CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLOGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EFECTO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO (20:4n-6) SOBRE LA CAPACIDAD REPRODUCTIVA Y EL NIVEL DE PROSTAGLANDINA PGE_2 DEL PEZ BLANCO DE PÁTZCUARO *Menidia estor*

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en ACUICULTURA)

P r e s e n t a

Rosa Linda Salgado García

La Paz, B.C.S. Junio del 2009.

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S.,siendo las 10:00 horas del día 18 del Mes de junio del 2009, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Efecto del ácido araquidónico (20:4n-6) sobre la capacidad reproductiva y el nivel de prostaglandina PGE_2 del pez blanco de Pátzcuaro *Menidia estor*"

Presentada por el alumno:

Rosa Linda Salgado García

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Acuicultura**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

DRA. ELENA PALACIOS MECHETNOV
DIRECTOR DE TESIS

DRA. DANITZIA A. GUERRERO TORTOLERO
CO-TUTOR

DR. JORGE FONSECA MADRIGAL
CO-TUTOR

DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORAL

Dra. Elena Palacios Mechetnov (directora)

Dr. Jorge Fonseca Madrigal

Dra. Danitzia A. Guerrero Tortolero

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dra. Elena Palacios Mechetnov (directora)

Dr. Jorge Fonseca Madrigal

Dra. Danitzia A. Guerrero Tortolero

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dra. Elena Palacios Mechetnov

Dr. Jorge Fonseca Madrigal

Dra. Danitzia A. Guerrero Tortolero

Dr. Roberto Civera Cerecedo (suplente)

RESUMEN

El ácido araquidónico (20:4n-6, ARA) es el principal precursor de prostaglandinas de la serie 2, como la PGE_2, modulador de la capacidad reproductiva. Estudios previos han propuesto una relación entre la deficiencia de ARA y la baja calidad de los desoves en cultivos del pez blanco (*Menidia estor*), un atherinópsido dulceacuícola endémico del lago de Pátzcuaro, Michoacán, con gran potencial para la acuicultura. En el presente estudio se evaluó la capacidad reproductiva, la calidad del desove y el nivel de prostaglandina PGE_2 en gónadas de reproductores cultivados de pez blanco de Pátzcuaro alimentados con artemia adulta (*Artemia franciscana*) enriquecida con ARA (3%, 4% y 7%) durante 10 semanas. Los resultados muestran que el suplemento de ARA en la dieta de los reproductores estimula cambios a nivel bioquímico y fisiológico en la gónada de machos y hembras, afectando la calidad de los desoves. El ARA no afectó la supervivencia y/o crecimiento de los reproductores; sin embargo, un nivel alto de ARA (7%) estimuló un mayor contenido de lípidos en las gónadas de las hembras y una mayor producción de huevos (5356 ± 877^{a}-3%ARA, 4625 ± 1076^{a}-4%ARA y 7829 ± 618^{b}-7%ARA), sin alterar la concentración de PGE_2 de las gónadas. Los machos presentaron mayores niveles de PGE_2 que las hembras (373 ± 35 vs. 245 ± 34 pg g^{-1}) sin que esto afectara la concentración espermática de los organismos. Las hembras alimentadas con un bajo nivel de ARA (3%) produjeron huevos de menor tamaño (1077 ± 1.7^{a}-3%ARA, 1085 ± 1.3^{b}-4%ARA y 1085 ± 1.2^{b}-7%ARA µm); observándose que un suplemento de ARA en la dieta de los reproductores también afectó la fertilización, eclosión y tamaño de gota lipídica al

final del experimento (semana 8). La longitud de las larvas fue mayor en desoves provenientes de organismos alimentados con 4% de ARA (4.8±0.05[a]-3%ARA, 5.1±0.04[b]-4%ARA y 4.8±0.6[a]-7%ARA, mm). Los resultados indican que los organismos cultivados podrían beneficiarse de una dieta enriquecida con ARA durante el periodo reproductivo y que el ARA podría revertir algunos de los efectos del agotamiento reproductivo de los organismos cultivados sobre la calidad de los huevos. El presente estudio es el primero en evaluar el efecto de una dieta rica en HUFA n-6 sobre los parámetros de reproducción, en particular el nivel de PGE_2 en el pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

Palabras clave: calidad del desove, HUFA n-6, larva, reproducción.

.

ABSTRACT

Arachidonic acid (ARA, 20:4n-6) is the most important precursor of prostaglandins of the type 2, like PGE_2, which can modulate reproductive capacity. A previous study proposed that low ARA levels could be associated to poor spawn quality in cultured pike silverside *Menidia estor*, a freshwater endemic fish from Patzcuaro Lake, Michoacan, Mexico that has great potential for aquaculture. In the present study, Artemia enriched with ARA (3%, 4% and 7%) was offered to broodstock for 10 weeks, and the effect upon reproductive performance, spawn quality and PGE_2 in gonads of cultured *M. estor* was evaluated. ARA enrichment of the diet did not affect survival or growth of broodstock, but fish fed 7% ARA had more lipid accumulation in gonads and larger spawns (5356 ± 877^{a}-3%ARA, 4625 ± 1076^{a}-4%ARA and 7829 ± 618^{b}-7%ARA), although PGE_2 levels in female gonads were not affected. Males showed higher PGE_2 levels than females (373±35 vs. 245±34 pg g^{-1}) but ARA did not affect sperm count. Females fed lower ARA levels (3%) produced smaller eggs (1077 ± 1.7^{a}-3%ARA, 1085 ± 1.3^{b}-4%ARA and 1085 ± 1.2^{b}-7%ARA µm); ARA levels also affected fertilization, hatching, and lipid droplet size in eggs. Larvae produced by fish fed 4% ARA were bigger (4.8 ± 0.05^{a}-3%ARA, 5.1 ± 0.04^{b}-4%ARA y 4.8 ± 0.6^{a}-7%ARA, mm). These results indicate that silverside broodstock could benefit from an ARA-enriched diet during reproduction in captivity, and that ARA can reverse some negative effects of reproductive exhaustion on spawn quality. This is the first report to evaluate the effects of HUFA n-6 diet on reproductive performance and PGE_2 levels in pike silverside from Patzcuaro lake (*M. estor*).

Keywords: spawn quality, HUFA n-6, larvae, reproduction.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN **1**

1.1 Los ácidos grasos en la dieta de los peces 2
1.2 Importancia de los HUFA n-3 y n-6 en la reproducción 7
1.3 Importancia del ARA en la dieta 11
1.4 Eicosanoides y prostaglandinas 16
1.5 Las PG de la serie 2 y su efecto sobre la reproducción 17

2. ESPECIE DE ESTUDIO **24**

2.1 Familia Atherinopsidae 24
2.2 El pez blanco de Pátzcuaro (*Menidia estor*) 26
2.3 Biología reproductiva 27

3. JUSTIFICACIÓN **30**

4. HIPÓTESIS **32**

5. OBJETIVOS **33**

5.1 Objetivo general 33
5.2 Objetivos particulares 33

6. MATERIALES Y MÉTODOS **34**

6.1 Reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) 34
6.1.1 Aclimatación de los reproductores al sistema experimental 35
6.2 Sistema experimental 36
6.3 Alimentación 36
6.4 Calidad de agua 38
6.5 Muestreos de los desoves 39
6.5.1 Colecta y obtención de muestras de los desoves 39
6.5.2 Número de desoves 40
6.5.3 Número de huevos producidos 40
6.5.4 Tasa de fertilización 41
6.5.5 Obtención de muestras para el análisis de ácidos grasos 41
6.5.6 Diámetro de los huevos y área de gota lipídica 41
6.5.7 Tasa de eclosión 43
6.5.8 Longitud total de larvas recién eclosionadas 44

