

Digestión, Absorción y Utilización de Lípidos en Larvas de Peces Marinos

M. S. Izquierdo, J. Socorro, L. Arantzamendi & C.M. Hernández-Cruz.

Grupo de Investigación en Acuicultura, UPLGC & ICCM, Edificio de Ciencias Básicas, Tafira Baja, 35017 Las Palmas de Gran Canaria, España.

Introducción:

En los últimos años ha incrementado considerablemente el interés en varios aspectos del metabolismo lipídico en las larvas de peces marinos y su relación con el crecimiento. La utilización de los lípidos dietéticos y los requerimientos nutricionales van a verse directamente afectados por diversos cambios morfológicos y fisiológicos que suceden a lo largo del desarrollo larvario.

Entre estos cambios, evidentemente aquellos que afectan al sistema digestivo van a estar directamente relacionados con la utilización de los nutrientes dietéticos y el tipo de alimento que en consecuencia hay que ofrecer a la larva. Así, aunque los enterocitos son funcionales al final del período lecitotrófico en las larvas de diversas especies de peces marinos, estas células del epitelio intestinal se presentan poco desarrolladas. A lo largo del desarrollo se incrementó la talla y el número de orgánulos en el enterocito a la vez que el número de pliegues intestinales va incrementando, así mismo el estómago se va formando y mejorando su función. Todos estos cambios conducen de una u otra forma a una mejora en la eficacia de digestión y absorción en el pez. Otro aspecto interesante es la incorporación por pinocitosis de proteínas intactas observada en el epitelio rectal y que es considerada como un sistema de absorción de nutrientes importante en las larvas de los peces, permitiendo la incorporación de enzimas u hormonas presentes en las presas vivas.

El desarrollo y el crecimiento larvarios están regulados por hormonas. El desarrollo del sistema endocrino parece suceder en tres fases principales: durante la fase embrionario los órganos endocrinos no son funcionales y las hormonas de origen materno se reducen, durante la fase de transición éstos órganos empiezan a formarse pero los niveles hormonales permanecen muy bajos y finalmente durante la fase de transformación la actividad de los órganos endocrinos se acelera y los niveles tisulares de las distintas hormonas presentan grandes variaciones (Tanaka *et al.*, 1995). Hormonas como la tiroxina, el cortisol, la hormona del crecimiento y la prolactina están implicadas en alteraciones del metabolismo de los lípidos. Los niveles de estas hormonas cambian a lo largo del desarrollo, siendo muy bajos o no apreciables durante la eclosión pero incrementando a medida que la larva crece y mostrando entre ellas diferencias en la distribución de picos de máxima actividad.

Como consecuencia de éstos y otros cambios, por ejemplo, en la forma de intercambio de gases ó de natación, en el metabolismo ó en la formación de varios órganos y sistemas, se pueden esperar alteraciones en la eficacia de digestión, absorción, transporte o utilización de lípidos dietéticos a lo largo del desarrollo larvario.

Izquierdo, M. S., J. Socorro, L. Arantzamendi y C. M. Hernández-Cruz. 2000. Digestión, absorción y utilización de lípidos en larvas de peces marinos. pp 251-263 En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D. y Cruz-Suárez, L.E. (Eds.) Avances en Nutrición Acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 15-18, 1998. La Paz, B.C.S., México.

Digestión

Puesto que el sistema digestivo es menos complejo en una larva que en un pez adulto, podemos esperar una menor capacidad digestiva en la primera. A pesar de que la presencia de actividad lipolítica en las larvas de peces marinos fue detectada por algunos investigadores pioneros hace casi veinte años, los estudios sobre la capacidad de las larvas para hidrolizar lípidos dietéticos son escasos.

Varios tipos de lipasas han sido encontrados en el tracto digestivo de peces juveniles o adultos. Entre ellas, la lipasa neutra no-específica activada por las sales biliares (BAL) parece, jugar un papel principal en la digestión de lípidos neutros en varias especies de peces tales como anchoa, lubina listada, salmón, trucha arcoiris, bacalao y dorada, japonesa. Esta enzima cataliza la hidrólisis no sólo de acilglicéridos, sino también de otras grasas dietéticas menores incluyendo los ésteres de colesterol y los ésteres de vitaminas. También hay evidencias de la presencia de lipasa pancreática específica (MPL) en varias especies, aunque sólo ha sido aislada en trucha arcoiris. Esta enzima es activada por colipasa en presencia de sales biliares y es específica para triacilglicéridos. La actividad de la fosfolipasa A2 (PL₂) ha sido encontrada en varias especies de peces (Izquierdo y Henderson, 1998). PLA₂ cataliza la hidrólisis del ácido graso en la segunda posición de los fosfoglicéridos (PL) produciendo ácidos grasos libres y lisofosfoglicéridos.

A pesar de estos importantes avances en la digestión de lípidos en peces, los estadios referentes a larvas son escasos, sobre todo, aquellos que estudian la digestión de los lípidos dietéticos en el lumen del intestino. Estudios recientes sobre estos aspectos adaptando el método fluorimétrico desarrollado por Izquierdo y Hederson (1998) nos han permitido detectar la actividad de lipasa neutra en las larvas de dorada desde la primera alimentación exógena. Esta actividad incrementa durante los primeros días del desarrollo larvario, multiplicado por cinco y ocho los niveles iniciales en los días nueve y quince de edad respectivamente. Aunque algunos autores afirman que las larvas no presentan una falta de capacidad digestiva durante la primera alimentación exógena (Segner *et al.*, 1993), otros consideran que las larvas dependen principalmente de las enzimas digestivas presentes en las presas vivas (Munilla *et al.*, 1993), constituyendo este hecho al menos uno de los efectos beneficiosos de la alimentación larvaria con presas vivas frente a dietas artificiales. Por ello, varios autores han incluido enzimas digestivas en microdietas con distinto grado de éxito en términos de mejorar el cultivo larvario.

