

Nutrición y Morfogénesis: Efecto de la Dieta Sobre la Calidad Larvaria en Peces

Enric Gisbert, Ignacio Fernández, Alicia Estévez

IRTA – Sant Carles de la Rápita

Crta. del Poblenou, km 5.5, 43540 Sant Carles de la Rápita (Tarragona), España

Tel: +34 977745427 ext. 1835; email: enric.gisbert@irta.cat

Abstract

La mayoría de las deformaciones esqueléticas y problemas pigmentarios aparecen durante las fases larvaria y juvenil, es decir, durante un corto periodo de tiempo donde diversos procesos biológicos influyen en la organogénesis, morfogénesis y metamorfosis del animal. En general, las larvas de peces marinos eclosionan con un estadio de desarrollo menos avanzado que el de los vertebrados superiores, lo que implica que la secuencia del desarrollo del sistema esquelético y pigmentario en teleósteos sea considerablemente diferente a la de estos. Esta particularidad representa una notable ventaja a la hora de estudiar el papel que juegan distintos factores bióticos y abióticos sobre el patrón normal de formación del esqueleto y pigmentación en peces. Las deformidades esqueléticas y problemas de despigmentación pueden ser causadas por diversos motivos, siendo la nutrición uno de los más importantes. El presente trabajo es una revisión de los conocimientos que se tienen en la actualidad sobre el rol de determinados nutrientes (minerales, vitaminas, proteínas y lípidos) sobre el desarrollo de la larva, formación del esqueleto, aparición de malformaciones esqueléticas, pigmentación y metamorfosis durante los estadios iniciales de desarrollo de peces marinos.

Palabras clave: desarrollo, nutrición, larvas, calidad

Introducción

En las últimas décadas el sector de la acuicultura ha sufrido una gran expansión y desarrollo, resultando en algunos casos en una alta competencia entre las empresas acuícolas, una sobreproducción de determinadas especies y por consiguiente, una reducción en su precio de mercado. Estos hechos han forzado a la industria a reducir sus costes de producción, mejorando la eficiencia del proceso productivo. En este sentido, las deformaciones esqueléticas y su incidencia son uno de los principales factores, junto con la despigmentación en peces planos, que afectan a los costes de producción de peces marinos, pues tienen un efecto directo sobre el crecimiento, supervivencia y morfología externa de los animales (Matsusato, 1986; Divanach *et al.*, 1997; Koumoundouros *et al.*, 2002).

Las pérdidas económicas asociadas a las deformidades esqueléticas y problemas de despigmentación se localizan en dos puntos de la cadena de producción: en las *hatcheries*, reduciendo la supervivencia larvaria y la eficiencia del crecimiento de los peces malformados, y durante el engorde, donde los peces deformes y despigmentados tienen que ser descartados o vendidos a precios inferiores a los del mercado. Durante ambas etapas del proceso productivo, los gastos de alimentación son considerables (más de un 50% de los totales), alimentándose peces con deformaciones que no sobreviven al proceso productivo, o que sobreviven pero que debido a sus deformaciones el índice de conversión de alimento ingerido es inferior al normal, y su venta, a precio inferior, no cubre los gastos de su producción. A estas pérdidas por alimentación se suman los gastos de mano de obra para el descarte de los individuos deformes. Alrededor del 30% de las larvas de peces marinos producidas en criaderos comerciales pueden presentar malformaciones esqueléticas de diversa magnitud. Dichas deformaciones, que afectan el aspecto exterior y calidad del ejemplar, entre las que destacan las de la columna vertebral (lordosis, cifosis y/o escoliosis), mandíbula, opérculo y/o aletas, así como defectos pigmentarios o problemas en la migración del ojo en el caso de los peces planos, representan una importante pérdida económica para el acuicultor y una reducción considerable en la imagen de calidad del producto final si éste es comercializado (Alfonso *et al.*, 2000; Boglione *et al.*, 2001; Verhaen *et al.*, 2007).

Este hecho representa uno de los cuellos de botella más importantes de la acuicultura marina actual, que los acuicultores solventan sobredimensionado su producción de alevines con el coste económico (mano de obra, cultivos auxiliares, ocupación de instalaciones, etc.) que esto representa. En este sentido, la producción anual de más de 500 millones de alevines de especies marinas conlleva asociada una supervivencia entorno al 15%, lo que representa una pérdida global de millones de euros. A pesar de ello, no ha sido hasta esta última década cuando se ha empezado a prestar atención sobre el origen de dichas malformaciones esqueléticas en peces marinos y problemas asociados a despigmentación en peces planos.

Métodos para el estudio de deformaciones esqueléticas en larvas

El método más generalizado para el estudio de deformaciones esqueléticas en larvas de peces es el basado en la tinción selectiva de los tejidos óseos y cartilagosos por colorantes específicos como el rojo de alizarina S y el azul alción, respectivamente. Así, el rojo de alizarina S tiñe la matriz mineralizada del hueso, mientras que el azul alción colorea los condrocitos y matriz cartilaginosa.

Existen diferentes variantes y modificaciones de este método en la literatura (Dingerkus & Ulher, 1977; Klymkowky & Hanken, 1991; Gavaia *et al.*, 2000, ver protocolos detallados y soluciones de trabajo en dichas publicaciones), si bien todos ellos presentan los siguientes pasos en común: fijación y conservación del material biológico en formaldehído tamponado y/o etanol 70%; rehidratación de los individuos mediante baños sucesivos en agua destilada durante varios minutos y tinción en solución de azul alción (la duración de este periodo ha de ajustarse según la especie, el tamaño y edad de la muestra, desaconsejándose periodos largos de exposición a la solución colorante pues pueden acabar descalcificando el tejido óseo, dando lugar a alteraciones en los resultados con la tinción de éste por el rojo de alizarina). Tras la tinción del tejido cartilaginoso se procede a la rehidratación progresiva de la muestra, macerándose los individuos en una solución acuosa de KOH al 1% con un 3% de peróxido de hidrógeno (9:1 v/v) hasta que los elementos esqueléticos son claramente visibles por transparencia. Con el fin de facilitar la penetración del rojo de alizarina a través de la musculatura corporal, las muestras son mantenidas entre 6 y 20 horas en una solución acuosa saturada en borato sódico, conteniendo 0.3-0.5g de

tripsina (el uso de la tripsina es opcional, no siendo recomendada por algunos autores en larvas de pequeño tamaño; Gavaia *et al.*, 2000). Finalmente, el tejido óseo es coloreado con una solución de rojo de alizarina S durante 24 horas aproximadamente, y conservándose las muestras en glicerol al 100% con algunas gotas de timol (antifúngico), previo lavado de las muestras con agua destilada y KOH con el fin de eliminar el exceso de colorante de los tejidos blandos.

