecystokinin and its antagonist proglumide on encapsulated macronutrient intake in European sea bass. *5th International Symposium on Fish Endocrinology*. Castellón, España. Comunicación Escrita.
- Almáida-Pagán, P.F., Rubio, V.C., Mendiola, P., De Costa, J. y Madrid, J.A., 2004. Ability of sharnprout seabream to select a complete diet through postingestive signals by means of encapsulated macronutrients. *Aquaculture Europe 2004 "Biotechnologies for Quality"*. Barcelona, España. Comunicación Escrita.

10. Anexo II

Durante el periodo de ejecución de la presente Tesis Doctoral se ha obtenido a la siguiente producción científica accesoria.

10.1. Publicaciones.

- Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2003. Nocturnal feeding reduces sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) pellet-catching ability. *Aquaculture*, 220, 697-705.
- Rubio, V.C., Vivas, M., Sánchez-Mut, A., Sánchez-Vázquez, F.J., Covès, D., Dutto, G. y Madrid, J.A., 2004. Self-feeding of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) under laboratory and farming conditions using a string sensor. *Aquaculture*, 233, 393-403.
- Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2004. Daily demand-feeding and locomotor activity rhythms in sturgeon (*Acipenser ruthenus*). *Animal Behavior* (en preparación).
- Madrid, J.A. y Rubio, V.C., 1998. Ritmos biológicos y Nutrición. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*, XVIII/239, 23-26.
- Sánchez-Vázquez, F.J., Aranda, A., Vivas, M., Rubio, V.C. y Madrid, J.A., 2004. Self-design of diets in European farmed fish operating self-feeders. *Fisheries Science*. (En prensa).
- Madrid, J.A. y Rubio, V.C., 2000. Presión Arterial. En: *Manual de Prácticas de Fisiología Animal*. De Costa, J., Madrid, J.A., Zamora, S. y Rol de Lama, M.A. (Eds.). Diego Marín Librero Editor: Murcia, pp. 99-104.
- Madrid, J.A. y Rubio, V.C., 2000. Espirometría. En: *Manual de Prácticas de Fisiología Animal*. De Costa, J., Madrid, J.A., Zamora, S. y Rol de Lama, M.A. (Eds.). Diego Marín Librero Editor: Murcia, pp. 105-110.
- Madrid, J.A., Sánchez-Vázquez, F.J. y Rubio, V.C., 2000. Determinación del ritmo circadiano de la frecuencia cardíaca y la temperatura corporal. En: *Manual de Prácticas de*

- Fisiología Animal*. De Costa, J., Madrid, J.A., Zamora, S. y Rol de Lama, M.A. (Eds.). Diego Marín Librero Editor: Murcia, pp. 183-191.
- Zamora, S. y Rubio, V.C., 2001. Requerimientos energéticos de los teleósteos. En: *Acuicultura: cultivo y alimentación de peces*. Zamora Navarro, S. y Martínez López, F.J. (Eds.). Universidad de Murcia: Murcia, pp. 13-34.
- Madrid, J.A. y Rubio, V.C., 2001. Ritmos biológicos en Acuicultura. En: *Acuicultura: cultivo y alimentación de peces*. Zamora Navarro, S. y Martínez López, F.J. (Eds.). Universidad de Murcia: Murcia, pp. 209-230.
- Madrid, J.A. y Rubio, V.C., 2003. Presión Arterial. En: *Manual de Prácticas de Fisiología Animal, 2ª Edición*. De Costa, J., Madrid, J.A., Zamora, S. y Rol de Lama, M.A. (Eds.). Diego Marín Librero Editor: Murcia, pp. 101-106.
- Madrid, J.A. y Rubio, V.C., 2003. Espirometría. En: *Manual de Prácticas de Fisiología Animal, 2ª Edición*. De Costa, J., Madrid, J.A., Zamora, S. y Rol de Lama, M.A. (Eds.). Diego Marín Librero Editor: Murcia, pp. 107-112.
- Madrid, J.A., Sánchez-Vázquez, F.J. y Rubio, V.C., 2003. Determinación del ritmo circadiano de la frecuencia cardíaca y la temperatura corporal. En: *Manual de Prácticas de Fisiología Animal, 2ª Edición*. De Costa, J., Madrid, J.A., Zamora, S. y Rol de Lama, M.A. (Eds.). Diego Marín Librero Editor: Murcia, pp. 191-199.