Aunque la lipasa pancreática específica ha sido detectada en algunas especies, este tipo de enzima no parece ser la principal responsable de la digestión de los lípidos neutros en los peces marinos. Las grasas conteniendo ácidos grasos polinsaturados de la serie n-3, predominantes en el medio marino y esenciales para peces marinos, son más resistentes a la hidrólisis por la MPL. Por el contrario, ha sido demostrada la especificidad por éstos ácidos grasos de la BAL. Así, aunque la MPL porcina hidroliza preferencialmente los ésteres del 18:1 n-9 sobre los del 18:2 11-6 ó 18:3 n-3, la BAL de peces muestra una preferencia por 20:5 n-3 y 20:4 n-6 sobre 18:2 n-6 y 18:1 n-9 (Iijima *et al.*, 1998). Nuestros estudios sobre la digestión de lípidos dietéticos en las larvas de dorada, han mostrado que la actividad de la lipasa neutra incrementó más cuando las larvas son alimentadas con rotíferos que contienen triglicéridos (TG) ricos en ácido eicosapentaenóico (20:5 n-3, EPA) que cuando son ricos en ácido docosaexaenóico (22: 6n-3, DHA) ó, principalmente, ácido oléico. Estos resultados

están de acuerdo con las especificidades encontradas por Iijima *et al.* (1998) y sugieren que la BAL está presente en el lumen de digestivo de dorada desde la primera alimentación exógena.

Recientemente se han estudiado los patrones de distribución de la actividad lipásica a lo largo del tracto digestivo de juveniles y adultos de peces, y parecen diferir entre las distintas especies (Cliakrabarti *et al.*, 1995; Izquierdo y Henderson, 1998). La actividad lipásica neutra está ampliamente distribuida a lo largo del tracto digestivo con una menor proporción de la actividad total presente en el estómago. En contraste con la mayor actividad lipolítica encontrada en la región anterior del intestino que en la posterior en bacalao, dorada y pargo (Izquierdo *et al.*, 1997), en especies como el rodaballo la mayor proporción de actividad lipásica neutra ocurre en la parte posterior. También la actividad fosfolipásica en esta última especie es superior en el intestino posterior. Esta diferencia en la distribución de la actividad lipolítica en el rodaballo podría estar relacionada con la menor longitud del tracto digestivo, con un mayor plegamiento de la mucosa y un incremento de la absorción en la región posterior del intestino. Este patrón de distribución de la actividad lipolítica encontrado en peces adultos, casi desaparece en juveniles, sugiriendo una menor diferenciación funcional en el tracto digestivo de peces juveniles.

Absorción y transporte

Absorción de lípidos en peces se asemeja a la de mamíferos. Después de la hidrólisis intraluminal, la grasa dietética es incorporada a las células epiteliales del intestino por difusión de una forma micelar de monoglicéridos y ácidos grasos libres. La reasociación sucede en el retículo endoplásmico y sus productos son liberados en la submucosa como quilomicrones ó lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).

La capacidad de absorción de lípidos por el epitelio intestinal al comenzar la alimentación exógena ha sido observada en las larvas de varias especies. En dorada aparecen pequeñas gotas lipídicas en la zona apical de los enterocitos desde la primera alimentación, evidenciando una temprana capacidad de absorción lipídica. A pesar de esta precoz habilidad para absorber lípidos, al final de la fase lecitotrófica, los enterocitos son funcionales pero están poco desarrollados en las larvas de lubina, mostrando una presencia limitada de retículo endoplásmico (Deplano *et al.*, 1991). Así, sólo una pequeña proporción de los lípidos absorbidos es incorporada en las lipoproteínas, sugiriendo una reducida capacidad de transporte lipídico. Tras varios días de alimentación con zooplancton se observa un mayor número de vacuolas lipídicas, la eficacia de transporte de lípidos parece mejorar a partir del día nueve, cuando se observa una intensificación de la síntesis de lipoproteínas, conjuntamente con un incremento de la deposición de glucógeno en el hígado. A partir del día dieciocho Deplano *et al.* (1989) sugieren incluso una mayor capacidad de síntesis de lipoproteínas y transporte de lípidos que en la lubina adulta.

Sin embargo, si las larvas de lubina se alimentan con microdietas, el transporte de lípidos se reduce, como sugiere el menor desarrollo del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi en los enterocitos (Deplano *et al.*, 1991). El transporte de lípidos desde el enterocito al hepatocito parece ser incrementado por la suplementación de la dieta con fosfolípidos (Kanzawa *et al.*, 1993). La alimentación de dorada con microdietas sin suplementación de lecitina produce

acumulación de vacuolas lipídicas en la zona basal del enterocito y esteatosis en el tejido hepático. Ambos efectos son reducidos por la adición de 2% de lecitina de soja en la dieta lo que denota el incremento del transporte de lípidos en el intestino y el hígado. La deficiencia dietética de fosfolípidos ha sido asociada con la acumulación de gotas de grasa en los enterocitos del intestino anterior en larvas de carpa, sugiriendo que este tipo de lípidos tienden a tener un papel específico en la síntesis de VLDL como sucede en mamíferos (Fontagne, 1996). La acumulación de gotas de grasa en el enterocito es reducida por la alimentación con fosfatidil colina (PC), mientras que el fosfatidil inositol (PI) es incapaz de prevenir dichas alteraciones (Fontagne, 1996). El incremento de la síntesis de lipoproteínas por la PC de la dieta puede estar relacionada con su predominancia en las lipoproteínas de los peces (95% de los fosfoglicéridos de las lipoproteínas) en comparación con otros fosfoglicéridos y una posible estimulación de la secreción de apoproteínas como sucede en mamíferos (Field y Mathir. 1995).