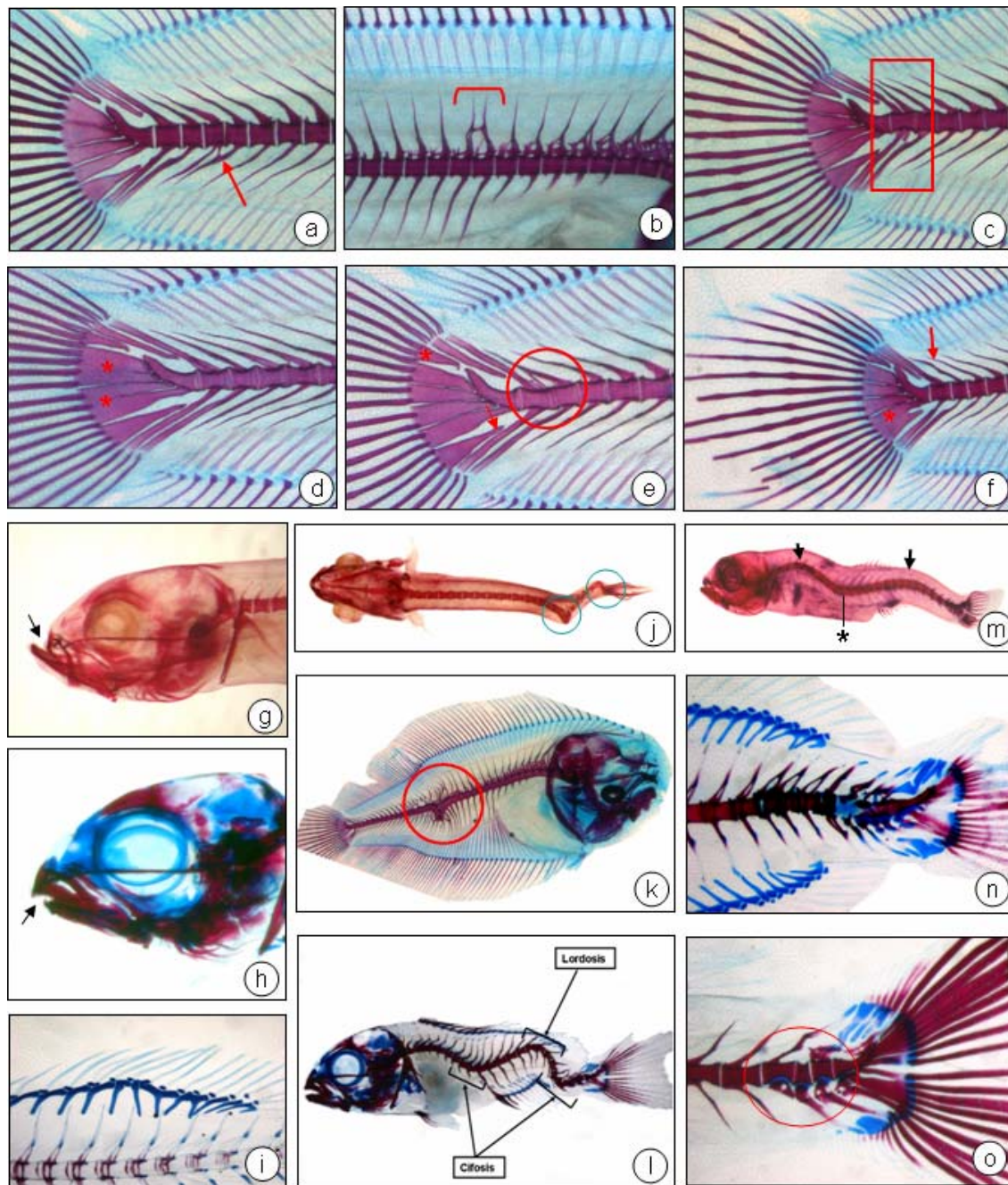


Figura 1. Diferentes tipos de deformaciones esqueléticas que se pueden detectar en larvas de peces marinos. a) Fusión de las espinas hemales de vértebras caudales en lenguado senegalés; b) fusión de las espinas neurales en vértebras hemales de lenguado senegalés; c) fusión de los cuerpos vertebrales preurales lenguado senegalés; d) fusión de los hipurales 4-3, y 2-1 en el complejo caudal del lenguado senegalés; e) deformación del hipural 1 (asterisco) y parahipural (flecha) en el complejo caudal del lenguado senegalés, fusión y deformación cuerpos vertebrales, y fusión de espinas neurales; f) deformación del urostilo del complejo caudal en lenguado senegalés (flecha), fusión del hipural 4 con el parahipural (asterisco) y deformación de las espinas hemales modificadas; g) reducción del premaxilar y supradesarrollo del dentario en lubina europea, dando como resultado una larva con un marcado prognatismo; h) larva de dorada con la mandíbula inferior subdesarrollada (pico de loro); i) fusión y deformación de los pterigóforos (base a los radios de las aletas) en dorada; j) escoliosis en vértebras hemales y preurales en lubina europea derivadas posiblemente de un traumatismo por manipulación indebida; k) escoliosis vertebral por traumatismo en lenguado senegalés; l) lordosis y cifosis en la columna vertebral de dorada; m) lordosis (flechas) y cifosis (*) en la columna vertebral de lubina europea; n) compresión y fusión y no osificación de cuerpos vertebrales en vértebras de dorada; o) compresión de cuerpos vertebrales y deformación de espinas hemales y neurales asociadas en dorada. Las diferencias en los resultados de coloración entre las fotografías no representan grados de osificación diferentes entre los animales, sino variaciones en los procesos de tinción de las estructuras óseas de las especies consideradas.

Adicionalmente, y teniendo en cuenta el tamaño de los organismos, también se utilizan técnicas de rayos X (Roy *et al.*, 2002; Witten *et al.*, 2005; Fejdall *et al.*, 2007) con el fin de evaluar el desarrollo del esqueleto y detectar deformaciones de éste, si bien su aplicación es más bien reducida debido a la baja disponibilidad de este tipo de aparatos en instalaciones de acuicultura, su elevado coste y nivel de preparación técnica del personal para su uso. Así, el uso de rayos X para el estudio de deformaciones esqueléticas se utiliza principalmente para animales juveniles y adultos, donde las técnicas de doble tinción resultan insatisfactorias debido al tamaño corporal de los animales. En determinadas situaciones en las que se precisa detectar animales con deformaciones esqueléticas sin proceder al sacrificio de los animales, como en el caso del pez cebra u otros peces usados como modelos biológicos, se utilizan cromóforos fluorescentes como la calceína ($C_{30}H_{26}N_2O_{13}$) la cual se une específicamente al calcio de las estructuras osificadas y permite teñir el tejido esquelético (Du *et al.*, 2001; Elizondo *et al.*, 2005). A pesar de que la calceína permita teñir los animales *in vivo* en menos de 20 minutos, a diferencia de la técnica de doble tinción, no permite identificar el tejido óseo del cartilaginoso, ya que ambos tipos de estructuras son coloreadas inespecíficamente.

Desarrollo larvario, nutrición y deformaciones esqueléticas

Las larvas de peces marinos, consideradas como los vertebrados más pequeños del planeta (Wieser, 1995), eclosionan con la mayoría de sus órganos y sistemas incompletos o parcialmente desarrollados, sistemas que sufren una rápida e intensa diferenciación y transformación con el fin de que el organismo adquiera, al final de la etapa larvaria, las características morfológicas y fisiológicas propias del estadio (fentotipo) juvenil. Distintos parámetros pueden influenciar el desarrollo armónico de la larva y alterar su ontogénesis, pudiendo afectar de forma directa a su viabilidad y calidad. En condiciones naturales, dichas larvas perecerían pues la selección natural impediría su crecimiento y desarrollo, sin embargo, bajo las condiciones que se dan en los criaderos comerciales, estos animales tienen mayores probabilidades de sobrevivir, ya sea por la ausencia de depredadores naturales, la elevada disponibilidad de alimento o el control estricto de los parámetros ambientales que regulan su crecimiento y desarrollo.

Las principales malformaciones esqueléticas observadas en larvas y juveniles de peces afectan a diferentes regiones del cuerpo del animal, y en particular la cabeza, columna vertebral y cola (Andrades *et al.*, 1996; Koumoundouros *et al.*, 1999; Alfonso *et al.*, 2000, Verhaegen *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2008). En la región cefálica las malformaciones más comunes afectan al desarrollo del esqueleto faríngeo (mandíbula superior e inferior) y la formación del opérculo. Deformaciones y compresiones de los cuerpos vertebrales son las causas más comunes de la aparición de columnas vertebrales escolióticas, lordóticas y/o cifóticas. Problemas en el desarrollo del esqueleto también pueden afectar a la formación del complejo caudal (fusión de distintos elementos esqueléticos que forman la cola), resultando en la ausencia de ésta en casos extremos o la aparición de elementos supranumerarios. En la Figura 1 se presentan algunos ejemplos de deformaciones esqueléticas observadas en distintos estudios.

La aparición de malformaciones esqueléticas está íntimamente relacionada con los procesos de formación, proliferación, diferenciación y desarrollo del esqueleto del animal, afectando no solo la apariencia externa del ejemplar, sino también su crecimiento, supervivencia, locomoción, ingesta del alimento y vulnerabilidad a patógenos y condiciones de cultivo adversas (Lewis & Lall, 2006). En este sentido, diversos factores (abióticos, bióticos y xenobióticos) pueden afectar

los procesos anteriormente citados, y dar como resultado el desarrollo de deformaciones esqueléticas. Si bien, el presente trabajo se centra en el efecto de los componentes de la dieta sobre el desarrollo de deformaciones esqueléticas, es importante también hacer mención de otros factores que pueden afectar al proceso de esqueletogénesis, citados a continuación.

Factores ambientales como la luz (intensidad lumínica), temperatura, salinidad, pH, oxígeno disuelto, etc., tienen un efecto directo sobre el desarrollo normal de la larva, y por tanto, ligeras desviaciones sobre el rango óptimo de cualquiera de los parámetros ambientales anteriormente citados, puede resultar en un desarrollo anormal del individuo, derivando en la aparición de deformidades (Lall & Lewis-McCrea, 2007). A título de ejemplo, recientemente, se ha puesto en evidencia el papel que juega la temperatura en el desarrollo de deformaciones esqueléticas, problemas que se originan por el asincronismo que existe entre el desarrollo de la musculatura y del esqueleto (teoría del mecanostato). Es decir, un incremento de la temperatura del agua superior a los niveles óptimos de la especie resulta en un mayor crecimiento y desarrollo de la musculatura del tronco, llegando a comprimir y deformar los cuerpos vertebrales de la larva, todavía no osificados en su totalidad, y originando por consiguiente animales con columnas vertebrales lordóticas (Proyecto ORCIS, 2004). La presencia de agentes xenobióticos en el agua, como contaminantes, metales pesados, pesticidas (organoclorados, organofosfatos y carbamatos), pueden ser también responsables de problemas esqueléticos, al actuar como agentes disruptores del desarrollo normal del individuo. Aunque su incidencia en condiciones de cultivo es más bien reducida debido al estricto control de la calidad del agua que se lleva a cabo en la mayoría de criaderos. Los factores bióticos que afectan al desarrollo del animal incluyen la densidad del cultivo, traumatismos derivados del manejo de las larvas, agentes patógenos, factores genéticos asociados a situaciones de elevada consanguinidad y desequilibrios nutricionales. Si bien, el citado trabajo se ciñe al efecto de la dieta sobre el desarrollo normal del tejido esquelético y aparición de deformaciones esqueléticas, esto no quiere decir que el resto de factores anteriormente mencionados, tanto bióticos como abióticos, no tengan un importante papel sobre el desarrollo y calidad de la larva y el juvenil.

En la actualidad, diversos estudios han demostrado que existe una marcada relación entre la alimentación de la larva y la aparición de malformaciones esqueléticas en teleósteos marinos

(consultar revisiones de Cahu *et al.*, 2003; Lall & Lewis-McCrea, 2007). Así, diversos autores han demostrado que la incidencia de larvas con deformaciones puede reducirse considerablemente mediante el desarrollo de una dieta ajustada a los requerimientos nutricionales de la especie y de su estadio de desarrollo particular (Cahu *et al.*, 2003). El efecto de distintos nutrientes sobre el desarrollo del esqueleto se describe a continuación.

Minerales

Existen alrededor de veinte minerales y elementos traza necesarios para la vida del animal, sus funciones se pueden resumir de la siguiente manera: son constituyentes esenciales de las estructuras esqueléticas, tales como huesos y dientes; juegan un papel clave en el mantenimiento de la presión osmótica del animal; sirven como constituyentes estructurales de tejidos blandos, jugando un papel vital en la transmisión de los impulsos nerviosos y contracciones musculares, así como también en el equilibrio ácido-base corporal y consecuentemente regulan el pH de la sangre y otros fluidos corporales. Finalmente mencionar que los minerales sirven también como constituyentes esenciales de muchas enzimas, vitaminas, hormonas y pigmentos respiratorios, o como cofactores en el metabolismo, catálisis y como activadores enzimáticos.

Los minerales como el calcio y el fósforo son indispensables para el desarrollo y el crecimiento del esqueleto, encontrándose ambos de forma combinada (hidroxiapatita) en el hueso. A su vez, el calcio es también necesario para el mantenimiento del equilibrio osmótico del animal, y el buen funcionamiento y actividad de los tejidos muscular y nervioso. A diferencia de los vertebrados terrestres en los que el aporte de los citados minerales se realiza a través de la dieta, los peces, al igual que la mayoría de animales acuáticos son capaces de absorber el calcio a través de las branquias; y por consiguiente sus requerimientos están basados en su capacidad de absorber el citado nutriente del agua y no en su aporte a través de la dieta; si bien en especies de agua dulce que habitan aguas de dureza reducida pueden ocasionarse situaciones en que los bajos niveles de este mineral en el organismo deriven en escoliosis y malformaciones craneales (Guillaume *et al.*, 2002).