6.5.9 Evaluación de la composición de ácidos grasos de los desoves 45
6.6 Muestreo final de los reproductores 46
6.6.1 Muestreo de hembras 46
6.6.2 Muestreo de machos 47
6.6.3 Ganancia de peso 47
6.6.4 Índice gonadosomático (IGS) 48
6.6.5 Índice hepatosomático (IHS) 48
6.6.6 Concentración espermática 49
6.7 Análisis bioquímico de gónadas 50
6.7.1 Procesamiento general de las muestras 50
6.7.2 Carbohidratos 51
6.7.3 Lípidos totales 51
6.7.4 Proteínas totales 52
6.7.5 Ácidos grasos en gónadas 53
6.8 Análisis de PGE_2 en gónada 53
6.8.1 Purificación del tejido gonádico 53
6.8.2 Desarrollo del inmunoensayo por competencia enzimática 55
6.9 Análisis estadístico 55

7. RESULTADOS 57

7.1 Desempeño de los reproductores en cultivo 57
7.1.1 Supervivencia de los reproductores 57
7.1.2 Peso hembras 58
7.1.3 Longitud total hembras 58
7.1.4 Peso machos 59
7.1.5 Longitud total machos 60
7.1.6 Ganancia de peso 61
7.1.7 Índice hepatosomático (IHS) 62
7.1.8 Índice gonadosomático (IGS) 62
7.2 Composición bioquímica de las gónadas 63
7.2.1 Carbohidratos 63
7.2.2 Lípidos totales 64
7.2.3 Proteínas totales 65
7.2.4 Concentración de ácidos grasos en fosfolípidos de gónadas 66
7.2.5 Proporción de HUFA en fosfolípidos de gónadas 68
7.2.6 Concentración de ácidos grasos en los lípidos de reserva de gónadas 69
7.2.7 Proporción de HUFA en los lípidos de reserva de las gónadas 71
7.2.8 Contenido de PGE_2 en gónadas 72
7.3 Calidad del desove 72
7.3.1 Número de desoves 72
7.3.2 Número total de huevos producidos 73
7.3.3 Fertilización 74
7.3.4 Eclosión 75

7.3.5 Tamaño de los huevos 76
7.3.6 Área total de las gotas lipídicas 77
7.3.7 Longitud de larvas recién eclosionadas 78
7.3.8 Concentración espermática 79
7.4 Composición de ácidos grasos de los desoves 80
7.4.1 Proporción de ácidos grasos en fosfolípidos y lípidos de reservas de huevos recién fertilizados durante la fase de aclimatación de los reproductores al sistema experimental 80
7.4.2 Proporción de ácidos grasos en fosfolípidos de huevos recién fertilizados durante el experimento 81
7.4.3 Proporción de ácidos grasos en los lípidos de reserva de huevos recién fertilizados 84
7.5 Contenido de ARA en gónadas y relación con capacidad reproductiva 86
7.6 Relación entre composición del huevo y calidad del desove 86

8. DISCUSIÓN 87

8.1 Desempeño en cultivo de los reproductores 87
8.1.1 Requerimientos de ARA en reproductores 91
8.1.2 Ácidos grasos en reservas y fosfolípidos de gónadas 94
8.1.3 Capacidad de síntesis de HUFA n-6 98
8.2 Capacidad Reproductiva 101
8.2.1 Contenido de PGE_2 en las gónadas de reproductores 101
8.3 Calidad del desove 105
8.3.1 Calidad del huevo: eclosión, tamaño, gotas lipídicas y longitud larvaria 113
8.3.1 Concentración espermática 114

9. CONCLUSIONES 117

10. CONCLUSION GENERAL 119

11. RECOMENDACIONES 120

12. LITERATURA CITADA 122

ANEXO 1. Composición bioquimica del alimento peletizado 142

ANEXO 2. Enriquecimiento de artemia adulta (*A. fransciscana*) con ácido araquidónico 145

LISTA DE FIGURAS

No.	TITULO	PAG.
1	Control del ciclo reproductivo de los peces teleósteos (Arukwe y Goksaoyr, 2003; BIM, 2003)	1
2	Ruta de síntesis de ácidos grasos en peces (Sargent *et al.,* 1995b)	5
3	Ruta de síntesis de las prostaglandinas (PG) y tromboxanos (TX) a partir de ARA (20:4n-6) (Bell et al., 1986; Rouzer y Marnett, 2005)	20
4	Distribución de la familia Atherinopsidae	24
5	Pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)	26
6	**A.** Reproductores de pez de Pátzcuaro (*M. estor*) de 2 años de edad. **B.** Sexado de reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)	35
7	**A.** Huevos de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) colectados para su conteo **B.** Huevo de pez blanco donde se muestran de 6 a 8 hilos adherentes	40
8	**A.** Diámetro de huevo fertilizado (48 h) de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) **B.** Área de gota de lípidos teñidas con negro de sudán	42
9	Incubadoras experimentales para los desoves de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)	44
10	Larva (48 h) de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) preservada en solución de Davidson	44
11	Obtención de muestras de tejido de reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)	47
12	Supervivencia (%) de los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) al final del período experimental (día 70)	57
13	Peso inicial (g) (día 1) y peso final (g) (día 70) de las hembras de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)	58

14	Longitud total inicial (cm) (día 1) vs. longitud total final (cm) (día 70) de las hembras de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).	59
15	Peso inicial (g) (día 1) vs. peso final (g) (día 70) del período de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)	60
16	Longitud total inicial (cm) (día 1) de vs. longitud total final (cm) (día 70) de los machos de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)	61
17	Índice hepatosomático (%) de los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)	62
18	Índice gonadosomático (%) de los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)	63
19	Concentración de carbohidratos (mg g^{-1}) de las gónadas de los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)	64
20	Concentración de lípidos totales (mg g^{-1}) de las gónadas de los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)	65
21	Concentración de proteínas totales (mg g^{-1}) de las gónadas de los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)	66
22	Proporción de HUFA (%) en los fosfolípidos de las gónadas de los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)	68
23	Proporción de HUFA (%) en los lípidos de reserva de las gónadas de los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)	71
24	Concentración de PGE_2 (pg g^{-1}) en gónadas de reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)	72
25	Número promedio de desoves producidos por el pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) durante el período experimental	73
26	Número total de huevos producidos (diciembre 2007 a febrero del 2008)	74
27	Fertilización (%) de los desoves de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) a las 2 y a las 8 semanas de tratamiento con una dieta rica en ARA	75