La composición de ácidos grasos de los fosfolípidos también parece determinar el efecto beneficioso de estas clases lipídicas. En la larva de dorada, la acumulación de vacuolas lipídicas en la zona basal del enterocito causada por la alimentación con microdietas sin suplementación de los lípidos, desaparece cuando las larvas son alimentadas con un 0.1% de PC tanto de origen marino (calamar) como vegetal (soja). Sin embargo, sólo la PC de origen marino fue capaz de evitar completamente la esteatosis hepática causada por la alimentación con microdietas sin suplementación de fosfolípidos, sugiriendo el efecto combinado de la PC y los n-3 HUFA dietéticos para promover la utilización de los lípidos hepáticos. De hecho, se ha reconocido ampliamente la capacidad de ambos tipos de moléculas para activar la síntesis de lipoproteínas. La composición de ácidos grasos difiere entre los distintos tipos de lipoproteínas reconocidos en los peces y es afectada por los lípidos dietéticos (Lie *et al.*, 1993). VLDL sintetizada principalmente en el intestino y en el hígado, presenta menores proporciones de ácidos grasos n-3 que HDL que proviene principalmente del hígado, el intestino y la lipólisis de otras lipoproteínas.

La alimentación con n-3 HUFA en forma de PL o TG parece ser más eficaz en la prevención de la deficiencia en ácidos grasos esenciales que los ácidos grasos libres. Así, la reducción del crecimiento larvario que se observa cuando se alimenta con rotíferos enriquecidos con ésteres metílicos de ácidos grasos en vez de TG, ha sido asociada con la incorporación de los n-3 HUFA principalmente en la fracción de los ácidos grasos libres del rotífero (Izquierdo *et al.* 1989). De esta manera, además del contenido total de n-3 HUFA en la dieta, la forma molecular en que éstos se presentan parece afectar al crecimiento y supervivencia de las larvas. De hecho, la incorporación de los ácidos grasos libres de la dieta en los lípidos de la larva es menor que la de los TG ó PL de la dieta (Salhi *et al.* en prensa).

Por otra parte, la alimentación de larvas de dorada con microdietas que contienen PL, marinos (ricos en n-3 HUFA) en vez de TG marinos mejora significativamente el crecimiento (Salhi *et al.*, en prensa). Las larvas alimentadas con triglicéridos marinos presentan acumulación de vacuolas lipídicas en la zona basal del enterocito y esteatosis hepática, denotando la buena absorción de los TG pero también la reducción del transporte de lípidos a los tejidos periféricos. Sin embargo, la alimentación con PL, marinos redujo notablemente la acumulación de lípidos en ambos tejidos.

Evidencias enzimáticas, histológicas y bioquímicas sugieren que las larvas de peces marinos son capaces de digerir y absorber eficazmente los TG ricos en n-3 HUFA, pero la alimentación con PL particularmente si son ricos en n-3 HUFA, mejorará la digestión de PL y especialmente el transporte de lípidos permitiendo una mejor incorporación de n-3 HUFA en los lípidos de membrana de las larvas y estimulando el crecimiento.

Acidos grasos esenciales

La esencialidad de los n-3 HUFA para las larvas de peces marinos ha sido revisada por varios autores (Watanabe y Kiron, 1994; Izquierdo, 1996). Estudios recientes han demostrado la importancia del ácido araquidónico (AA) en las larvas de algunas especies de peces marinos. En larvas de dorada, el AA dietético parece ser importante para la supervivencia, pero no es tan eficaz para mejorar el crecimiento como el DHA o el EPA. Así, la elevación de los niveles de AA de 0.1 a 1.1% en las microdietas mejora significativamente la supervivencia, pero sólo estimula ligeramente el crecimiento (Bessonart *et al.*, en prensa).

Además de un requerimiento mínimo para cada ácido graso esencial, las proporciones relativas entre los distintos ácidos grasos polinsaturados en los tejidos de la larva parece estar relacionada con los mejores resultados en crecimiento. Si existen interacciones competitivas entre estos ácidos grasos será necesario controlar sus proporciones dietéticas, junto con sus contenidos absolutos.

Como ha sido demostrado para dorada japonesa (Iijima *et al.*, 1998) y larvas de dorada, la competición entre AA, EPA y DHA podría incluso comenzar desde los procesos de digestión, pues al menos la BAL presenta una mayor afinidad por lípidos neutros esterificados a EPA o AA que a DHA.

Puesto que las acilasas y transacilasas que esterifican los ácidos grasos a los distintos PL, demuestran preferencias por algunos ácidos grasos, la competición entre polinsaturados a este nivel es obvia. Por ejemplo, la afinidad de las PC y especialmente, PE sintetizadas por DHA, particularmente en la segunda posición parece ser muy fuerte. Por una parte, la elevación del DHA en la microdieta para dorada de 0.7 a 2.6% con un nivel constante de EPA (0.7%), incrementó los niveles de DHA en la segunda posición de PE, inhibiendo los de EPA y mejorando significativamente el crecimiento. Por otra parte, la elevación de los niveles dietéticos de EPA de 0.3 a 1.1%, a niveles constantes de AA (0.7 y 0.06% respectivamente) fue incapaz de desplazar el DHA de ambas clases lipídicas. Sólo el incremento conjunto de los niveles de EPA hasta 1.7% y AA hasta 0.7% desplazó el DHA de la posición 2 de la PC e incremento el contenido de EPA en la posición 2 de PE, reduciendo el crecimiento consecuentemente y sugiriendo la importancia de mantener una relación equilibrada entre ácidos grasos de 20 y 22 carbonos.

De forma similar, la elevación de los niveles de AA de 0.1 a 1.5% (DHA 1.2% y EPA 0.7%) no solo no desplazó el DHA y EPA de los PL, larvarios sino que incrementó la incorporación de los tres ácidos grasos en la segunda posición de PC y PE. Curiosamente, los niveles de EPA fueron siempre mayores que los de AA en esas dos clases lipídicas, a pesar de los mejores niveles de EPA en la dieta, demostrando la incorporación preferente de EPA en la PC y PE.

Es necesario continuar el estudio del efecto de una mayor elevación de los niveles de AA dietéticos y la posible competición con el EPA por la síntesis de PL.