Sin embargo, los peces no son capaces de cubrir sus requerimientos nutricionales en fósforo a partir de los procesos de osmoregulación, representando la dieta la principal fuente de fósforo

para el organismo (0.5-0.9%). Dietas pobres en fósforo resultan en una disminución del crecimiento, una baja mineralización del hueso, una disminución en la producción de osteoblastos y un aumento de osteoclastos, resultando en un incremento de la incidencia de deformaciones, tanto en la columna vertebral (escoliosis y compresión vertebral), como en el cráneo (deformaciones en el esqueleto faríngeo) (Lall & Lewis-McCrea, 2007). Otra sintomatología asociada a dietas pobres en este mineral son un exceso en el depósito lipídico y un aumento en la actividad de determinados enzimas neoglucogénicos (Guillaume *et al.*, 2002). A pesar de que los requerimientos nutricionales para este nutriente no han sido poco estudiados en peces (0.5-0.9%), es de esperar que durante el desarrollo de la larva éstos sean mucho mayores a los descritos, dada la rapidez e intensidad de crecimiento y desarrollo de la larva.

El magnesio es un constituyente importante de los tejidos óseos, presentando su metabolismo similitudes con el del calcio. Este metal actúa como co-factor en numerosas reacciones enzimáticas relacionadas con la osmoregulación, síntesis proteica y crecimiento. La carencia de magnesio se refleja en síntomas como la disminución del crecimiento, anorexia, deformaciones esqueléticas, calcinosis renal y distrofia muscular. El requerimiento en magnesio en los peces de agua dulce es relativamente bajo (0.05-0.1%) y posiblemente se vea satisfecho, al menos en parte, por el agua donde se encuentra en concentraciones de 1 al 3 mg/l. Sin embargo, no se ha demostrado experimentalmente un requerimiento alimentario de este mineral en peces marinos.

Finalmente mencionar que un consumo excesivo de determinados minerales como el estroncio, litio, aluminio, hierro, molibdeno, selenio, plomo, bismuto o plomo puede tener efectos negativos sobre el metabolismo del tejido esquelético, tal y como ha sido descrito en vertebrados terrestres (NRC, 2005), siendo de especial importancia el control de dichos metales tanto en el alimento proporcionado a las larvas, como en el agua de la que se abastece la instalación acuícola.

Vitaminas

Las vitaminas son un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos esenciales para el crecimiento y mantenimiento de la vida animal. La mayoría de las vitaminas no son sintetizadas por el cuerpo de los animales, o bien si lo son, es a una tasa muy inferior, que permita cubrir los requerimientos

de los animales. Las vitaminas difieren de los otros nutrientes principales (proteínas, lípidos y carbohidratos) en que éstas no están químicamente relacionadas unas con otras, existen en cantidades muy pequeñas dentro de las materias alimenticias de origen animal y vegetal, y son requeridas por los animales en cantidades traza. Aunque su defecto como su exceso pueden producir importantes alteraciones y patologías asociadas al desarrollo del animal. Las vitaminas se agrupan en dos categorías dependiendo de su solubilidad: vitaminas liposolubles que se almacenan en el tejido adiposo y en el hígado, y vitaminas hidrosolubles, que el cuerpo las tiene que usar inmediatamente, ya que cualquier vitamina hidrosoluble sobrante es eliminada del cuerpo a través de la orina.

Vitaminas hidrosolubles

Vitamina C: el ácido ascórbico destaca por su papel como antioxidante y agente reductor, además de ser un nutriente necesario para la formación de elementos esqueléticos como la matriz ósea, el colágeno y el tejido conectivo. Dietas deficientes en vitamina C resultan en animales con escoliosis y subdesarrollo del esqueleto faríngeo, deformaciones derivadas de una pobre calcificación y desarrollo del hueso (Lall y Lewis-McCrea, 2007). Si bien los requerimientos nutricionales para la vitamina C son bien conocidos en juveniles y adultos (>25 mg/kg; NRC, 2005), debido a la facilidad que supone el poder trabajar con dietas inertes, existe muy poca información sobre los efectos y requerimientos de este nutriente en larvas, siendo la única información disponible la procedente de animales destetados. Así, en larvas de lubina y rodaballo de 30 días de edad los niveles de vitamina C no han de ser inferiores a 20 mg/kg de alimento, mientras que en el caso de la carpa estos valores pueden llegar a ser de hasta 45 mg/kg (Cahu *et al.*, 2003).

Existen otras vitaminas hidrosolubles, pertenecientes la mayoría al complejo de la vitamina B, como la tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), piridoxina (vitamina B6), ácido pantoténico (vitamina B5), biotina (vitamina B8), etc, pero cuyo papel importante no se halla relacionado con el desarrollo del tejido esquelético del organismo, y que por lo tanto, no han sido consideradas en la presente revisión.

Vitaminas liposolubles

Vitamina K: esta vitamina es conocida por su papel en los procesos de coagulación sanguínea, aunque también participa en la regulación de las proteínas transportadoras del calcio, en la síntesis de proteínas del hueso (osteocalcina), e inhibe la reabsorción del hueso y la formación de osteoblastos. Su efecto ha sido poco investigado en peces, sin embargo, Udagawa (2006) mostró como larvas de *Fundulus heteroclitus* alimentadas con dietas pobres en vitamina K (≤ 25 mg/kg), mostraron una elevada incidencia de escoliosis y deformaciones vertebrales, además de presentar un esqueleto frágil. Dichas deformaciones fueron consecuencia de una reducción en la actividad de los osteoblastos, una disminución de la osteocalcina en el hueso (proteína que regula la incorporación de fosfatos de calcio en el hueso, afectando su proceso de mineralización), resultando en un desarrollo incompleto de los elementos esqueléticos. En el caso del eglefino *Melanogrammus aeglefinus*, dietas pobres en vitamina K resultaron en un proceso de mineralización incompleta (bajo contenido en tejido mineralizado, altos niveles de tejido osteoide y pérdida de matriz ósea), resultando en estructuras óseas deformadas y desmineralizadas (Roy *et al.*, 2002). Aunque el resultado final de peces alimentados en dietas pobres en vitamina K son similares a aquellos alimentados con dietas deficitarias en fósforo, los procesos por los cuales se dan estas deformaciones son distintos para cada uno de los citados nutrientes. Así, una deficiencia en vitamina K reduce el proceso mineralización del hueso, mientras que la falta de fósforo incrementa el proceso de reabsorción del tejido óseo, y subsecuentemente disminuye la mineralización de éste al reducir la formación del hueso (Roy *et al.*, 2002). Los requerimientos para esta vitamina no han sido establecidos con exactitud en peces (NRC, 2005), si bien estudios recientes los han estimado en 10 y 0.2 mg/kg en salmónidos y eglefino, respectivamente.

Vitamina A: esta vitamina liposoluble tiene numerosas funciones en el organismo, si bien durante los primeros estadios de desarrollo del animal ejerce un papel preponderante en los procesos de proliferación y diferenciación celular, establecimiento de la simetría bilateral del animal, crecimiento y desarrollo normal del esqueleto (Ross *et al.*, 2000). Los requerimientos nutricionales para la vitamina A en peces (salmónidos, pez gato y dorada) están comprendidos entre las 1,000 y 3,500 UI/kg (NRC, 2005), aunque estos valores han sido establecidos para ejemplares juveniles y/o adultos. En el caso de larvas, se conocen más los efectos derivados de

una hipervitaminosis que sus requerimientos nutricionales, si bien la información que se dispone indica que dichos requerimientos son mucho mayores que en juveniles o adultos. Así por ejemplo, alevines de salmón alimentados con dietas que contenían hasta 20,000 UI/kg mostraron un patrón de crecimiento y desarrollo esquelético normal (Ornsrud, *et al.*, 2002). En el caso de la lubina, niveles inferiores a 150,000 UI/kg tampoco afectaron al crecimiento de la larva, ni a la incidencia de malformaciones esqueléticas (Villeneuve *et al.*, 2005a). Mientras que en el caso de la platija japonesa no se observaron problemas esqueléticos cuando estas fueron alimentadas con 45,000-50,000 UI/kg de nauplios de artemia (Dedi *et al.*, 1995; Takeuchi *et al.*, 1998). Estudios recientes con dorada, mediante el uso de presa viva (rotíferos) enriquecida con niveles incrementales de vitamina A (37,500-grupo control, 55,000, 77,000 y 375,500 UI/kg en peso seco), han puesto de manifiesto que incrementos de sólo 1.5 veces el contenido en vitamina A en la presa viva han producido diferentes niveles y tipologías de malformaciones esqueléticas, indicando que las larvas de dorada son muy sensibles a los niveles de VA en dieta. La vitamina A de la dieta aceleró la osificación intramembranosa de los cuerpos vertebrales lo que conlleva la aparición de vértebras supranumerarias, provocando una gran incidencia de deformación en las vértebras (por compresión y/o fusión), mandíbulas, opérculos y apéndice caudal en larvas de dorada (Fernández *et al.*, 2008).

Como ya se ha comentado con anterioridad, la vitamina A regula el proceso de formación del esqueleto y del cartílago al controlar la formación, proliferación y funcionalidad de los condrocitos. Un exceso de esta vitamina reduce la síntesis del colágeno, la formación de osteoblastos y por consiguiente del crecimiento y desarrollo del hueso. Paralelamente, la hipervitaminosis provoca una temprana maduración de los condrocitos, y estimula la proliferación de los osteoclastos (células que intervienen en los procesos de reabsorción ósea, retardando la formación de la matriz ósea) produciendo una temprana mineralización del hueso, proceso que normalmente resulta en un desarrollo anormal del tejido esquelético y la aparición de importantes malformaciones esqueléticas (Lall & Lewis-McCrea, 2007). En todos los casos citados, una hipervitaminosis resultó en una disminución de la tasa de crecimiento del animal y una mayor incidencia de deformaciones esqueléticas, tanto en la región cefálica, caudal como vertebral. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los niveles de esta vitamina que son tóxicos

y afectan al desarrollo normal del animal, varían según la especie considerada y el estadio larvario estudiado.