28	Eclosión (%) de los desoves de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) a las 2 y a las 8 semanas de tratamiento con una dieta rica en ARA	76
29	Diámetro de huevos (µm) de los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) a las 2 y a las 8 semanas de tratamiento con una dieta rica en ARA	77
30	Área total (μm^2) de las gotas lípidicas de los desoves de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) a las 2 y alas 8 semanas de tratamiento con una dieta rica en ARA	78
31	Longitud total (mm) de las larvas recién eclosionadas (48h) de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)	79
32	Concentración espermática (10^9 cel ml^{-1}) de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)	80
33	Proporción de HUFA (%) de los fosfolípidos de los huevos recién fertilizados de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)	82
34	Proporción de HUFA (%) de los lípidos de reserva de los huevos recién fertilizados de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)	83
35	**A.** Cultivo de Microalga (*Chlorella* spp) **B.** Cultivo de artemia adulta (*A. franciscana*)	146
36	Proporción de ARA (%) en la artemia adulta (*A. franciscana*) enriquecida con diferentes niveles de ARA durante diferentes períodos de tiempo	151

LISTA DE TABLAS

No.	TITULO	PAG.
I	Estudios del efecto del ARA en peces teleósteos	15
II	Estudios de prostaglandinas de la serie 2 (PG_2) en peces teleósteos	21
III	Atherinópsidos en México (Blancas *et al.,* 2003; 2004)	25
IV	Composición proximal (%) de los alimentos peletizados	36
V	Proporción de ácidos grasos (%) de los alimentos peletizados	37
VI	Proporción de ácidos grasos (%) de la artemia adulta (*A. franciscana*) enriquecida con diferentes niveles de ARA (0%, 3% y 16%) durante 18 horas	38
VII	Parámetros de calidad del agua del sistema experimental	39
VIII	Composición de la solución de Davidson	42
IX	Composición de la solución inhibidora de la motilidad espermática	49
X	Composición de la solución de Hank	54
XI	Concentración de ácidos grasos (mg g^1) en los PL de las gónadas de reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)	67
XII	Concentración de ácidos grasos (mg g^1) en los lípidos de reserva de las gónadas de reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)	70
XIII	Proporción de ácidos grasos (%) en fosfolípidos y lípidos de reserva de los huevos recién fertilizados previo al período experimental (n=3)	81
XIV	Ácidos grasos (%) de los PL de los huevos recién fertilizados de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)	83
XV	Proporción de ácidos grasos (%) de los lípidos de reserva de los huevos recién fertilizados de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)	85
XVI	Composición (g) de la emulsión de aceite de girasol	147

XVII Composición (%) de las emulsiones experimentales 0%, 3% y 16% ARA 147

XVIII Proporción de ácidos grasos (%) del aceite de girasol y la emulsión ARA (ICES, 1997) 148

XIX Proporción de ácidos grasos (%) de las emulsiones experimentales 0%, 3% y 16% 149

XX Proporción de ácidos grasos (%) de la artemia adulta (A. fransciscana) enriquecida con diferentes niveles de ARA durante diferentes períodos de tiempo 152

LISTA DE ACRÓNIMOS

ACRÓNIMO	SIGNIFICADO
ACE	Ensayo de competencia enzimática
ARA	Ácido araquidónico
ARN	Ácido ribonucleico
ADRP	Proteína relacionada a la diferenciación del tejido adiposo
CG	Cromatografía de gases
COX	Ciclooxigenasa (COX_1 y COX_2)
DHA	Ácido docosahexaenoico
EIA	Inmuno ensayo enzimático
EP	Receptor de prostaglandinas de la serie 2 ($EP_{1.}$ EP_2, EP_3 y EP_4)
EPA	Ácido eicosapentaenoico
E_2	Estradiol
FID	Detector de ionización por llama
GnH	Hormona gonadotropina
hCG	Hormona Gonadotropina coriónica humana
HPLC	Cromatografía líquida de alta definición
LH	Hormona luteinizante
L:0	Proporción de horas luz y horas oscuridad en un ciclo de 24 horas
LP	Longitud patrón (centímetros)
LT	Longitud total (centímetros)
n-3/n-6	Proporción de ácidos grasos de la serie 3 y de la serie 6
pg	Picogramos
PG_2	Prostaglandinas de la serie 2
PG_3	Prostaglandinas delas serie 3
PGE_2	Prostaglandina tipo E de la serie 2.
PGEM	Estándar comercial del metabolito de Prostaglandina tipo E
$PGF_{2\alpha}$	Prostaglandina tipo F de la serie 2, configuración alfa.
PGI_2	Prostaglandina tipo I de la serie 2
pH	Concentración de iones H^+ de una solución acuosa
PL	Fosfolípidos
psu	Unidades prácticas de salinidad
trat	Tratamiento
T	Testosterona
Tx	Tromboxanos
Wg	Peso corporal expresado en gramos
Σ SAT	Sumatoria total de ácidos grasos saturados
Σ MUFA	Sumatoria total de ácidos grasos monoinsaturados
Σ PUFA	Sumatoria total de ácidos grasos poliinsaturados
Σ HUFA	Sumatoria total de ácidos grasos altamente insaturados

DEDICATORIA

A mi mamá, por creer en esa niña que amaba los peces e inculcarme respeto, responsabilidad y sobretodo, amor por lo que hago. Eres mi fuente eterna de inspiración.

A mis hermanas, por acompañarme en esta locura y brindarme enormes dosis de amor, confianza, fe y paz.

A mi abuelita, por esa genialidad que me ha guiado en todas las etapas de mi vida con sabiduría y amor.

A mi papá, por esa última vez que sostuve tu mano entre las mías. La fortaleza surge precisamente de los momentos de mayor debilidad.

A Antonio, porque juntos estamos aprendiendo a reconocer las verdaderas cosas importantes de la vida y por ese corazón maravilloso que tanto amo.

A la Dra. Elena Palacios, por brindarme su apoyo y sus consejos, guiándome con una dedicación admirable. Gracias por sus enseñanzas, que más allá de los lípidos, son del tipo de enseñanzas que sirven para toda la vida.

A Haydeé, por esa amistad maravillosa que trasciende el tiempo y la distancia. Sin duda, seremos amigas hasta que seamos un par de pasas.

A Yarely, porque en ti, encontré más que a una amiga, a una hermana. Te quiero mucho topo.

A Verónica, por esa amistad, que estoy segura, será para toda la vida. Después de todo, que serían las PG_2 sin el ARA y la piralika sin la verënica.

A Olivia, por ser mi chamán en el fascinante mundo de los lípidos, y sobretodo, por tu amistad, tu apoyo y tus consejos.

A Anita y Ana Rosa porque su amistad me hizo sonreír en los momentos más difíciles, en los que no dudaron en darme su apoyo.

A mis amigos, Arlette, Rodolfo, Sergio, Pau, Getza, Adán, Angie, el chino, Miguel, Citlali, Raúl y Cristina, por todos los buenos momentos que compartimos.

A Poly-Pocket, Loló, Atzin, Mónica, Benjamín, Miguel Ángel, Ricardo y Vicky, porque nos hicimos amigos mientras tratábamos de aprender ácidos grasos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo recibido a través de los siguientes proyectos para la realización de la presente tesis:

“Niveles de prostaglandinas en relación al suplemento nutricional HUFA y su efecto en la reproducción del pez blanco *Chirostoma estor estor*”. SEP-CONACYT (49191), a cargo de la Dra. E. Palacios.

“Caracterización enzimática de las rutas biosintéticas (elongación y desaturación) de ácidos grasos en el pez blanco de Pátzcuaro *Menidia estor*: un pez de origen marino que habita en agua dulce y sintetiza ácidos grasos altamente insaturados.” Ciencia Básica CONACYT (61117), a cargo del Dr. Jorge Fonseca.