10.2. Comunicaciones a Congresos Nacionales

- Madrid, J.A. y Rubio, V.C., 1998. Ritmos Biológicos y Nutrición. *II Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nutrición Básica y Aplicada*. Valencia. Ponencia.
- Rubio, V.C., Lax, P., García, F.J. y Madrid, J.A., 1998. Efecto del Ejercicio Físico sobre la Sincronización al Alimento en la Rata. *VI Reunión de Grupos de Cronobiología y Cronopsicología*. Valladolid. Comunicación Oral.
- Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J., Zamora, S. y Madrid, J.A., 1999. Método de Registro Continuo de Alimento no Consumido en Piscicultura. *VII Congreso Nacional de Acuicultura*. Las Palmas de Gran Canaria. Comunicación Escrita.
- Rubio, V.C., Aranda, A., Vivas, M., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2000. ¿Cuánto deseáis comer? Nuevas técnicas de alimentación en Acuicultura. *I Feria Internacional de Tecnologías Emergentes, Ciencia y Empresa (FITEC)*. Barcelona. Comunicación Escrita.
- Rubio, V.C., Aranda, A., Vivas, M., Sánchez-Mut, A., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2000. ¿Qué queréis comer? Diseño a la carta de dietas para peces. *I Feria Internacional de Tecnologías Emergentes, Ciencia y Empresa (FITEC)*. Barcelona. Comunicación Escrita.
- Rubio, V.C., Vivas, M., Patiño, J.L., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2001. Mejora de los sistemas de alimentación a demanda para lubinas mediante la incorporación de un sensor de estiramiento. *VIII Congreso Nacional de Acuicultura*. Santander. Comunicación Escrita.
- Boluda-Navarro, D., Luz, R.K., Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J., Fernández-Pasquier, V. y

Madrid, J.A., 2003. Capacidad del lenguado (*Solea senegalensis*) para utilizar alimentadores de autodemanda. *IX Congreso Nacional de Acuicultura*. Cádiz. Comunicación Multimedia y Oral.

10.3. Comunicaciones a Congresos Internacionales

- Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2000. Use of straining sensors and detection of uneaten food for study of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) feeding rhythms. *Aqua 2000*. Niza, Francia. Comunicación Escrita.
- Rubio, V.C., Vivas, M., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2000. A simple method to quantify real food intake in macronutrient self-selection experiments. *Third workshop of the COST 827 action on voluntary food intake in fish*. Maratea, Italia. Comunicación Escrita.
- Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2002. Daily demand-feeding and locomotor activity rhythms in sturgeon (*Acipenser ruthenus*). *Aquaculture Europe 2002. Conference on "Seafarming-Today and Tomorrow"*. Trieste, Italia. Comunicación Oral.
- Boluda-Navarro, D., Sánchez-Vázquez, F.J., Madrid, J. A. y Rubio, V.C., 2002. Ability of the sole (*Solea senegalensis*) to operate self feeders. *Aquaculture Europe 2002. Conference on "Seafarming-Today and Tomorrow"*. Trieste, Italia. Comunicación Oral.
- Rubio, V.C., Velázquez, M., Vivas, M., Boluda-Navarro, D., Luz, R.K., Sánchez-Mut, A., Martínez, F.J., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A., 2003. Self-feeding of five commercial species using a string sensor. *World Aquaculture 2003*. Salvador, Brasil. Comunicación Escrita.

11. Anexo III

Durante el periodo de ejecución de la presente Tesis Doctoral el doctorando ha participado en los siguientes Proyectos de Investigación y Contratos de I+D:

11.1. Proyectos de Investigación

Título del proyecto: Autoselección de macronutrientes mediante comederos a demanda: una nueva aproximación para el diseño de dietas en lubina.

Cuantía económica: 10.120.000 ptas.

Entidad patrocinadora: Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CYCIT) (MAR98-0446).

Investigador responsable: Juan Antonio Madrid Pérez.

Fecha de la financiación: 1998. *Duración de la financiación:* 4 años.

Título del proyecto: Optimización de las estrategias de alimentación como métodos de reducción del impacto ambiental de cultivos marinos.

Cuantía económica: 28.102.500 ptas.

Entidad patrocinadora: Fondos FEDER con Código 1FD97-1128.

Investigador responsable: Juan Antonio Madrid Pérez.

Fecha de la financiación: 1999. *Duración de la financiación:* 3 años.

Título del proyecto: Dietary self-selection in fish: a geometrical approach for optimizing aquaculture production.

Cuantía económica: 22.211.865 ptas.

Entidad patrocinadora: Comisión Europea (Q5CA-2001-989).

Investigador responsable: Fco. Javier Sánchez Vázquez.

Fecha de la financiación: 2001. *Duración de la financiación:* 4 años.

Título del proyecto: Aplicación de la auto-selección de macronutrientes mediante comederos a demanda para el diseño de dietas de dos nuevas especies: sargo picudo (*Diplodus puntazzo*) y lenguado (*Solea senegalensis*).

Cuantía económica: 10.500.000 ptas.

Entidad patrocinadora: Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CYCIT) (AGL2001-0593-C03-01).

Investigador responsable: Juan Antonio Madrid Pérez.

Fecha de la financiación: 2002. *Duración de la financiación:* 4 años.

11.2. Contratos de Investigación

Título del contrato: Optimización de las estrategias de alimentación de la dorada (*Sparus aurata*).

Cuantía económica: 549.066 ptas.

Entidad patrocinadora: Aquadelt, S.A.

Investigador responsable: Juan Antonio Madrid Pérez.

Fecha de la financiación: 1999. *Duración de la financiación:* 1 año.