Al igual que ha sido descrito en vertebrados terrestres (Schelling *et al.*, 1995), niveles altos de vitamina A en la dieta también pueden afectar la absorción y uso de otras vitaminas liposolubles, como la vitamina E, ya que ambas vitaminas presentan procesos de competición en la absorción por la mucosa intestinal. Así, un hipervitaminosis A reduciría el efecto de la vitamina E, afectando como resultado el crecimiento, supervivencia y resistencia al estrés de las larvas.

Vitamina D: esta vitamina liposoluble desarrolla un papel clave en el metabolismo del calcio y fósforo, y formación y desarrollo del tejido esquelético, estando también implicada en procesos de crecimiento, diferenciación celular y mecanismos inmunitarios. En vertebrados terrestres su deficiencia puede desembocar en la descalcificación del hueso (disminuye la absorción del calcio y fósforo en el intestino, y estimula a los osteoclastos a eliminar osteocalcina, debilitando así la estructura del hueso). Sin embargo, en peces nunca se han llegado a detectar los citados efectos. Esta particularidad vendría explicada por la capacidad que tienen los peces de absorber el calcio del agua a través de las branquias (Guillaume *et al.*, 2002), aunque en peces de agua dulce como la trucha y el pez gato cultivados en aguas bajas en calcio se han observado problemas de escoliosis (NRC, 2005), siendo recomendados valores de 2,400 UI/kg para la primera de las especies (Guillaume *et al.*, 2002).

Vitamina E: al igual que el ácido ascórbico, la vitamina E es un potente agente antioxidante protegiendo los lípidos del organismo del ataque de radicales libres. Si bien existe mucha información sobre su efecto en el esqueleto en animales terrestres, este tipo de datos son más bien escasos en peces. La vitamina E es importante para el buen desarrollo del tejido esquelético al combatir el efecto de radicales libres endógenos y exógenos que pueden dañar los osteoblastos y estimular la reabsorción del hueso derivando en sintomatologías parecidas a las ocasionadas por la vitamina C. Los niveles de vitamina E en la dieta que aseguran un buen crecimiento y desarrollo son de 50 mg/kg (Guillaume *et al.*, 2002). En larvas de dorada los niveles óptimos han sido calculados en torno a los 136 mg/kg (González *et al.*, 1995), mientras que larvas de *Latris*

lineatea alimentadas con distintos niveles de vitamina E mostraron un mejor crecimiento y supervivencia cuando los rotíferos contenían entre 437-1,040 mg/kg (Brown *et al.*, 2005).

Proteínas

Es ampliamente conocida la importancia de las proteínas en la nutrición de peces, siendo consideradas como el constituyente más importante de cualquier célula viviente, representando el grupo químico más abundante en el cuerpo de los animales. Sin embargo, no solo son importantes sus requerimientos totales en proteína, sino también su calidad, la presencia de aminoácidos esenciales en ésta y la forma molecular (péptidos) en que se incluye en la dieta.

Aunque es ampliamente conocida la importancia de la fracción proteica en la alimentación larvaria, los requerimientos nutricionales en proteína en larvas de peces no han sido estudiados adecuadamente (Cahu *et al.*, 2003). A nivel general, se considera que su requerimiento tenía que ser mayor que en juveniles, dada su mayor tasa de crecimiento, pero no fue hasta mediados de los años noventa en que distintos trabajos mostraron que un nivel óptimo de proteína había de oscilar entre el 50 y el 60%, frente a dietas con un 30 y 40% (Péres *et al.*, 1996). Estas proteínas fueron incluidas en la dieta en forma de harina de pescado, al ser considerada como la fuente de la proteína que proporciona el mejor perfil de aminoácidos según los requerimientos nutricionales de las larvas. Sin embargo, resultados obtenidos por estos mismos autores relacionados con la fisiología digestiva de la larva, mostraron una muy pobre regulación de la tripsina (enzima pancreática encargada de la hidrólisis de la proteína), hecho que acompañado de la elevada actividad de peptidasas citosólicas del intestino (leucino-aminopeptidasa), hizo sugerir a Péres *et al.* (1996) que las larvas serían capaces de utilizar (digerir y absorber) más eficientemente péptidos que la proteína intacta, y por tanto redundar en un mejor crecimiento y supervivencia larvaria. En este sentido, es importante saber el tamaño (peso molecular) de los compuestos proteicos que más eficientemente pueden ser utilizados por la larva, y es aquí donde la información derivada de la presa viva es de especial importancia. Así, se recomienda que el ingrediente que aporte la proteína en las dietas artificiales tenga un perfil de pesos moleculares semejantes al de las presas vivas para que este pueda ser bien asimilado por las larvas.

Experimentalmente se ha demostrado en trucha, carpa y lubina que la sustitución parcial de la proteína por hidrolizado proteico en la dieta durante la fase larvaria mejora la supervivencia y crecimiento (Cahu *et al.*, 2003; Dabrowski *et al.*, 2003). Los trabajos de Zambonino-Infante *et al.*, (1997) y Cahu *et al.*, (1999) mostraron que no tan solo el nivel de inclusión del hidrolizado proteico afecta al crecimiento y supervivencia de las larvas de lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), sino que también mejora su desarrollo esquelético y calidad. Así, en el primero de los dos trabajos citados, Zambonino-Infante *et al.*, (1997) evaluaron la sustitución de harina de pescado por hidrolizado de proteína (CPSP - *Concentré Protéique Soluble de Poisson*, Soppêche, Boulogne sur Mer, France) en un 0, 10 y 20% (hidrolizado en forma mayoritaria de di- y tripéptidos), obteniendo como resultados un descenso en la incidencia de malformaciones esqueléticas con el incremento del nivel de hidrolizado proteico en la dieta. Es decir, con un nivel de sustitución de 58% de harina de pescado por hidrolizado de pescado, sólo el 2% de larvas presentaban malformaciones; en comparación con un 13% de las larvas con la dieta sin hidrolizado. Estos resultados se vieron confirmados posteriormente por un trabajo del mismo grupo de investigadores (Cahu *et al.*, 1999), incorporaron un 0, 19, 38 y 58% de hidrolizado proteico pero esta vez en forma de cadenas peptídicas de 20 aminoácidos del total de la proteína. En ambos casos, se observó una disminución de las deformaciones esqueléticas que fue directamente proporcional al grado de sustitución de la harina de pescado por hidrolizado proteico. En resumen, y teniendo en cuenta los resultados de ambos trabajos, y en correspondencia a la estrecha relación que existe entre las etapas iniciales de la nutrición larvaria y el desarrollo del organismo, la sustitución moderada del 20% de la harina de pescado por hidrolizado de proteína resulta muy ventajosa para la larva dado que una sustitución parcial de la proteína de pescado por el hidrolizado constituido por cadenas de péptidos de 10 a 20 aminoácidos (Cahu *et al.*, 1999) o por hidrolizados de pescado constituidos por di- y tripéptidos (Zambonino Infante *et al.*, 1997), resultan en un incremento en el crecimiento, supervivencia y calidad larvaria (reducida incidencia de deformaciones esqueléticas). El grado de sustitución de la proteína por hidrolizado no debe exceder de ciertos niveles específicos para que no se afecte negativamente el desarrollo del organismo, pues un exceso de hidrolizado proteico no resulta nada ventajoso ya que existe una saturación de los transportadores intestinales, tal y como han demostrado trabajos posteriores de Kolkovski and Tandler (2000); Hevrøy *et al.*, (2005) y Aksnes, *et al.*, (2006).

El papel beneficioso de los hidrolizados de proteína en la alimentación de larvas y juveniles vendrían explicados en primer lugar por el papel attractante que desempeñaría la presencia de péptidos en la dieta (aumento de la ingesta y del crecimiento; Dabrowski *et al.*, 2003), y en segundo lugar, por la elevada capacidad de los peces de digerir péptidos durante las etapas larvarias, dada la gran especificidad de la leucino-alanin peptidasa, enzima intestinal citosólico, en la hidrólisis de péptidos (Zambonino *et al.*, 1997). Una mayor absorción y digestión de péptidos en el animal redundaría en un mejor desarrollo del animal y menor incidencia de problemas asociados a éste, como es el caso de las deformaciones esqueléticas (Cahu *et al.*, 2003).

Además de la forma en que se presenta la proteína en la dieta, también lo son los niveles de determinados aminoácidos esenciales de ésta. Son numerosos los estudios donde se menciona que los aminoácidos libres mejoran el desarrollo de las larvas de peces cuando se incluyen en la dieta a bajo nivel, pero el resultado es negativo si se incluyen niveles elevados (Carvalho, *et al.*, 1997; Cahu *et al.*, 1999; Carvalho *et al.*, 2003). Así, en salmónidos y pez gato, la carencia de triptófano en la dieta provocó escoliosis y depósitos anormales de calcio y otros minerales (sodio y potasio) en hueso y en otros tejidos (riñón e hígado), si bien cuando parte de estos animales se realimentaron con una dieta balanceada en este amino ácido esencial (0.5-1.4% de la proteína), la incidencia de animales escolióticos disminuyó. Aunque el efecto del triptófano sobre el desarrollo normal del tejido esquelético se conoce parcialmente, los resultados anteriores parecen indicar que dichas deformaciones serían provocadas por un descenso de los niveles de serotonina (neurotransmisor sintetizado a partir del triptófano), que afectarían la contracción normal del tejido muscular, comprimiendo y deformando la columna vertebral (NRC, 2005).

Lípidos

El aporte de los lípidos en la dieta es fundamental para satisfacer los requerimientos en ácidos grasos esenciales, el mantenimiento de la integridad y fluidez de membrana celular, el transporte de vitaminas liposolubles y el suministro de energía (Guillaume *et al.*, 2002). El tejido óseo de los peces puede llegar a contener del 24 al 90% en peso de lípidos; además, los ácidos grasos polinsaturados (PUFAs) son elementos celulares importantes en todos los tejidos.