Otro nivel de competición bien conocido entre AA y EPA es la síntesis de eicosanoides. Ambos ácidos grasos son sustratos adecuados para las lipooxigenasas para producir leucotrienos de las series 4 y 5 respectivamente y para las ciclooxigenasas para producir prostanoïdes de las series 2 y 3 respectivamente.

Finalmente, los ácidos grasos de las series n-6 y n-3 también compiten por las desaturasas y elongasas que intervienen en las síntesis de ácidos grasos, aunque este tipo de competición no parece ser tan interesante en peces marinos debido a la prácticamente nula actividad de algunas de estas enzimas en dichas especies.

Las evidencias de estas interacciones competitivas entre ácidos grasos esenciales sugieren que para poder estimar los requerimientos dietéticos se deben investigar no solamente sus niveles dietéticos absolutos sino también las proporciones relativas entre ellos.

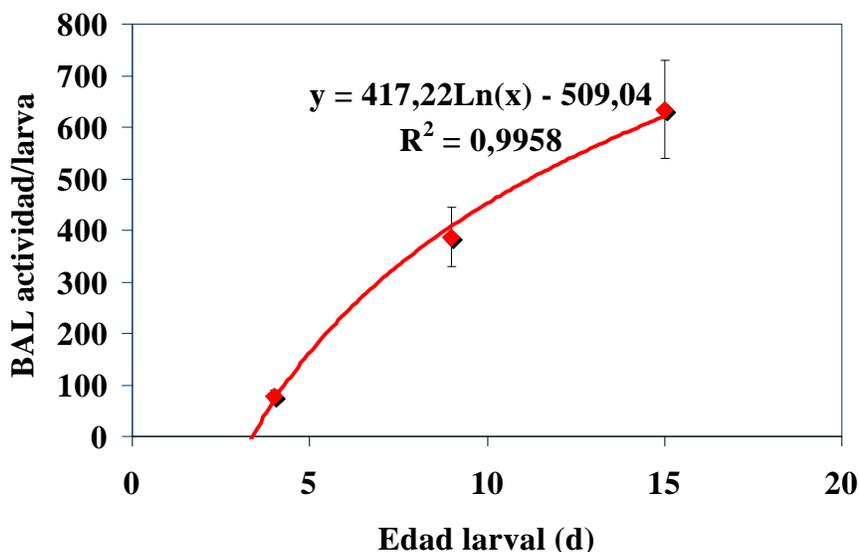


Figura. 1. Evolución de las sales biliares activadas por la lipasa en el tracto digestivo de dorada (*Sparus aurata*) durante el desarrollo larval (datos de los autores).

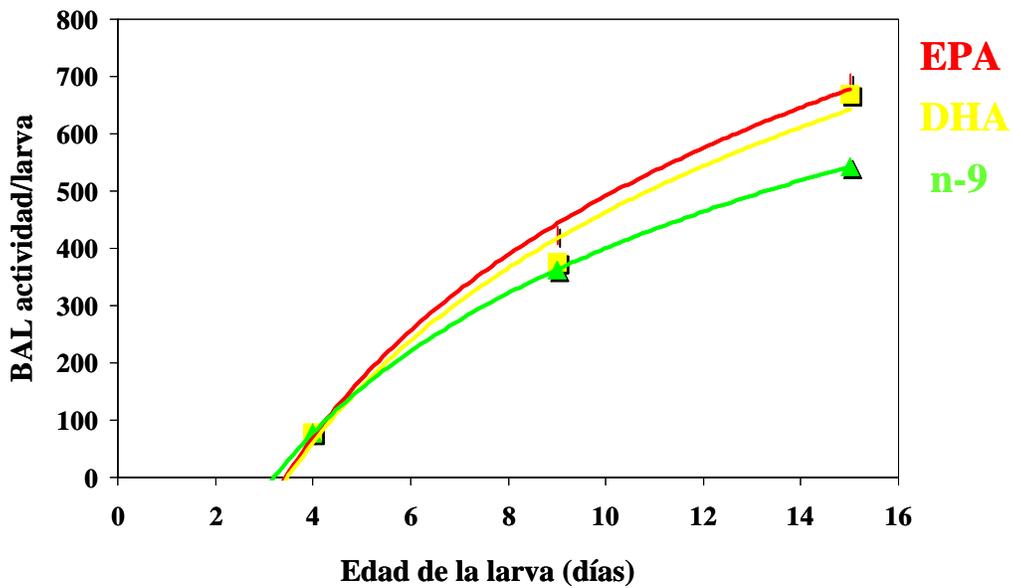


Figura. 2. Efecto de la alimentación de dorada (*Sparus aurata*) con rotíferos ricos en docosahexaenico, cicosapentaenico o ácidos oleicos en la sal biliar activada por la lipasa en el tracto digestivo de la larva (datos de los autores).

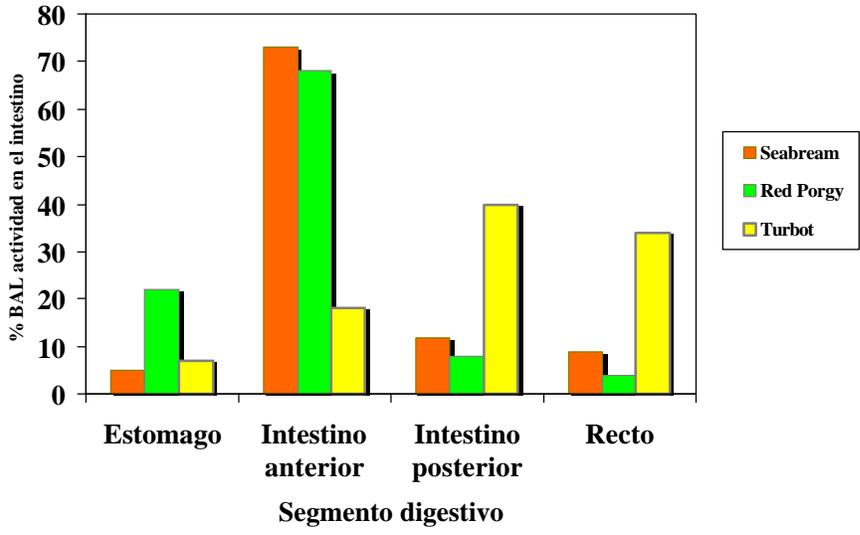


Figura. 3. Distribución entre los diferentes segmentos digestivos de la lipasa neutra en el tracto digestivo en juveniles de algunas especies marinas (Izquierdo et al. 1997-, Izquierdo y Henderson, 1998).