Asimismo, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por la beca (No. 206471) otorgada para realizar mis estudios de posgrado.

Al departamento de posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. A las Dras. Thelma Castellanos y Elisa Serviere y en especial, a Osvelia Ibarra, Leticia Gónzalez, Beatriz Gálvez y Claudia E. Olachea por todo su apoyo.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Elena Palacios Mechetnov (Directora), Dra. Danitzia A. Guerrero Tortolero, Dr. Jorge Fonseca Madrigal y Dr. Roberto Civera Cerecedo por todo su apoyo y consejos.

En especial, agradezco el apoyo y aportaciones de los Drs. Ilie Racotta Dimitrov, Carlos A. Martínez Palacios, Antonio Campos Mendoza y Gisela Ríos Durán durante la planeación y desarrollo del trabajo experimental.

Asimismo, manifiesto mi agradecimiento por el apoyo y asesoramiento recibido en los diversos laboratorios en cuyas instalaciones se realizaron los experimentos y/o análisis correspondientes:

M.C. Olivia Arjona López y M.C. Mónica A. Reza (Laboratorio de Metabolismo de Lípidos. CIBNOR.).

M.C. Lidia Ambriz, M.C. Jesús López, M.C. Ana Rosa Téllez, M.C. Antonio Tello, Biol. Dafne Moreno, Biol. Luisa S. Servin y Biol. José Luis López (Laboratorio de Nutrición y Acuicultura de Especies Nativas. UMSNH).

M.C. Diana Patricia Carreño y M.C. Roberto Hernández (Laboratorio de Bioquímica Fisiológica, CIBNOR).

M.C. Carmen Rodríguez Jaramillo (Laboratorio de Histología e Histoquímica, CIBNOR).

1. INTRODUCCIÓN

Existen alrededor de 29,400 especies de peces en el mundo, las cuales presentan una gran diversidad de estrategias reproductivas con ciclos reproductivos generalmente anuales regulados por el sistema hipotálamo-pituitaria-gónadas (Bromage, 1995; Jobling, 1995; Yamaguchi *et al.,* 2006), el cual, a su vez es influenciado por la interacción de factores endógenos (edad, genética, tamaño), exógenos (fotoperiodo, temperatura, salinidad, dieta, precipitación, fase lunar) y factores inherentes al cultivo (exposición a patógenos, manejo, dieta, transporte) (Ballestrazzi *et al.,* 2003). Dichos factores endógenos y exógenos modulan la respuesta hormonal y afectan la maduración sexual, la gametogénesis y la liberación de los gametos (Babin *et al.,* 2007) (Fig. 1).

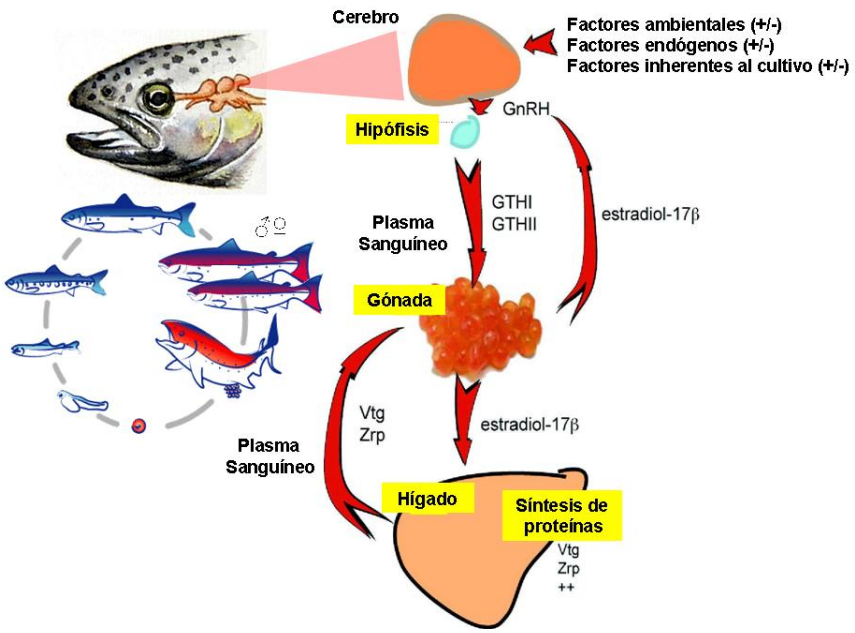

FIGURA 1. Control del ciclo reproductivo de los peces teleósteos (Arukwe y Goksaoyr, 2003; BIM, 2003).

Una de las principales limitantes para el manejo de los organismos durante su cultivo es la habilidad de controlar la maduración sexual y conocer los requerimientos nutricionales de los reproductores para incrementar la calidad de la progenie (Bromage, 1995; Abi ayad *et al.,* 1997; Izquierdo *et al.,* 2001). La calidad de los desoves se define por una serie de factores fisiológicos, bioquímicos y morfológicos que en conjunto determinan la supervivencia, el crecimiento y el desempeño general de la progenie (Poole y Dillane, 1998; Carrillo *et al.,* 2000; Almansa *et al.,* 2001; Arcos *et al.,* 2003; Penney *et al.,* 2006).

1.1 Los ácidos grasos en la dieta de los peces

Los ácidos grasos, al igual que otros nutrientes esenciales (aminoácidos, carbohidratos, vitaminas, minerales) son adquiridos a través de la dieta previo o durante la maduración de las gónadas para ser metabolizados y transportados a los gametos en donde proveerán de la energía necesaria para el adecuado desarrollo de los embriones y las larvas hasta su primera alimentación exógena (Lavens *et al.,* 1999; Mazorra *et al.,* 2003). Los ácidos grasos son estructuras hidrocarbonadas (4 a 36 carbonos) y anfipáticas (Lunn y Theobald, 2006) clasificadas de acuerdo al número de dobles enlaces en **ácidos grasos saturados** (SFA), carentes de insaturaciones; **ácidos grasos monoinsaturados** (MUFA) si contienen una insaturación entre los carbonos (Δ_9 u otro); **ácidos grasos poliinsaturados** (PUFA) con más de una insaturación (Δ_{12}, Δ_{15}, u otros) y **ácidos grasos altamente insaturados** (HUFA) si contienen 4 o más insaturaciones en su cadena