Los niveles de fosfolípidos en la dieta son básicos para asegurar un buen crecimiento y un desarrollo armónico de la larva, dado que las larvas tienen una capacidad limitada para sintetizarlos, por lo que éstos han de ser aportados por la dieta (Tocher *et al.*, 2008). Los fosfolípidos actúan en procesos de crecimiento y división celular, actuando también como promotores del crecimiento (fosfatidilcolina, PC) o reguladores de segundos mensajeros (fosfatidilinositol, PI) y síntesis de prostaglandinas. Desde la década de los ochenta se conoce el efecto beneficioso de la inclusión de fosfolípidos en la dieta sobre el desarrollo del tejido esquelético. En particular, Kanazawa *et al.* (1981) redujo de forma sustancial la incidencia de malformaciones en mandíbula y cráneo de larvas de *Plecoglossus altivelis* alimentadas con dietas semipurificadas que contenían lecitina de huevo de gallina. En el caso de la carpa (*Cyprinus carpio*) sólo el 2% de las larvas alimentadas con dietas que contenían un 1.3% de PC mostraron deformaciones esqueléticas, mientras que en aquellas alimentadas con niveles similares de PC, la incidencia de malformaciones aumentó hasta el 32% del total de los animales (Geurden *et al.*, 1995). El efecto de la PI sobre el desarrollo larvario no está bien descrito y caracterizado, si bien se considera que juega un papel como precursor de segundos mensajeros reguladores de la entrada y absorción de calcio en las células. Se ha demostrado en larvas de lubina alimentadas con dietas inertes, que niveles del 12% en fosfolípidos (lípidos totales en dieta del 24%, 1.6% PI), los resultados a nivel de crecimiento, supervivencia e incidencia de malformaciones fueron mejores que en larvas alimentadas con un 3, 6 y 9% en fosfolípidos (Cahu *et al.*, 2003). Determinados PUFAs, como el ácido araquidónico, eicosapentanoico (EPA) y linolénico, son precursores de la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos, dos tipos de eicosanoides que entre sus funciones fisiológicas se encuentran la de regular el metabolismo de las células óseas. Las prostaglandinas estimulan la reabsorción del hueso a través de los osteoclastos, aunque también están implicadas en la síntesis de nuevo tejido (osteoblastos) y matriz ósea, al regular la síntesis de factores del crecimiento (IGFs). En este sentido, se ha demostrado que larvas de lubina alimentadas con dietas que contenían 1.1 y 2.3% de EPA y DHA (docosahexanoico) en la fracción lipídica (13% fosfolípidos) mostraron un buen crecimiento, desarrollo y una baja incidencia de deformaciones esqueléticas, en comparación con otras alimentadas con 4.8% de los citados ácidos grasos, donde la incidencia de animales deformes (escoliosis, compresión y deformación vertebral, y deformaciones del esqueleto faríngeo) fue del 43% de los animales. El

efecto de dichos nutrientes sobre la esquelotogénesis vendría dado por una alteración de diversas familias de genes morfogenéticos que regulan el desarrollo y formación del hueso (Villeneuve *et al.*, 2005b).

Recientemente se ha puesto de manifiesto que los lípidos pueden tener un efecto tóxico en un período muy corto de tiempo, al existir ventanas en el desarrollo, en las que las larvas son muy sensibles a desequilibrios nutricionales relacionados con la fracción lipídica de la dieta (Villeneuve *et al.*, 2006). En este sentido, los autores anteriores evaluaron el efecto de un exceso de DHA y EPA incluidos en los fosfolípidos de la dieta durante tres momentos específicos de su desarrollo (8-13, 13-18 y 18-23 días post eclosión), y encontraron una elevada incidencia de anomalías esqueléticas y vértebras supranumerarias cuando se suministraba un exceso de estos ácidos grasos desde el inicio de la alimentación exógena hasta los 13 días. Anteriormente la plasticidad en el número de vértebras se había asociado a la temperatura (Lewis *et al.*, 2004) y/o procesos de triploidía (Kacem *et al.*, 2004), y ha sido a partir del estudio de Villeneuve *et al.*, (2006) que se ha demostrado un claro efecto de la dieta en la diferenciación de la columna vertebral y la formación de cuerpos vertebrales.

Finalmente no hay que olvidar que los PUFAs son moléculas altamente susceptibles al estrés oxidativo degradándose por peroxidación lipídica. La peroxidación conlleva la formación de radicales libres altamente tóxicos para la célula que pueden ser responsables de alteraciones en el patrón normal de desarrollo y crecimiento del organismo (inhibición del formación y desarrollo de osteoblastos, y reabsorción del tejido óseo por aumento en la producción de osteoclastos), resultando en importantes malformaciones esqueléticas (Fontagné *et al.*, 2006; Lall & Lewis-McCrea, 2007). Además, durante el proceso de autooxidación, se forman productos a raíz de la degradación química, incluyendo radicales libres, peróxidos, hidroxiperóxidos, aldehídos y cetonas; que reaccionan con otros ingredientes de la dieta (vitaminas, proteínas y otros lípidos) disminuyendo su valor biológico y disponibilidad durante la digestión, hecho que también puede afectar al proceso de desarrollo del sistema esquelético.

Efecto de ciertos elementos nutricionales sobre la pigmentación de peces planos

Los problemas más importantes de pigmentación en peces cultivados se han observado fundamentalmente en peces planos, aunque no se descarta que puedan darse también en peces cilíndricos.

Los peces planos se caracterizan por tener una simetría bilateral durante la etapa larvaria, sufriendo posteriormente un proceso de metamorfosis a partir del cual su morfología pasa a ser plana, modificándose también su nicho trófico de planctónico a bentónico. Durante la metamorfosis las larvas de peces planos migran uno de los ojos (derecho o izquierdo, dependiendo del grupo taxonómico) de un lado del cuerpo a otro, remodelando a la vez la estructura del cráneo mediante una relocalización o torsión de la parte anterior del hueso frontal (Okada *et al.*, 2001) con la formación de una barra pseudomesial y adquiriendo una morfología plana. Paralelamente ocurren cambios en la estructura de la retina con la adición de bastones (Estévez, 1996), el estómago pasa a ser plenamente funcional con secreción de pepsina (Sarasquete *et al.*, 1996), la sangre contiene hemoglobina (Inui *et al.*, 1995), el tamaño de la pituitaria aumenta (Estévez & Kanazawa, 1996) y la vejiga natatoria desaparece (Villalta, 2007).

Todas las células pigmentarias o cromatóforos derivan de las células de la cresta neural migrando a través de las zonas dorosolateral y ventrolateral entre los miotomos y el tubo neural hasta los lugares donde se desarrolla la pigmentación (epitelio pigmentado de la retina, dermis y epidermis y zonas de recubrimiento del sistema digestivo). En el caso de los peces planos la pigmentación ocurre en dos fases:

1.- Durante el periodo en que la larva posee simetría bilateral, ambos lados del cuerpo están pigmentados ya que los precursores de los cromatóforos migran desde la cresta neural hacia abajo y ambos lados del cuerpo generando un patrón simétrico, siendo los melanóforos abundantes y de gran tamaño (tipo larvario, Matsumoto & Seikai, 1992).

2.- En el momento de la metamorfosis, en el lado dorsal/ocular aparecen pequeños grupos de cromatóforos adultos (pequeños y fuertemente pigmentados) entre los cromatóforos de tipo larvario, distribuyéndose luego en otras zonas de forma muy densa, al final los cromatóforos de tipo larvario (grandes y dendríticos) desaparecen. Este fenómeno de formación de cromatóforos

adultos se da bien por migración de células ya diferenciadas, bien por diferenciación de células precursoras, al igual que ocurre con las líneas negras características del pez cebrá. Así, el lado ocular continúa pigmentado, con una gran proliferación de melanóforos que pasan a ser más pequeños y numerosos (tipo adulto) a la vez que a partir de células precursoras se diferencian otro tipo de cromatóforos (xantóforos, eritróforos, iridióforos y leucoforos), mientras que el lado ventral/ciego, que se apoya en el fondo, toma una coloración blanca por la presencia de iridióforos y la desaparición del resto de tipos de células pigmentarias mediante citolisis, dando al pez la morfología y tipología de un adulto.

En el caso de que los peces posean escamas (no todos los peces planos las tienen), las del lado dorsal/ocular son de tipo cicloide mientras que las del lado ventral/ciego son de tipo ctenoide (Matsumoto & Seikai, 1992).

Por lo general los peces planos salvajes presentan una pigmentación normal, con la cara ocular pigmentada y la cara ciega sin pigmento. Sin embargo en el caso de peces cultivados el porcentaje de individuos con pigmentación anormal (erróneamente denominados albinos) puede llegar a ser de más del 40% (como en el caso del rodaballo *Psetta maxima* procedente de cultivo en los años 90). Un individuo se considera albino cuando, a pesar de contar con cromatóforos, tiene una mutación en el gen que codifica la tirosinasa y es incapaz de sintetizar melanina. En el caso de los peces planos malpigmentados (pseud-albinos) esta mutación no se da y lo que realmente ocurre es un fallo a nivel nutricional que afecta posiblemente a otros genes y proteínas y probablemente inhibe el desarrollo de las células pigmentarias en un estadio determinado del desarrollo. Por otro lado, existen también peces en los que la anomalía pigmentaria es por pigmentación de la cara ciega (ambicoloración). Esta anomalía suele darse en aquellos peces en los que la migración del ojo no es completa y las causas parecen ser distintas, no nutricionales y derivadas principalmente de fallos en la secreción de hormonas tiroideas y por lo tanto en la metamorfosis de los peces

Seikai (1985) fue uno de los primeros en sugerir factores nutricionales presentes/ausentes en la *Artemia* usada como alimento de los peces planos cultivados como el factor desencadenante de los fallos de pigmentación. Así el porcentaje de individuos correctamente pigmentados dependía

del tipo de cepa utilizada, mientras que si se utilizaba zooplancton natural (copépodos) la pigmentación era 100% normal. Estudios posteriores sugirieron los niveles de los ácidos grasos n-3, la proporción de fosfolípidos en la dieta o la cantidad de vitamina A en las presas vivas como otros posibles causantes de los problemas pigmentarios (Kanazawa, 1993; Devresse *et al.*, 1994, Dickey-Collas, 1992; Reitan *et al.*, 1994) siendo su principal acción bien la ruptura de los mecanismos responsables de la asimetría de la piel o de la diferenciación de los melanóforos adultos, bien la inhibición de la síntesis de rodopsina en la retina y un inadecuado desarrollo de la visión en los peces afectados. Estudios más recientes han ido dirigiendo la investigación a 3 tipos de nutrientes: la vitamina A (o el ácido retinoico, forma activa de la vitamina), el ácido araquidónico (20:4n-6, ARA) y los ácidos grasos n-3 especialmente el docosahexanoico (22:6n.3, DHA) y eicosapentanoico (20:5n-3, EPA). En la tabla 1 presentada a continuación se resumen los estudios realizados hasta la fecha en los que se aborda el efecto de algunos nutrientes sobre la pigmentación de distintos peces planos.