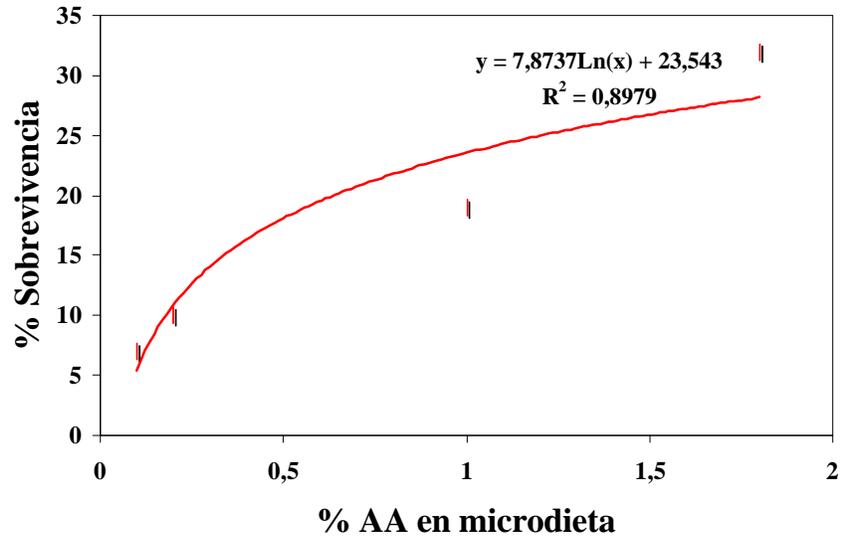


Figura. 4. Efecto de los niveles del ácido araquidonico dietético en la sobrevivencia larval de dorada (*Sparus aurata*) (Bessonart et al. submitted).

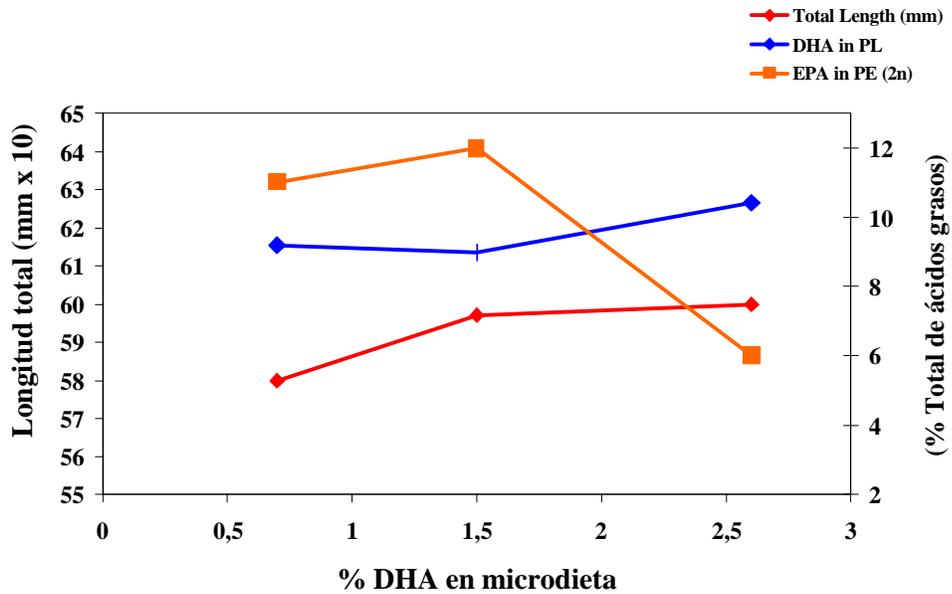


Figura. 5. Efecto de los niveles de DHA dietético en dorada (*Sparus aurata*) crecimiento e incorporación de DRA y EPA en los lípidos larvales (Dietary EPA y AA: 0.7 y 0.06% d.w., respectivamente) (datos de los autores).

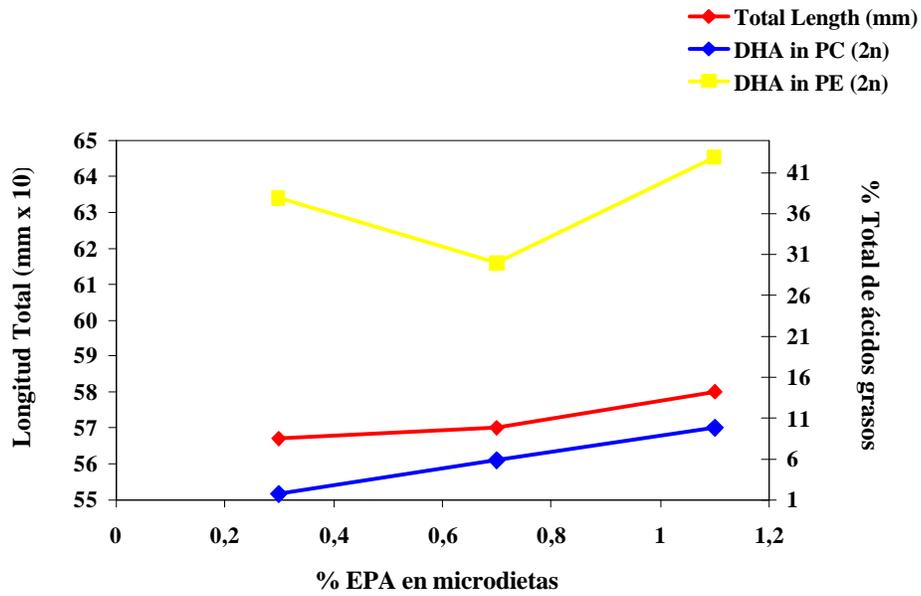


Figura. 6. Efecto de los niveles dietéticos de EPA en el crecimiento e incorporación de los lípidos larvales DHA en dorada (*Sparus aurata*) (Dieta DIJA y AA- 0.7 y 0.06% d.w., respectivamente) (datos de los autores).