hidrocarbonada (Karp, 1998; Nelson y Lenhinger, 2000; Lodish, 2003). Los ácidos grasos intervienen en el metabolismo celular, respuesta al estrés, reproducción, adaptación al ambiente, síntesis de eicosanoides, respuesta inmune, desarrollo del sistema nervioso y expresión genética, entre otros (Brett y Navarra, 1997; Steffens, 1997b; Alessandri *et al.,* 2004; Sampath y Ntambi, 2005). Generalmente, se considera que los HUFA actúan como bloques estructurales de los fosfolípidos (PL) de las membranas celulares, mientras que los ácidos grasos saturados y monoinsaturados participan como lípidos de reserva (acilglicéridos, esteroles, etc.). Los requerimientos de ácidos grasos en la dieta de los organismos varía ampliamente entre especies, de acuerdo a la etapa del ciclo de vida, sexo, dieta, factores ambientales (salinidad, temperatura, fotoperiodo, etc.); pudiendo además, intensificarse durante los períodos de mayor actividad, crecimiento, estrés y/o la temporada reproductiva (Henderson *et al.,* 1987; Booth *et al.,* 1999). Asimismo, el requerimiento de ácidos grasos en la dieta también varia de acuerdo a la capacidad de síntesis de los organismos, la cual es regulada por la tasa de transcripción genética y la actividad de enzimas desaturasas y elongasas, a través de rutas de síntesis dependientes de oxígeno (Fig. 2) (Aguilar y Mendoza, 2004). Los peces marinos no son capaces de sintetizar HUFA n-3 y n-6 a partir de sus precursores de 18 carbonos, debido a la ausencia de la elongasa C_{18}-C_{20} y/o inactividad de la desaturasa Δ_5 ; por lo que el ácido eicosapentaenóico (20:5n-3, EPA), el ácido docosahexaenóico (22:6n-3, DHA) y el ácido araquidónico (20:4n-6, ARA) son esenciales en su dieta (Ghioni *et al.,* 1999) y aunque algunas especies marinas como el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) presentan una capacidad de elongación y

desaturación de PUFA a HUFA, ésta puede presentarse a una tasa y/o velocidad deficiente para cubrir sus necesidades fisiológicas (Castell *et al.,* 1994; Sargent *et al.,* 1995b; Tocher, 2003). Se ha sugerido que en ambientes marinos, la disponibilidad de dichos ácidos grasos en la dieta es alta, por lo que los peces no requieren invertir energía para sintetizarlos (Bell *et al.,* 1986; Copeman y Parrish, 2002; Bell y Sargent, 2003; Bransden *et al.,* 2005b). En contraste, la mayoría de los peces dulceacuícolas presentan la capacidad de sintetizar HUFA n-3 y n-6 a partir de ácido linolénico (18:3n-3) y ácido linoléico (18:2n-6) (Sargent *et al.,* 1993; De Silva, *et al.,* 1997; Almansa *et al.,* 2001; Bell y Dick, 2004). Sin embargo, dicha capacidad de síntesis puede ser limitada o presentarse a baja velocidad, por lo que los peces de agua dulce cuya dieta es suplementada con HUFA n-3 y n-6 presentan mejores tasas de supervivencia y crecimiento comparados con organismos alimentados con 18:2n-6 y 18:3n-3 (Henderson *et al.,* 1987; Brett y Navarra 1997; Gill y Valivety, 1997; Bell y Sargent, 2003; Bell y Dick, 2004). Dichas diferencias en la capacidad de síntesis de ácidos grasos entre los peces marinos y dulceacuícolas se manifiestan en un mayor contenido de HUFA en las especies marinas, dado que las especies marinas tienden a depositar los ácidos grasos obtenidos de la dieta en los tejidos, mientras que las segundas, tienden a sintetizar solo la cantidad de ácidos grasos necesaria para satisfacer sus necesidades fisiológicas a corto plazo (Tocher, 2003). En general, las especies marinas son una fuente importante de HUFA n-3 comparadas con especies de agua dulce, las cuales con ricas en PUFA n-6 y ARA (Steffens, 1997a). Además, es necesario considerar que la capacidad de síntesis de ácidos grasos y/o actividad de las enzimas involucradas disminuye conforme aumenta la edad de los organismos,

por lo tanto, es variable en las diferentes etapas del ciclo de vida (Tocher, 2008). Asimismo, si la proporción de HUFA n-3:n-6 en la dieta no es adecuada para la especie y/o etapa del ciclo de vida se puede promover una competencia entre las enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos (Henderson *et al.,* 1987; Tocher, 2003; Aguilar y Mendoza, 2004).

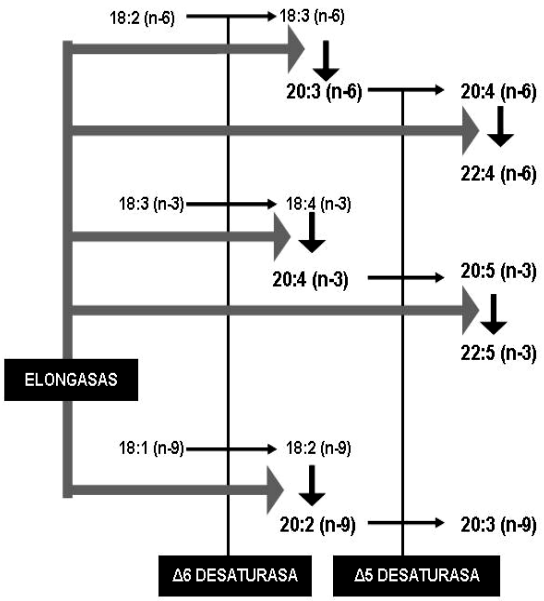

FIGURA 2. Ruta de síntesis de ácidos grasos en peces (Sargent *et al.,* 1995b).

Los juveniles y pre-adultos de especies marinas requieren del 0.5 al 2.5% de HUFA n-3 (peso seco) en la dieta, mientras que las larvas y posiblemente los reproductores requieren del 1.0 al 5.0% (peso seco). Sin embargo, los requerimientos de ARA en dichas especies han sido vagamente definidos, estimándose alrededor del 0.2 al 0.3% en la dieta (peso seco). Las especies dulceacuícolas de zonas templadas requieren 0.5 al 1.0% de 18:3n-3 y 18:2n-6 (peso seco) en la dieta, presentando por

lo general mayor requerimiento de 18:3n-3; mientras que las especies de zonas tropicales presentan el patrón opuesto (Tocher, 2008).

Las deficiencias de HUFA particularmente en los fosfolípidos de membranas pueden manifestarse en nula o deficiente actividad reproductiva, alteraciones visuales, neuropatías, cardiopatías, desarrollo y/o crecimiento lento, coagulación sanguínea deficiente, alta mortalidad, reacciones inflamatorias, hipersensibilidad, hígado graso y baja respuesta inmune, entre otros (Ako *et al.,* 1991; Evans, *et al.,* 1995; Harrel y Woods*,* 1995; De Silva *et al.,* 1997; Dhert *et al.,* 1999; De Pablo y Álvarez, 2000; Om *et al.,* 2003). Por lo tanto, se ha propuesto que si los HUFA no están presentes de forma natural en el alimento vivo utilizado en la acuicultura, como es el rotífero (*Brachionus plicatilis*) y la artemia (*Artemia* spp.), una alternativa para proveer a los organismos de tales ácidos grasos es el enriquecimiento del alimento vivo con niveles adecuados de HUFA n-3 y n-6 de acuerdo a los requerimientos para la especie durante los diferentes estadios de su ciclo de vida (Sargent *et al.,* 1997; Copeman y Parrish, 2002). En este sentido, a pesar de que la artemia contiene niveles bajos de HUFA n-3 (6% EPA y trazas de DHA) y HUFA n-6 (1.2 a 1.6% ARA) y un contenido mayor de 18:1n-9, 18:3n-3, 18:2n-6, 16:1n-7, 16:0 y 16:1n-9 (Coutteau y Sorgeloos, 1997; Ruiz *et al.,* 2008) puede representar una excelente fuente de ácidos grasos y otros nutrientes a través de una gran variedad de técnicas de enriquecimiento que involucran la utilización de microalgas, dietas microencapsuladas, liposomas, levaduras y emulsiones de aceites marinos (Lavens y Sorgeloos, 1996; Coutteau y