Año	Especie	Autor	Razón atribuida
1981	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Seikai & Sinoda	Uso de <i>Artemia</i> en estados tempranos
1985	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Seikai	<i>Artemia</i> de Brasil
1985	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Seikai	Zooplankton natural 100% pigmentación
1986	<i>Psetta maxima</i>	Menu	Uso de <i>Artemia</i>
1987	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Seikai <i>et al.</i>	Composición de <i>Artemia</i>
1990	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Harvik & Pittman	Luz durante el cultivo
1991	<i>Limanda yokohamae</i>	Kanazawa	Vitamina A, fosfolipidos, n-3 PUFA
1994	<i>Psetta maxima</i>	Devresse	DHA en la <i>Artemia</i>
1992	<i>Psetta maxima</i>	Stottrup & Attramadal	n-3 PUFA
1992	<i>Pleuronectes platessa</i>	Dickey-Collas	DHA/EPA
1993	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Naess	Uso de <i>Artemia</i>
1994	<i>Psetta maxima</i>	Reitan <i>et al.</i>	DHA/EPA
1995	<i>Psetta maxima</i>	Estévez & Kanazawa	Deficiencia vitamina A
1997	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Estévez <i>et al.</i>	ARA
1998	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	McEvoy <i>et al.</i>	ARA
1999	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Shields <i>et al.</i>	Uso de <i>Artemia</i>
1999	<i>Paralichthys dentatus</i>	Huber <i>et al.</i>	Fotoperiodo
1999	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Miwa & Yamano	Ácido Retinoico
1999	<i>Psetta maxima</i>	Estévez <i>et al.</i>	ARA
2001	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Estévez <i>et al.</i>	ARA
2002	<i>Limanda ferruginea</i>	Copeman <i>et al.</i>	ARA
2003	<i>Paralichthys dentatus</i>	Willey <i>et al.</i>	ARA
2003	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Haga <i>et al.</i>	Acido Retinoico
2004	<i>Solea senegalensis</i>	Villalta <i>et al.</i>	ARA
2004	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Hamre <i>et al.</i>	Vitamina A, hormonas tiroideas, ARA
2008	<i>Solea senegalensis</i>	Villalta <i>et al.</i>	ARA, ARA/EPA y eicosanoides

Vitamina A

Tal como se ha indicado anteriormente en vertebrados el ácido retinoico, la forma activa de la vitamina A, es esencial para el desarrollo embrionario y para el establecimiento de los ejes tanto del cuerpo como de los órganos internos. La concentración de ácido retinoico presente en los tejidos actúa sobre las células modificando la expresión de genes implicados en la diferenciación

y proliferación celular, de ahí su importancia durante el desarrollo embrionario y larvario de peces marinos.

Cuando se estudia la composición de las presas vivas comúnmente utilizadas durante el cultivo larvario se observa que tanto los copépodos como los nauplios de *Artemia* no enriquecidos carecen de vitamina A (Moren *et al.*, 2005), aunque sí son muy abundantes en cantaxantina y astaxantina que la larva puede convertir en vitamina A (Moren, 2004). De cualquier forma esta siempre muy presente en las emulsiones de enriquecimiento de tipo comercial que se usan con rotíferos y *Artemia* ya que se encuentra en gran cantidad en todas las fuentes de aceite de pescado (generalmente procedente del hígado de peces marinos que acumula esta vitamina liposoluble).

Suministrada tanto en defecto como en exceso produce deformaciones esqueléticas durante la embriogénesis (Ross *et al.*, 2000), lo que se observa claramente cuando se ha utilizado en la alimentación larvaria con el objeto de estudiar su efecto en la pigmentación. Suministrada en exceso produce peces con una pigmentación normal pero con deformaciones esqueléticas tanto en la zona craneal como espinal (Dedi *et al.*, 1997; Haga *et al.*, 2002) especialmente si la vitamina A esta en forma de ácido retinoico. Sin embargo un suplemento de esta vitamina en la dieta es esencial para el desarrollo normal, así se recomienda una dosis de 2.5 µg/g de dieta en la alimentación de juveniles de halibut (Moren *et al.*, 2004). En la tabla presentada a continuación se resumen los trabajos realizados utilizando vitamina A (tanto en UI/g de dieta en forma de vitamina A, como en µg/g de dieta en forma de ácido retinoico, all-trans retinoico o retinol) como nutriente “inductor” de pigmentación. En todos los casos estudiados, la adición de vitamina A en la dieta (en la mayoría de los casos añadida a la emulsión de enriquecimiento de presas vivas o disuelta directamente en el agua) induce altos niveles de pigmentación, proporcionales a las cantidades añadidas, aunque provocando a la vez un aumento de la incidencia de deformaciones esqueléticas. De igual manera el estudio de Haga *et al.* (2002) muestra como el efecto de esta vitamina añadida en forma de ácido retinoico es mayor si la adición se realiza en los primeros estadios de desarrollo larvario.

La única sugerencia plausible sobre el hecho de que la vitamina A influya sobre la pigmentación ha sido indicada por Hamre *et al* (2007) que atribuyen la acción del ácido retinoico a la influencia

que tiene sobre la bilateralización del desarrollo de las células pigmentarias durante la metamorfosis, de manera que no habría distinción entre las dos caras ocular/dorsal y ciega/ventral.

Especie	Vit A (IU/g)	% Pigmentación	% Deformación	Referencia
<i>P. olivaceus</i>	1.3	19.6	20.5	Takeuchi et al. (1995)
	2.6	27.4	24.2	
	5.6	19.4	35.3	
	201.4	10.8	28.7	
	1023.6	51.4	99	
<i>P. olivaceus</i>	12.4*	97	8	Haga et al. (1999)
	132	98	48	
	489	100	74	
	1140	100	100	
<i>P. olivaceus</i>	1589**	24.3 (A-B)	90	Haga et al. (2002)
		94.3 (C-D)	0	
		97.1 (E-F)	0	
		89.3 (G-I)	0	
<i>P.. maxima</i>	1.09	83.3		Estévez & Kanazawa (1995)
	0.82	15.6		
	0.15	9.4		
<i>H. hippoglossus</i>	1.37***	93	82	Hamre et al. (2002)
	0.24	32	33	

* Acido retinoico (µg/g), ** All-trans retinoico (µg/g), *** Retinol (µg/g)

Lípidos (n-3 PUFA)

En los primeros estudios realizados para establecer qué nutrientes estaban implicados en la ausencia de pigmentación en los rodaballos (*Psetta maxima*) cultivados en los años 90 se hizo especial hincapié en la relación DHA/EPA, especialmente durante los estadios premetamórficos. Así Reitan *et al* (1994) recomendaban un ratio de 3.8 para conseguir pigmentaciones por encima del 80%. Sin embargo estudios posteriores usando ratios DHA/EPA muy inferiores y/o muy superiores a los indicados pero variando la cantidad de ARA en la dieta dieron resultados distintos, no relacionados con el ratio DHA/EPA sino con la cantidad de ARA presente (Estévez

et al., 1999). Similares resultados se obtuvieron por McEvoy *et al* (1998) y Copeman *et al* (2002) para el halibut o la limanda. Sargent *et al* (1999) y Bell *et al* (2003), basándose en la composición de huevos de peces marinos recomiendan una relación de DHA/EPA en la dieta igual a 2, sobre todo por los efectos beneficiosos de la adición de DHA para el desarrollo del sistema neural y visual de los peces y por su implicación en la fluidez de las membranas celulares. La inclusión de DHA en la dieta tiene, pues, un efecto beneficioso *per se* en cualquier proceso fisiológico, incluyendo la pigmentación y/o el desarrollo de melanóforos adultos.

Especie	n-3 PUFA	DHA/EPA	ARA	% Pigmentación	Referencia
<i>P. olivaceus</i>	6.6	0	0.5	0.5	Seikai <i>et al.</i> (1987)
	9.6	0	0.2	17.7	
	2.8	0	0.4	75.9	
<i>H. hippoglossus</i>	58.3	1.6	-	100	Naess <i>et al.</i> (1993)
	39.2	0.6	-	4.3	
	24.9	0.1	-	29.4	
<i>H. hippoglossus</i>	34.5	1.3	2.1	93	Hamre <i>et al.</i> (2002)
	55.9	1.6	0.7	32	
<i>S. maximus</i>	33.5	1.3	2.5	78.9	Estévez <i>et al.</i> (1999)
	30.6	1.3	4.8	32.6	
	25.9	1.3	7.9	0.9	
<i>L. ferruginea</i>	42.1	8.2	1.2	47	Copeman <i>et al.</i> (2002)
	49.0	1.9	2.2	39	
	44.2	7.5	7.1	8	
	19.8	0.7	0.7	46	
<i>S. senegalensis</i>	14.2	3.8	0.2	100	Villalta <i>et al.</i> (2004)
	22.8	4.5	0.1	100	
	24.1	5.9	4.5	39	
	23.3	4.8	8.3	16	

Como se indica más arriba, no parece que el DHA influya directamente en la pigmentación de los peces planos.

Es el ácido araquidónico (ARA) y el ratio ARA/EPA los que han demostrado tener una influencia sobre el grado de albinismo obtenido. Así en los primeros trabajos (Estévez *et al.*, 1999) con el rodaballo se demostró que niveles crecientes de ARA en la dieta, que para otros peces marinos

resultan incluso tóxicos, no producen ningún efecto deletéreo en términos de crecimiento y supervivencia, pero sí en cuanto a pigmentación, de tal manera que cuando el ARA supone el 7.9% del total de ácidos grasos de la dieta (entendida como *Artemia* enriquecida con emulsiones experimentales), el porcentaje de individuos pigmentados es del sólo el 0.85%, mientras que cuando el ARA solo supone el 1.0% el porcentaje de pigmentación se eleva al 86.7%.