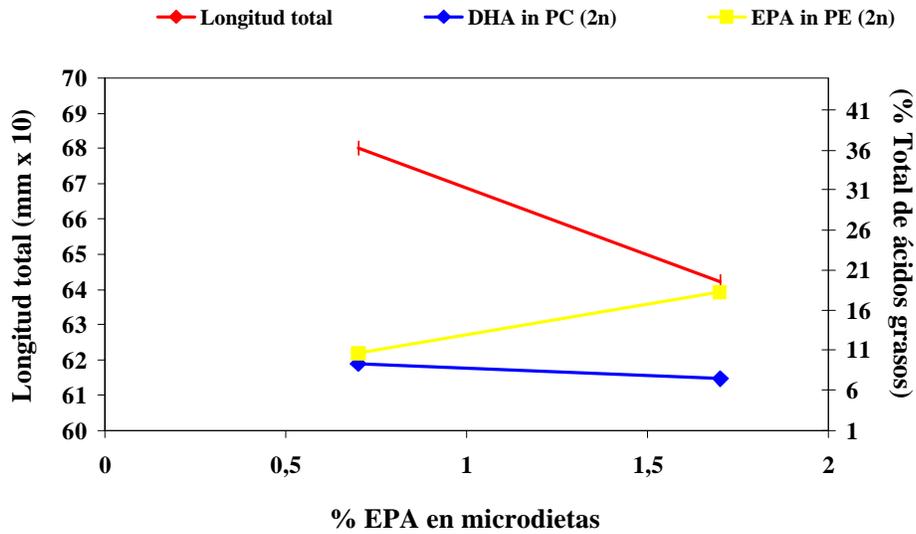


Figura. 7. Efecto de los niveles dietéticos de EPA de dorada (*Sparus aurata*) en el crecimiento e incorporación de DHA y EPA en los lípidos larvales (Dieta DHA y AA- 1.1 y 0.7% d.w., respectivamente) (datos de los autores).

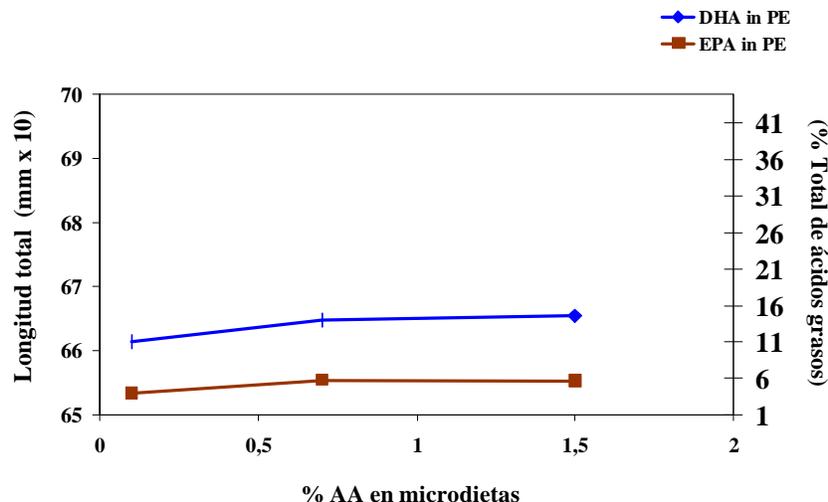


Figura. 8. Efecto de los niveles dietéticos de AA en dorada (*Sparus aurata*) en el crecimiento e incorporación de DHA y FPA en los lípidos larvales (dieta DHA y EPA: 1.2 y 0.7% d.w., respectivamente) (datos de los autores).

Referencias:

- Ackman, R.G. and Ratnayake, W.M.N.** 1989. Fish oils, sea oils, esters and acids are all forms of omega-3 intake equal? In: Health effect of fish and fish oils. pp:373-393. Edited by R.K.Chandra. ARTS Biomedical, Newfoundland, Canada.
- Albot, E., Patourcaud, A. and Trelu, J.** 1977. Evolution des activités enzymatiques dans le tractus digestif au cours de la vie larvaire du bar, *Dicentrarchus labrax*. Variations des protéinogrammes et des zymogrammes. Act. Colloques. 4:85-91.
- Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Salhi, M., Hernández-Cruz, C.M. González, M.M. Fernández-Palacios, H.** Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. Aquaculture (submitted).
- Borlongan, I.G.** 1990. Studies on the digestive lipases of milkfish, *Chanos chanos*. Aquaculture 89:315-325.
- Brown, C. L. and Kim, B.G.** 1995. Combined application of cortisol and triiodothyronine in the culture of larval marine finfish. Aquaculture, 135:1-3:79-86.
- Castell, J.D., Bell, J.G., Tocher, D.R. and Sargent, J.R.** 1994. Effects of purified diets containing different combinations of arachidonic and docosahexaenoic acid on survival, growth and fatty acid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) Aquaculture 155-149-164.
- Chakrabarti, I., Gani, Md.A., Chaki, K.K., Sur, R. and Misra, K.K.** 1995. Digestive enzymes in 11 freshwater teleosteous fish species in relation to food habit and niche segregation. Comp. Biochem. Physiol. 112A: 167-177.
- Cousin, J. C. B., Baudin-Laurencin, F. and Gabaudan, J.** 1987. Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot, *Scophthalmus maximus* ., J. Fish Biol. 30:1533.