Sorgeloos, 1997; Boersma y Stelzer, 2000; Kolkovski *et al.,* 2000; Olsen *et al.,*2000; Han *et al.,* 2005; Villalta *et al.,* 2005; Palmtag *et al.,* 2006)**.**

1.2 Importancia de los HUFA n-3 y n-6 en la reproducción

En especies como la lubina europea (*Dicentrachus labrax*) (Bell *et al.,* 1997b; Asturiano *et al.,* 2001), el halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) (Bruce *et al.,* 1993), la trucha arcoiris (*Onchorhynchus mykiss*) (Agius *et al.,* 2001), la dorada (*Sparus aurata*) (Fernández *et al.,* 1995; Rodríguez *et al.,* 1998), el ayu (*Plecoglossus altivelis*), la carpa (*Cyprinus carpio*), el pez cebra (*Danio rerio*) y el pez dorado (*Carassius* spp.) ha sido documentado el efecto de la composición ácidos grasos de la dieta sobre la regulación endocrina y la calidad de los desoves (Meinelt *et al.,* 1999; Van der Kraak y Biddiscombe, 1999). En general, los requerimientos de HUFA n-3 y n-6 en la dieta de los organismos aumentan durante la maduración de las gónadas y la gametogénesis, afectando la fecundidad, la calidad del desove, la supervivencia y el crecimiento de las larvas (Abi ayad *et al.,* 1997; Asturiano *et al.,* 2001; Izquierdo *et al.,* 2001). Las deficiencias de HUFA n-3 y n-6 se manifiestan como una inhibición de la síntesis y/o secreción de gonadotropinas y esteroides, mayor número de atresias, baja fecundidad y/o volumen de esperma, bajas tasas de fertilización y eclosión, así como elevadas tasas de mortalidad larvaria, entre otros (Navas *et al.,* 1997).

En los machos de peces teleósteos se ha observado que el contenido de HUFA en la dieta influye sobre la duración del período de espermiación, la concentración y el

volumen del esperma, entre otros (Ciereszko, 2008), reportándose un alto contenido de fosfatidilcolina (PC, 26 a 55%) y fosfatidiletanolamina (PE, 22 a 66%), fuentes ricas en DHA; en las gónadas y gametos de machos de los peces marinos. Sin embargo, en las gónadas de los machos de la lubina europea (*D. labrax*), el salmón chinook (*Oncorhynchus tsawytscha*) y el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) se han registrado niveles mayores de fosfatidilserina (PS, 65 a 72%) y PE (10 a 17%) y menores de PC (3 a 10%) (Bell *et al*., 1997a). Las deficiencias de HUFA en la dieta de los machos de trucha arcoiris (*O. mykiss*) se manifiestan en baja motilidad de los espermatozoides, la cual a su vez reduce la tasa de fertilización, afectando las tasas de oculación y eclosión (Agius *et al.,* 2001). Son pocos los estudios que reportan el efecto del ARA sobre la actividad reproductiva y/o calidad del esperma de los machos de peces teleósteos, sin embargo se ha observado la presencia de ARA y/o prostaglandinas de la serie 2 (PG_2) y varios tipos fosfolipasas tipo A (PLAs) en el tracto reproductivo de machos de insectos, peces, reptiles, aves y mamíferos (Evans, 1998; Masuda *et al.,* 2004). Además, se ha descrito la alta sensibilidad de las glándulas olfativas de machos del pez dorado (*Carassius carassius, C. aureatus*), el pez lobo (*Misgurnus anguillicaudatus*), la trucha café (*Salmo trutta*), el pez blanco (*Coregonus clepeaformis*), la trucha arcoiris (*O. mykiss*), el salmón del Atlántico (*S. salar*) y la trucha alpina (*Salvelinus alpinus*) por la $PGF_{2\alpha}$ liberada en la orina de hembras maduras, estimulando mayores niveles de testosterona y 11-ketotestosterona en los machos y mayor producción de esperma, lo que a su vez, aumenta la probabilidad de sincronización de los desoves y el éxito de fertilización de

los huevos (Bjerselius y Olsen,1993; Asturiano *et al.,* 2001; Moore *et al.,* 2002; Laberge y Hara, 2003).

La mayoría de los estudios se han enfocado en los efectos de los ácidos grasos en la dieta de las hembras, las cuales por lo general, presentan requerimientos de HUFA mayores a los machos para la maduración gonádica y la vitelogénesis. La vitelogénesis involucra la formación de vitelogenina, proceso mediado por el nivel de esteroides en el plasma mediante el cual lípidos, vitaminas, hormonas, ARN y proteínas (fosvitinas, lipovitelinas) son transportados a través del plasma para su incorporación a las gónadas, y finalmente a los ovocitos (Arukwe y Goksoyr, 2003). Durante dicho proceso, los HUFA son incorporados en los fosfolípidos del vitelo, mientras que ácidos grasos saturados y monoinsaturados son almacenados en triglicéridos y esteroles esterificados de las gotas lipídicas de los ovocitos (Coutteau y Sorgeloos, 1997) afectando directamente la calidad de la progenie (Bell *et al.,* 1985). Los ácidos grasos saturados y monoinsaturados de los lípidos de reserva proveerán a la larva de los nutrientes y energía necesarios durante el desarrollo lecitotrófico (Sargent *et al.,* 1993; Evans *et al.,* 1995; Fernández *et al.,* 1995; Izquierdo *et al.,* 2001); período en el cual, el sistema digestivo de la larva madura, permitiendo a larva obtener su primera alimentación exógena (Booth *et al.,* 1999) antes de que el saco vitelino se haya agotado casi por completo (Jobling, 1995). En etapas juvenil y adulta, los lípidos de reserva serán el principal almacén de energía para la maduración sexual y la gametogénesis (Mazorra *et al.,* 2003). En contraste, la función de los fosfolípidos del vitelo es altamente especifica en función de su contenido de ácidos

grasos; por ejemplo, la PC y la PE son las principales fuentes de DHA y EPA, ácidos grasos esenciales para el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso y ocular; mientras que el fosfatidilinositol (PI) y la PS son fuentes ricas de ARA para la síntesis de eicosanoides, el funcionamiento del sistema inmune y la osmorregulación (Chapelle, 1986; Mazorra *et al.,* 2003). Debido a ello, los fosfolípidos son conservados de manera selectiva durante todas las etapas del ciclo de vida de los organismos (Bell *et al.,* 1985; Bell *et al.,* 1986). Como consecuencia, no solo la cantidad de ácidos grasos en los lípidos disminuye a través del desarrollo embrionario y el período lecitotrófico sino que además, en cada especie la proporción de HUFA de los lípidos de reserva y fosfolípidos se modifica en función del medio ambiente (salinidad, temperatura, pH, etc.), la duración del período de incubación, entre otros.