En un experimento similar llevado a cabo con el lenguado senegalés (Villalta et al., 2005) cuando el ARA representa solamente el 0.1% del total de ácidos grasos la pigmentación es del 99.7% mientras que un 8.3% de ARA supone reducir ese grado de pigmentación el 15.8%. Así, es la relación EPA/ARA la que influye en la pigmentación y una mínima subida del contenido de EPA en la dieta produce mejores resultados, mientras que variaciones DHA/EPA no tienen efecto.

La posible causa de que sea el ratio EPA/ARA el que influye en la pigmentación puede ser que ambos ácidos grasos están implicados en la síntesis de eicosanoides. En un estudio reciente en el que se utilizó un aceite vegetal derivado de la borraginácea *Echium plantagineum*, rico en los ácidos grasos gammalinoleico (18:3n-6) y estearidónico (18:4n-3), es decir los ácidos grasos derivados de la primera desaturación de los considerados precursores de poliinsaturados, el linoleico (18:2n-6) y linolenico (18:3n-3) y más fácilmente desaturados en los siguientes en línea, es decir el ARA y el EPA (Villalta et al., 2008) se ha demostrado que por un lado el aceite de *Echium* reduce la frecuencia de individuos albinos, incluso con niveles altos de ARA (5.2% del total de ácidos grasos), y por otro esa reducción en el índice de albinismo viene acompañada de una menor producción de prostaglandinas E (PGE) y F (PGF) del orden de 40 y 5 ng/g de peso seco, respectivamente, mientras que en el caso de los individuos despigmentados y alimentados con elevadas dosis de ARA se encuentra en torno al los 100-150 ng/g de peso seco de PGF y 50-60 ng/g de peso seco de PGE, como se muestra en la Figura 2.

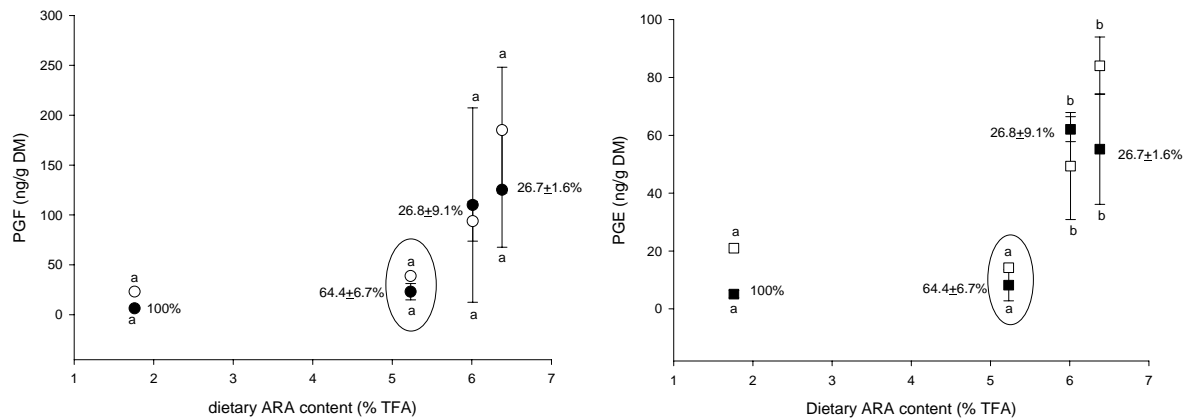


Figura 2. Producción de prostaglandinas en el lenguado senegalés, símbolos blancos indican individuos albinos, los oscuros indican individuos pigmentados. Englobados en un círculo se muestran los resultados obtenidos utilizando aceite de *Echium plantagineum*. En número junto a los resultados se indican los porcentajes de pigmentación obtenidos.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer la invitación a participar en el IX Simposio Internacional de Nutrición Acuicola al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (Proyecto SEP-CONACYT 000000000058931). Parte de los resultados presentados en este trabajo han sido obtenidos gracias a la financiación de los siguientes proyectos de investigación: AGL2005-0047, HG2004-0018 (Ministerio de Educación y Ciencia, España).

Referencias bibliográficas

- Alfonso, J.M., Montero, D., Robaina, L., Astorga, N., Izquierdo, M.S., R. Gines, 2000. Association of lordosis-scoliosis-kyphosis deformity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) with family structure. *Fish. Physiol. Biochem.* 22: 159-163.
- Andrades, J.A., Becerra, J., Fernandez-Llebrez, P., 1996. Skeletal deformities in larval, juvenile and adult stages of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* 141, 1–11.
- Aksnes, A., Hope, B., Jonsson, E., Bjornsson, B.T., Albrektsen, S. 2006. Size-fractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high plant protein diets. I: Growth, growth regulation and feed utilization. *Aquaculture* 261: 305-317.
- Bell, J.G., McEvoy, L.A., Estévez, A., Shields, R.J., Sargent, J.R. 2003. Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquaculture*, 227: 211-220
- Boglione, C., Gagliardi, F., Scardi, M., Cataudella, S. 2001. Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). *Aquaculture* 192: 1-22.
- Brown, M., Dunstan, G.A., Nichols, P.D., Battaglione, S.C., Morehead, D.T., Overweter, A.L. 2005. Effects of α -tocopherol supplementation of rotifers on the growth of striped trumpeter *Latris lineata* larvae. *Aquaculture* 246: 367-378.
- Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., Quazuguel, P., Le Gall, M.M.. 1999. Protein hydrolysate vs, fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture* 171: 109-119.
- Cahu C., Zambonino-Infante J.L., Takeuchi, T. 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* 227: 245-258.
- Carvalho, A.P., Escaffre, A.M., Oliva-Teles, A., Bergot, P. 1997. First feeding of common carp larvae on diets with high levels of protein hydrolysates. *Aquac. Int.* 5: 361-367.
- Carvalho, A.P., Oliva-Teles, A., Bergot, P. 2003. A preliminary study on the molecular weight profile of soluble protein nitrogen in live food organisms for fish larvae. *Aquaculture* 225: 445-449.
- Copeman, L.A., Parrish, C.C., Brown, J.A., Harel, M. 2002. Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture*, 210: 285-304.
- Dabrowski, K., Lee, K., Rinchar, J. 2003. The smallest vertebrate, teleost fish, can utilize synthetic dipeptide-based diets. *J. Nutr.* 133: 4225-4229.
- Dedi, J., Takeuchi, T., Seikai, T., Watanabe, T., 1995. Hypervitaminosis and safe levels of vitamin A for larval flounder *Paralichthys olivaceus* fed *Artemia* nauplii. *Aquaculture* 133: 135-146.
- Dedi, J., Takeuchi, T., Seikai, T., Watanabe, T., Hosoya, K. 1997. Hypervitaminosis A during vertebral morphogenesis in larval Japanese flounder. *Fish. Sci.* 63: 466-473

- Devresse, B., Leger, P., Sorgeloos, P., Murata, O., Nasu, T., Ikeda, S., Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I., Kjorsvik, E., Olsen, Y. 1994. Improvement of flatfish pigmentation through the use of DHA-enriched rotifers and *Artemia*. *Aquaculture*, 124: 287-288
- Dickey-Collas, M., Geffen, A.J. 1992. Importance of the fatty acids 20:5 ω 3 and 22:6 ω 3 in the diet of plaice (*Pleuronectes platessa*) larvae. *Mar. Biol.*, 113: 463-468
- Dingerkus, G., Uhler, L.D., 1977. Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *Stain Technology* 52: 229-232.
- Divanach, P., Papandroulakis, N., Anastasiadis, P., Koumoundouros, G., Kentouri, M., 1997. Effect of water currents during postlarval and nursery phase on the development of skeletal deformities in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) with functional swimbladder. *Aquaculture* 156: 145-155.
- Du, S.J., Frenkel, V., Kindschi, G., Zohar, Y. 2001. Visualizing normal and defective bone development in zebrafish embryos using the fluorescent chromophore calcein. *Dev. Biol.* 238: 239-246.
- Elizondo, M.R., Arduini, B.L., Paulsen, J., MacDonald, E.L., Sabel, J.L., Henion, P.D. Cornell, R.A., Parichy, D.M., 2005. Defective skeletogenesis with kidney stone formation in dwarf zebrafish mutant for *trpm7*. *Current Biology* 15: 667-671.
- Estévez, A. 1996. Effects of lipids and vitamin A on pigmentation success of flatfish. PhD Thesis, Univ. Kagoshima, Japan, 149 pp
- Estévez, A., Kanazawa, A. 1995. Effect of n-3 PUFA and vitamin A *Artemia* enrichment on pigmentation success of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquac. Nutr.*, 1: 159-168
- Estévez, A., Kanazawa, A. 1996. Fatty acid composition of neural tissues of normally pigmented and unpigmented juveniles of Japanese flounder using rotifer and *Artemia* enriched in n-3 HUFA. *Fish. Sci.*, 62: 88-93
- Estévez, A., McEvoy, L.A., Bell, J.G., Sargent, J.R. 1999. Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed live-prey enriched in arachidonic and eicosapentaenoic acids. *Aquaculture*. 180: 321-343
- Fernández, I., Hontoria, F., Ortiz-Delgado, J.B., Kotzamanis, Y., Estévez, A., Zambonino-Infante, J.L., Gisbert, E., 2008. Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of Vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture* 283: 102-115.
- Fjelldal, P.G., Hansen, T.J., Berg, A.E., 2007. A radiological study on the development of vertebral deformities in cultured Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 273: 721-728.
- Fontagné, S., Bazin, D., Brèque, J., Vachot, C., Bernarde, C., Rouault, T., Bergot, P. 2006. Effects of dietary oxidized lipid and vitamin A on the early development and antioxidant status of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) larvae. *Aquaculture* 257: 400-411.
- Gavaia, P., C. Sarasquete, Cancela, L., 1999. Detection of mineralized structures in early stages of development of marine teleostei using a modified alcian blue-alizarin red double staining technique. *Biotech. Histochem.* 75: 79-84.