- Deplano, M., Díaz, J.p., Connes, R., Kentouri-Divanach, M. and Cavalier, F.** 1991. Appearance of lipid-absorption capacities in larvae of the sea bass *Dicentrarchus labrax* during transition to the exotrophic phase. *Mar. Biol.* 108- 361-371.
- Deplano, M., Connes, R., Díaz, J.P., Paris, J.** 1989. Intestinal steatosis in the fann reared seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Dis. Aquat. Organisms* 6:121-130.
- Divakaran, S. and Ostrowsky, A.C.** 1990. Enzymes present in Pancreatic extracts of the dophin (*Coryphaena hippuras*). *J. World Aquaculture Soc.* 21-35-40.
- Field, F.G. and Mathur, S.N.** 1995. Intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *Prog.Lipid Res.* 34:185-198.
- Fontagne, S.** 1996. Effet des phospholipides alimentaires sur la structure histologique du fole et de l'Intestin de larves de carpe. Disertation thesis. Univ. Bordeaux (France).
- Fontagne, S., Geurden, I., Escaffre, A.M. and Bergot, P.** 1997. Histological changes induced by dietary phospholipids in intestine and liver of common carp larvae. *Aquaculture*.
- Gjellesvik, D.R., Lombardo, D. and Walther, B.T.**1992. Pancreatic bile salt dependent lipase from cod (*Gadus morhua*): purification and properties. *Biochem. Biophys. Acta* 1124:123-134.
- Gjellesvik, D.R., Lorens, J.B., and Male, R.** 1994. Pancreatic carboxylester lipase from Atlantic Salmon (*Salmo salar*)cDNA sequence and computer assisted modelling of tertiary structure. *Eur. J. Biochem*, 226:603-612.
- Guerden, I., Charlon, N., Marion, D. and Bergot, P.** 1995a. Dietary phospholipids and body deformities in carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. In: *Larvi 95'*. pp: 162-165. Edited by P. Lavens, E.Jaspers and I. Roelants. EAS Special Publication No. 24. Gent, Belgium.
- Guerden, I., Radunz-Neto, J. and Bergot, P.** 1995b. Essentiality of dietary phospholipids for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture* 131:303-314.
- Hwang, P.P., Wu, S.M., Lin, J.H. and Wu, L.S.** 1992. Cortisol content of eggs and larvae of teleosts. *Gen. Comp. Endocrinol.* 86-.189-196.
- Iijima, N., Tanaka, S. and Ota, Y.** 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.* 18.59'69.
- Iijima, N., Chosa, S., Uematsu, K. Goto, T., Toshita, T. and Kayama, M.** 1997. Purification and characterization of phospholipase A2 from the pyloric caeca of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Physiol. Biochem.* 16-.487-498.
- Iijima, N., Nakamura, M., Uematsu, K. and Kayama, M.** 1990. Partial purification and characterization of phospholipase A2 from the hepatopancreas of red sea bream, *Pagrus major*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56:1331-1339.
- Izquierdo, M.S. and Henderson, R.,J.** 1998. The determination of lipase and phospholipase activities in gut contents of turbot (*Scophthalmus maximus*) by fluorescence-based assays. *Fish Physiol Biochem.*
- Izquierdo, M.S.** 1996. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition* 2:183-19 1.
- Izquierdo, M. S., Watanabe, T. Takeuchi, T. Arakawa, T. and Kitajima, C.** 1989. Requirement of larval red seabream *Pagrus major* for essential fatty acids. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55:859-867.
- Izquierdo, M.S., Arantzamendi, L., and Caballero, M.J.**1997. Compared distribution of lipase and phospholipase activities along digestiva tract in several marine fish species. In: *Third International Symposium on Research for Aquaculture: Fundamental and applied aspects.* Universidad de Barcelona, Spain. August 24-27, 1997.
- Izquierdo, M.S.** 1988. Estudio de los requerimientos de ácidos grasos esenciales en larvas de peces marinos. Modificación de la composición lipídica de las presas. Dr. in Biological Sciences Thesis. La Laguna University, Spain. 205 pp.
- Kanazawa, A., Teshima, S., Inamori, S. asid Matsubara, H.** 1983. Effects of dietary phospholipids on growth of the larval red sea bream and knife jaw. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.* 32:115-120.
- Kanazawa, A., Teshima, S. and Sakamoto, M.** 1995. Effects of dietary bonito-egg phospholipids and some phospholipids on growth and survival of the larval ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Z. angew.lchthyol.* 4-.165-170.
- Kanazawa, A.** 1993a. Essential phospholipids of fish and crustaceans. In: *Fish Nutrition in practice.* pp:519-530. Edited by: S.J. Kausbik and P. Luquet. Les Colleeques n. 3 1. INRA, Paris.
- Kanazawa, A.** 1993b. Nutritional mechanisms involved in the occurrence of abnormal pigmentation in hatchery reared flatfish. *J. World Aquaculture Soc.* 24:162-166.