En especies con períodos de incubación prolongados como la trucha café (*S. trutta*), la trucha fontana (*Salvelinus fontinalis*), el salmón rey (*Oncorhynchus nerka*), la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) y la perca blanca (*Morone americana*) con una duración de 88, 80, 75, 61 y 20 días respectivamente; el contenido de lípidos de reserva es alto (60% del total de ácidos grasos) respecto al contenido de fosfolípidos (<50%). En contraste, especies con períodos de incubación cortos como el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) y el carbonero (*Pollachius virens*) de 9 y 14 días; presentan un contenido alto de fosfolípidos (60 a 80% del total de ácidos grasos) y un bajo contenido de lípidos de reserva (2 al 20%). Asimismo, la utilización de los lípidos de reserva y fosfolípidos se modifica en función de la zona geográfica y hábitos alimenticios de las especies. Por ejemplo, las especies tropicales presentan altas

tasas metabólicas y por lo tanto, períodos de incubación más cortos comparado a las especies templadas, lo que implica que las primeras presentan una rápida utilización de ácidos grasos y otros nutrientes para la generación de tejido y en adultos, un acelerado crecimiento de las gónadas y desarrollo de gametos (Acharia *et al.,* 2000). En especies marinas carnívoras, los requerimientos de DHA son altos para el rápido desarrollo del sistema nervioso y ocular indispensable para la captura de presas antes de la reabsorción del saco vitelino (Sargent *et al.,* 1993, Jobling, 1995; Brodtkorb, 1997).

1.3 Importancia del ARA en la dieta

La mayoría de los estudios referentes al efecto del ARA sobre el desempeño de los reproductores y/o la calidad de la progenie se han enfocado a especies marinas de regiones templadas, las cuales por lo general, presentan bajos requerimientos de ARA en la dieta (Tabla I). El ARA es acumulado en mayor proporción en la posición sn-2 del PI de los tejidos de los organismos adultos y los desoves, un proceso bien documentado en mamíferos y descrito en especies como el lenguado (*Psetta maxima*), el pez perro (*Scyliorhinus canicula*) y la trucha arcoiris (*O. mykiss*) (Salze *et al.,* 2005; Bell *et al.,* 2006). El ARA modula la síntesis y liberación de esteroides y es el principal precursor biológico de las PG_2 y otros eicosanoides (Castell *et al.,* 1994; Estévez *et al.,* 1997; Stanley, 2000), afectando indirectamente procesos como la actividad de cromatóforos, la respuesta al estrés, la ovulación, la inducción al desove, la osmorregulación, la respuesta inmune, la actividad del hipotálamo y la hipófisis en diversas especies de peces, aves y mamíferos (Lands, 1991) y en último término, el

crecimiento, la supervivencia de los organismos (Estévez *et al.,* 1997; Bransden *et al.,* 2005a,b; Van Anholt *et al.,* 2004a, b y c). La mayoría de los estudios describen efectos positivos del 1 al 1.8% ARA (total de ácidos grasos) sobre el crecimiento, respuesta al estrés por manejo y supervivencia de las larvas de especies nórdicas como la lubina europea (*D. labrax*), mientras que en otras como el rodaballo (*S. maximus*) se ha observado que el ARA estimula una mayor susceptibilidad al estrés, un proceso mediado por el incremento de eicosanoides, importantes promotores en la síntesis de cortisol (Bell y Sargent, 2003). En juveniles de rodaballo (*S. maximus*) se ha observado un efecto benéfico del ARA (1% total de ácidos grasos de la dieta) sobre el crecimiento y la supervivencia comparado a lo observado en organismos alimentados con dietas ricas en DHA (1% total de ácidos grasos) (Castell *et al.,* 1994); siendo suficiente un nivel de 0.78% de ARA (peso seco) en la dieta para estimular un aumento del nivel de ARA en el PI y síntesis de PG_2 en cerebro, corazón, branquias y riñones (Bell *et al.,* 1995).

En organismos adultos, se ha observado la influencia del ARA sobre el crecimiento, la actividad reproductiva y la calidad de los gametos. Por ejemplo, machos de lubina europea (*D. labrax*) alimentados con 0.4 y 1.4% de ARA (total de ácidos grasos) presentaron mayor volumen de esperma y altas tasas de fertilización, mientras que los organismos alimentados con 4.9% de ARA (total de ácidos grasos) presentaron incremento de peso comparado con los machos alimentados con niveles menores de ARA (Asturiano *et al.,* 2001). Asimismo, se ha reportado que 0.4% de ARA (total de ácidos grasos) en la dieta del salmón del Atlántico (*S. salar)* puede modular la

tolerancia a cambios de salinidad al inducir cambios en la cantidad de ARA y $PGF_{2\alpha}$, así como en la proporción ARA/EPA de los fosfolípidos de las branquias de los organismos próximos a migrar a ambientes salinos (Tocher *et al.,* 2000) mientras que los efectos de ARA en especies dulceacuícolas tropicales son aún escasos, sin embargo en adultos la tilapia (*Oreochromis mossambicus*), se ha observado que el estrés por confinamiento (24 horas) posterior a la alimentación con 3% ARA (total de ácidos grasos) estimuló un nivel mayor de este ácido graso en las branquias y los riñones, así como una disminución significativa en la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa y un incremento en los niveles de cortisol en el plasma (Van Anholt *et al.,* 2004b y c).

En especies como la dorada (*S. aurata*), dos especies de pez conejo (*Siganus guttatus, S. canaliculatus*), la trucha coral (*Plectropomus leopardus*), el pez dorado (*C. carassius* y *C. auratus*) y diversas especies de carpas (*Labio rohita, L. calbasu, Catla catla,* y *C. cirrhinusmrigala*) se han registrado niveles altos de ARA (5 al 10%, total de ácidos grasos) (Ackman *et al.,* 2002; Ogata *et al.,* 2003) comparados con especies marinas de zonas templadas. El suplemento de 18:2n-6 o ARA en la dieta de las tilapias (*O. mossambicus* y *O. niloticus*) (El Sayed *et al.,* 2005) el pez cebra (*D. rerio*), el pez cola dos puntas de espada (*Xiphophorus helleri*) y el bagre asiático (*Clarias batrachus*) (Acharia *et al.,* 2000) ha mostrado efectos benéficos sobre el desempeño en cultivo de los organismos (Tabla I); mientras que en las especies marinas de zonas frías o templadas, niveles bajos de ARA (1 al 3%) en la dieta inducen respuestas a nivel reproductivo. Por ejemplo, en folículos ováricos *in vitro* de lubina europea (*D. labrax*) se observó que 100 a 300 μM de ARA estimula la

maduración de los ovocitos de forma dosis-dependiente, aún en presencia de quinacrina, un inhibidor de la hormona gonadotropina (GnH), lo cual sugiriere que el ARA estimula la maduración de los ovocitos a través de la síntesis de eicosanoides (Sorbera *et al.,* 2001). En especies marinas de zonas tropicales como el pargo (*Lutjanus argentimaculatus)* se ha observado un menor nivel de ARA (3.2 a 4% , total de ácidos grasos) en las gónadas de hembras cultivadas alimentadas con una dieta comercial (Ogata *et al.,* 2004) comparado al nivel de ARA (10.4% total de ácidos grasos) reportado en las gónadas de hembras cultivadas alimentadas con peces y calamar en las cuales se presentaron mayores tasas de crecimiento y supervivencia de la progenie, sugiriendo la importancia de este ácido graso en la reproducción y la calidad del desove en particular, en especies tropicales (Emata *et al.,* 2003).