- González, M.M., Izquierdo, M.S., Salhi, M., Hernández-Cruz, C.M., Fernández-Palacios, H., 1995. Dietary vitamin E for *Sparus aurata* larvae. In: Larví'95-Fish & Crustacean Larviculture Symposium (P. Lavens, P. Sorgeloos, E. Jaspers and F. Ollevier eds.). EAS, Special publication No. 15, Gent, Belgium.
- Geurden I., Radunz-Neto J., Bergot P., 1995. Essentiality of dietary phospholipids for carp *Cyprinus carpio* larvae. *Aquaculture* 131: 303-314.
- Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P., Métailler, R., 2002. Nutrición y Alimentación de Peces y Crustáceos. Ediciones Mundi-Prensa, 475 pp.
- Haga, Y., Takeuchi, T., Seikai, T. 2002. Influence of all-trans retinoic acid on pigmentation and skeletal deformation in larval Japanese flounder. *Fish. Sci.*, 68: 560-570
- Hamre, K., Opstad, I., Espe, M., Solbakken, J., Hemre, G-I, Pittman, K. 2002. Nutrient composition and metamorphosis success of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae fed natural zooplankton or Artemia. *Aquac. Nutr.*, 8: 139-148
- Hamre, K., Holen, E., Moren, M. 2007. Pigmentation and eye migration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae: new findings and hypotheses. *Aquac. Nutr.*, 13: 65-80
- Hevroy, E.M., M. Espe, R. Waagbo, K. Sandnes, M. Ruud, G.I. Hemre. 2005. Nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. *Aquac. Nutr.* 11: 301-313.
- Inui, Y., Yamano, K., Miwa, S. 1995. The role of thyroid hormone in tissue development in metamorphosing flounder. *Aquaculture*, 135: 87-98
- Kanazawa, A. 1993. Nutritional mechanisms involved in the occurrence of abnormal pigmentation in hatchery-reared flounder. *J. World Aquacult. Soc.*, 24: 162-166
- Kanazawa A., Teshima S., Inamori S., Iwashita T., Nagao A. 1981. Effect of phospholipids on survival rate and incidence of malformation in the larval ayu. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.* 30, 301-309.
- Klymkowsky, M.W., Hanken, J. 1991. Whole-mount staining of xenopus and other vertebrates. *Methods in Cell Biology* 36: 419-425.
- Kolkovski, S., Tandler, A.. 2000. The use of squid protein hydrolysate as a protein source in microdiets for gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. *Aquac. Nutr.* 6: 11-15.
- Koumoundouros, G., Divanach, P., Kentouri, M. 1999. Osteological development of the vertebral column and of the caudal complex in *Dentex dentex*. *J. Fish. Biol.* 54: 424-436.
- Lall, S.P., Lewis-McCrea, L.M. 2007. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish -An overview. *Aquaculture* 267: 3-19.
- Lewis, L.M., Lall, S.P. 2006. Development of the axial skeleton and skeletal abnormalities of Atlantic halibut from first feeding through metamorphosis. *Aquaculture* 257: 124-135.
- NRC, 2005. Nutrient Requirements of Fish, National Academy Press, Washington, DC, 114 pp.
- Matsumoto, J., Seikai, T. 1992. Asymmetric pigmentation and pigment disorders in pleuronectiformes (Flounders). *Pigment Cell Res., Suppl.*, 2: 275-282

- Matsusato, T., 1986. Study on skeletal anomaly of fishes. *Bull. Nat. Res. Inst. Aquac.* 10: 57-179 (in Japanese with English abstract).
- ORCIS, 2004. Optimisation of rearing conditions in sea bass for eliminated lordosis and improved musculoskeletal growth (UE project, contract number Q5RS-CT-2001-01233). <http://www.aquaculture.ugent.be/larvi/presentations/Stickland.pdf>
- McEvoy, L.A., Estévez, A., Bell, J.G., Shields, R.J., Gara, B., Sargent, J.R. 1998. Influence of dietary levels of eicosapentaenoic and arachidonic acids on the pigmentation success of turbot (*Scophthalmus maximus*) and halibut (*Hippoglossu hippoglossus* L.). *Bull. Aquacul. Soc. Canada* 98-417-20
- Moren, M. 2004. Vitamin A in juvenile and larval Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.)- does *Artemia* cover the larval retinoid requirement?. PhD Thesis, Department of Fisheries and Marine Biology, Univ. of Bergen, Norway, 53 pp.
- Moren, M., Opstad, I., Berntssen, M.H.G., Infante, J.L.Z., Hamre, K. 2004. An optimum levels of vitamin A supplements in Atlantic halibut (*Hippoglossu hippoglossus* L.) juveniles. , 253: 587-599
- Moren, M., Gundersen, T.E., Hamre, K. 2005. Quantitative and qualitative analysis of retinoids in *Artemia* and copepods by HPLC and diode array detection. *Aquaculture*, 246: 359-365
- Naess T, Germain-Henry, M., Naas, K.E. (1993) *Artemia* or wild zooplankton as first feed for halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae - Implications on abnormal pigmentation Symposium on mass rearing of juvenile fish. *ICES C.M.*, pp 14 pp.
- Okada, N., RTakagi, Y., Seikai, T., Tanaka, M., Tagawa, M. 2001. Aymmetrical development of bones and soft tissue during eye migration of metamorphosing Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Cell Tissue Res.*, 304: 59-66
- Ørnstrud, R., Graff, L.E., Hoie, S., Totland, G.K., Hemre, G.I., 2002. Hypervitaminosis A in first-feeding fry of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac. Nutr.* 8: 7-13
- Péres, A., Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., Legall, M.M., Quazuguel, P. 1996. Amylase and trypsin responses to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the developmental stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 15: 237-242.
- Reitan, K.I., Rainuzzo. J.R., Olsen, Y. 1994. Influence of lipid composition of live feed on growth, survival and pigmentation of turbot larvae, *Aquacult. Int.*, 2: 33-48
- Ross, S.A., Caffery, P.J., Dragner, U.C., De Luca, L.M., 2000. Retinoids in embryonal development. *Phys. Rev.* 80: 1021-1054.
- Roy, P. K., Lall, S.P. 2007. Vitamin K deficiency inhibits mineralization and enhances deformity in vertebrae of haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 148: 174-183.
- Sarasquete, C., Gionzalez de Canales, M.L., Arellano, J.M., Muñoz-Cueto, J.A., Ribeiro, L., dinis, M.T. 1996. Histochemical aspects of the yolk-sac and digestive tract of larvae of the Senegal sole, *Solea senegalensis*, *Histol. Histopathol.*, 11: 881-888
- Sargent, J.R., McEvoy, L.A., Estévez, A., Bell, J.G., Bell, M., Henderson, R.J., Tocher, D. 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*, 179: 217-229

- Schelling, G.T., Roeder, R.A., Garber, M.J., Pumfrey, W.M., 1995. Bioavailability and interaction of vitamin A and vitamin E in ruminants. *J. Nutr.* 125: 1799S–1803S.
- Seikai, T., 1985. Reduction of occurrence frequency of albinism in juveniles flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery reared on wild zooplankton. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 51: 1261-1267
- Seikai, T., Watanabe, T., Shimosaki, M. 1987. Influence of three geographically different strains of *Artemia* nauplii on occurrence of albinism in hatchery-reared flounder *Paralichthys olivaceus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53: 195-200
- Takeuchi, T., Dedi, J., Ebisawa, C., Watanabe, T., Seikai, T., Hosoya, K., Nakazoe, J.I. 1995. The effect of beta-carotene and vitamin A enriched *Artemia* nauplii on the malformation and color abnormality of larval Japanese flounder. *Fish. Sci.*, 61: 141-148
- Takeuchi, T., Dedi, J., Haga, Y., Seikai, T., Watanabe, T., 1998. Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 169: 155–165.
- Udagawa, M. 2006. Studies on the distribution and physiological function of vitamin K in fish. *Bull. Fish. Res. Agen.* 18: 1-40.
- Verhaegen, Y., Adriaens, D., De Wolf, T., Dhert, P., Sorgeloos, P., 2007. Deformities in larval gilthead sea bream (*Sparus aurata*): A qualitative and quantitative analysis using geometric morphometrics. *Aquaculture* 268: 156–168.
- Villalta, M. 2007. Requerimientos en ácidos grasos esenciales y organogénesis de la larva del lenguado senegalés *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). PhD Thesis, Univ. Barcelona, Spain, 365 pp
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M.P. 2005. Arachidonic acid enriched live prey induces albinism in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture*, 245: 193-209
- Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M.P., Bell, J.G. 2008. Arachidonic acid, arachidonic/eicosapentaenoic acid ratio, stearidonic acid and eicosanoids are involved in dietary-induced albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquac. Nutr.*, 14: 120-128
- Villeneuve L., Gisbert E., Le Delliou H., Cahu C.L., Zambonino-Infante, J.L. 2005a. Dietary levels of all-trans retinol affect retinoid nuclear receptor expression and skeletal development in European sea bass larvae. *Br. J. Nutr.* 93: 1–12.
- Villeneuve, L., Gisbert, E., Zambonino, J.L., Quazuguel, P., Cahu, C.L. 2005b. Effect of nature of dietary lipids on European sea bass morphogenesis: implication of retinoid receptors. *Br. J. Nutr.* 94: 877–884.
- Villeneuve, L., E. Gisbert, Moriceau, J., Cahu, C.L., J.L. Zambonino, 2006. Intake of high levels of vitamin A and polyunsaturated fatty acids during different developmental periods modifies the expression of morphogenesis genes in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Br. J. Nutr.* 95: 677–687
- Wieser, W. 1995. Energetics of fish larvae, the smallest vertebrates. *Acta Physiol. Scand.* 154: 279-290.
- Witten, P. E., L. Gil-Martens, Hall, B.K., Huysseune, A., Obach, A. 2005. "Compressed vertebrae in Atlantic salmon *Salmo salar*: evidence for metaplastic chondrogenesis as a skeletogenic response late in ontogeny. *Dis. Aquat. Org.* 64: 237-246.

Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., Péres, A. 1997. Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. *J Nutr* 127: 608-614.