- Kolkowsky, S., Tandler, A. and Izquierdo, M.S.** 1997. Effects of live food and dietary digestive enzymes on the efficiency of microdiets for seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 148:313-322.
- Koven, W.M., Henderson, R.J. and Sargent, J.R.** 1994a. Lipid digestion in turbot (*Scophthalmus maximus*) I: Lipid class and fatty acid composition of digesta from different segments of the digestive tract. *Fish Physiol. Biochem.* 13:69-79.
- Koven, W.M., Henderson, R.J. and Sargent, J.R.** 1994b. Lipid digestion in turbot (*Scophthalmus maximus*) II: Lipolysis in vitro of 14 C-labelled triacylglycerol, cholesterol ester and phosphatidylcholine by digesta from different segments of digestive tract. *Fish Physiol. Biochem.* 13:275-283.
- Koven, W.M., Kolkovski, S., Tandler, A., Kissil, G.Wm. and Sklan, D.** 1993. The effect of dietary lecithin and lipase, as function of age, on n-9 fatty acid incorporation in the tissue lipids of *Sparus aurata* larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 10:357-364.
- Lam, T.J.** 1991. Hormones and egg/larval quality in fish. In: Larvae 91 . p. 197. Edited by: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E. and Ollevier, F. Gent.
- Léger, C., Bauchart, D. and Flanzy, J.** 1977. Some properties of pancreatic lipase in *Salmo gairdneri* Rich.: Effects of bile salts and Ca²⁺, gel filtration. *Comp. Biochem. Physiol.* 57:359-363.
- Lie, O., Sandvin, A. and Wagbo, R.** 1993. Influence of dietary fatty acids on the lipid composition of lipoproteins in farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.* 13:249-260.
- Lie, O.** 1993. Changes in the fatty acid composition of neutral lipids and glycerophospholipids in developing cod eggs. In: *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development*. pp: 330-337. Edited by: B.T. Walther and H.J. Fhyn. Bergen University, Norway.
- Montero, D., Tort, L., Izquierdo, M.S., Robaina, L. and Vergara, J.M.** 1998. Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead seabream caused by alpha-tocopherol and n-3 HUFA dietary deficiencies. *Fish Physiol. Biochem.* 18:399-407.
- Mukhopadhyay, P. K. and Rout, S. K.** 1996. Effects of different dietary lipids on growth and tissue fatty acid changes in fry of the carp (*Catla catla* (Hamilton)). *Aquacult. Res.* 27:623-630.
- Munilla, R., Ferreira, M.J., Fernández-Reiriz, M.J. Labarta, U. and Planas, M.** 1993. Effect of environmental factors on lipid digestion during early turbot (*Scophthalmus maximus*) development. In: *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development*. pp: 167-] 7 1. Edited by: Walter and Fhyn, Univ. of Bergen.
- Muzaffar-Bazaz, M. and Keshavanath, P.** 1993. Effect of feeding different levels of sardine oil on growth, muscle composition and digestive enzyme activities of mahseer, *Tor khudree*. *Aquaculture* 115:111-119.
- Oozeki, Y. and Bailey, K. M.** 1995. Ontogenetic development of digestive enzyme activities in larval walleye pollock *Theragra chalcogramma*. *Mar. Biol.* 122-177-186.
- Radünz-Neto, J., Corraze, G., Charlon, N. and Bergot, P.** 1994. Lipid supplementation of casein-based purified diets for carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture* 128:153-161.
- Rainuzzo, J.R., Farestveit, R. and Jorgensen, L.** 1993. Fatty acid and amino acid composition during embryonic and larval development in plaice (*Pleuronectes platessa*). In: *Physiological and Biochemical Aspects of Fish Development*. pp: 290-295. Edited by: B.T. Walther and H.J. Fhyn. Bergen University, Norway.
- Salhi, M., Kolkowsky, S., Izquierdo, M.S. and Tandler, A.** Incorporation of fatty acids from different lipid classes in larval gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed on microdiets. *Aquaculture*. Submitted a.
- Salhi, M., Izquierdo, M.S., Socorro, J., Hernández-Cruz, C.M., Bessonart, M. and Fernández-Palacios, H.** Effect of different dietary polar lipid levels and different n-3 HUFA content in polar lipids on the gut and liver histological structure of seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* Submitted b.
- Salhi, M., Izquierdo, M.S., Socorro, J., Hernández-Cruz, C.M., Bessonart, M. and Fernández-Palacios, H.** 1997. *J. Fish Biology*,
- Salhi, M., Koikovsky, S., Izquierdo, M.S. and Tandier, A.** 1995. Inclusion of lecithin and polar or neutral lipids high in n-3 HUFA in microdiets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. In: *Larvi' 95*. pp: 184-187. Edited by P. Lavens, E. Jaspers and I. Roelants. EAS Special Publication No. 24. Gent, Belgium.
- Sargent, J.R., Bell, M.V. and Tocher, D.R.** 1993. Docosahexaenoic acid and the development of brain and retina in marine fish. In: *Omega-3 Fatty Acids: Metabolism and Biological Effects*. pp: 139-149. Edited by C.A. Drevon, I. Baksaas and H.E. Krokan, Birkhauser-Verlag, Basel, Switzerland.

- Segner, H., Rosch, R., Schmidt, H. and von Poeppinghausen, K.J.** 1989. Digestive enzymes in larval *Coregonis lavaretus* L. J. Fish Biol. 35:249-263.
- Tanaka, M., Tanangonan, J. B., Tagawa, M. de Jesús, E.G., Nishida, H. Isaka, M. Kimura, R. and Hirano, T.** 1995. Development of the pituitary, thyroid and interrenal glands and applications of endocrinology to the improved rearing of marine fish larvae. Aquaculture, 135:11-126.
- Tandler, A., Watanabe, T., Satoh, S. and Fukusho, K.** 1989. The effect of food deprivation on the fatty acid and lipid profile of red sea bream larvae (*Pagrus major*) Br. J. Nutr. 62:349-361.
- Teshima, S., Kanazawa, A. and Kakuta, Y.** 1986a. Effects of dietary phospholipids on growth and body composition of the juvenile prawn. Nippon Suisan Gakkaishi 52:155-158.
- Teshima, S., Kanazawa, A. and Kakuta, Y.** 1986b. Effects of dietary phospholipids on lipid transport in the juvenile prawn. Nippon Suisan Gakkaishi 52:159-163.
- Teshima, S., Kanazawa, A. and Kakuta, Y.** 1986a. Role of dietary phospholipids in the transport of [14C] tripalmitin in the prawn. Nippon Suisan Gakkaishi 52:519-524.
- Wang, C. S. and Hartsuck J. A.** 1993. Bile salt-activated lipase. A multiple function lipolytic enzyme. Biochem. Biophys. Acta 1166:1-19.
- Watanabe, T., Izquierdo, M.S., Taketichi, T., Satoh, S. and Kitajima, C.** 1989. Comparison between eicosapentanoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficacy in larval red sea bream. Nippon Suisan Gakkaishi 55:1635-1640.
- Watanabe, T. and Kiron, V.** 1994. Prospects in larvas fish dietetics. Aquaculture.
- Watanabe, T.** 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. J. World Aquaculture Soc. 24:152-161.