Tabla I. Estudios del efecto del ARA en peces teleósteos

Nombre común	Especie	Etapa	ARA en dieta	Efecto	Autor
Marino					
Lenguado	*Paralichthys olivaceus*	Larva	2.5, 5, 7.5, 10 g kg^{-1}	metamorfosis, pigmentación eicosanoides	Estevez et al., 1997
Dorada	*Sparus aurata*	Larva	0.1 a 1.8%*	crecimiento y supervivencia	Bessonart et al., 1999
Rodaballo	*Scophthalmus maximus*	Larva	1, 2, 3, 4, 8 %*	crecimiento, supervivencia y pigmentación	Estevez et al., 1999
Lubina	*Morone saxatilis*	Larva	3 a 21% mg g^{-1}*	tolerancia salina y respuesta inmune	Harel et al., 2001
Dorada	*S. aurata*	Larva	0.8 a 5 mg g^{-1}	crecimiento, supervivencia, estrés	Koven et al., 2001
Limanda	*Limanda ferruginea*	Larva	0.7,1.2, 2.2 y 7.1%	crecimiento, supervivencia, pigmentación	Copeman et al., 2002
Dorada	*S. aurata*	Larva	0.6, 3.4 y 5.9 mg g^{-1}*	supervivencia, crecimiento, estrés por manejo	Koven et al., 2003
Trompetero	*Latris lineada*	Larva	1, 3, 6, 8 y 11 mg g^{-1}	síntesis de PG_2	Bransden et al., 2004
Dorada	*S. aurata*	Larva	1.5 y 7.5 mg g^{-1}*	osmorregulación, estrés salino	Van Anholt, 2004.
Bacalao	*Gadus morhua*	Larva	0.3, 0.4 y 0.5 mg g^{-1}	pigmentación y PG_2	Bransden et al., 2005a
Lenguado	*Solea senegalensis*	Larva	1.3, 68 y 120 mg g^{-1}*	supervivencia, pigmentación	Villalta et al., 2005
Lenguado	*Solea solea*	Larva	0.8 a 12.2 mg g^{-1}*	supervivencia, crecimiento, pigmentación	Lund et al., 2007
Lenguado	*S. solea*	Larva	0, 8, 16 y 24%	respuesta estrés	Lund et al., 2008
Lenguado	*Paralichthys dentatus*	Larva	0, 3 ,6, 9, 12%	crecimiento, supervivencia, estrés salino	Willey et al., 2003
Lenguado	*Paralichthys olivaceus*	Larva	0, 0.1 0.6, 1.2%	fecundidad, calidad desove	Furuita et al., 2003
Rodaballo	*S. maximus*	Juvenil	0.3 a 1%	crecimiento, composición ácidos grasos	Castell et al., 1994
Dorada	*S. aurata*	Juvenil	3.9, 7.6, 11.2%	crecimiento y perfil de ácidos grasos	Fountoulaki et al., 2003
Lubina europea	*Dicentrarchus labrax*	Adulto	1.3 y 4.8 mg g^{-1}	contenido y composición en desoves	Bell et al., 1997b
Lubina europea	*D. labrax*	Adulto	100 a 300 Mm	maduración folículos ováricos in Vitro	Sorbera et al., 2001
Halibut	*Hippoglossus hippoglossus*	Adulto	0.4 a 1.8%	capacidad reproductiva y calidad desoves	Mazorra et al., 2003
Gurrubata	*Micropogonias undulatus*	Adulto	1, 10 y 100 µM	maduración folículos ováricos *in vitro* PG_2	Patiño et al., 2003
Medregal	*Seriola quinqueradiata*	Adulto	--------	metabolismo de PI en tejidos	Tanaka et al., 2003
Anádromas					
Trucha arcoiris	*Oncorhynchus mykiss*	Juvenil	5.7 a 22.8 µM	osmorregulación	Beckman y Mustafa,1992
Salmón	*Salmo salar*	Juvenil	0.2 a 0.5%	osmorregulación, contenido fosfolípidos	Tocher et al., 2000
Dulceacuícolas					
Pez dorado	*Carassius aureatus*	Adulto	10^{-5} a 10^{-4} M	síntesis de esteroides	Van der Kraak y Chang 1990
Pez dorado	*C. aureatus*	Adulto	6 a 400 µM	síntesis PGE_2 y esteroides *in Vitro*	Mercure y Van Der K., 1996
Tilapia	*Oreochromis mossambicus*	Adulto	0.7 y 3%	respuesta al estrés	Van Anholt et al., 2004
Guppie	*Poecilia reticulata*	Adulto	12.5, 25, 37.5 y 50 mg g^{-1}	respuesta inmune ante infección bacteriana	Goldberg et al., 2006

*Contenido de ARA (%, mg g^{-1}) en dieta expresado en peso seco. Datos en proporciones consideran contenido total de ácidos grasos en alimento comercial o alimento vivo enriquecido con emulsiones comercial.

1.4 Eicosanoides y prostaglandinas

Los eicosanoides son un grupo de hormonas y/o lípidos bioactivos sintetizados a partir de ácidos grasos de 20 carbonos (20:3n-6, 20:5n-3 y 20:4n-6) que participan en la respuesta inmune, la reproducción y los procesos inflamatorios (Bell *et al.,* 2006). Entre los eicosanoides de mayor importancia biológica se encuentran las prostaglandinas (PG), un grupo de hormonas de amplio espectro que han sido descritas en diversas especies de corales, algas, plantas, invertebrados y vertebrados. El tipo de PG sintetizada (PGE, PGD, PGF, etc.) y su serie (PGE_1, PGE_2, etc.) varía de acuerdo al ácido graso precursor y a los cambios de metilación u oxidación de sus cadenas de carbono. La síntesis de PG se inicia con la liberación del ácido graso, por ejemplo ARA o EPA, de la posición n-2 en los fosfolípidos que integran las membranas plasmáticas por la actividad de la fosfolipasa A tipo 2 (PLA_2), dejándolos disponibles para la actividad de ciclooxigenasas (COX_1 y COX_2) y PG sintetasas especificas en el retículo endoplasmático, dando origen a por lo menos 16 subtipos diferentes de PG (Tessier *et al.,* 1996; Calder y Miles, 2000; Elmes *et al.,* 2005), que son transportadas a través del plasma (segundos a minutos) a receptores de membrana específicos, donde son activas a bajas concentraciones (10^{11} mol l^{-1}) (Ruggeri y Thoroughgood, 1985) siendo capaces de estimular procesos de transcripción genética (Stanley, 2000; Nobel *et al.,* 2001; Jabbour *et al.,* 2006). El efecto de las PG varía de acuerdo a su tipo y serie, su concentración en los tejidos (Stanley, 2000), el estado fisiológico de los organismos, la interacción con otros procesos, la especie, el sexo, el estadio del ciclo de vida, entre otros (Fernández *et*

al., 1995). Asimismo, se ha reportado que la proporción de fosfolípidos, y por tanto, la proporción de HUFA n-3:n-6 afectan el tipo de PG que se sintetiza; y por lo tanto, se ha sugerido que la composición de ácidos grasos en la dieta afecta la síntesis de PG. (Cheng *et al.,* 2005).

1.5 Las PG de la serie 2 y su efecto sobre la reproducción

Las PG_2 son derivadas a partir del ARA (Fig. 3) (Bell *et al.,* 1986) en todas las células (excepto glóbulos rojos) de una gran diversidad de invertebrados y vertebrados terrestres, marinos y dulceacuícolas (Ruggeri y Thoroughgood, 1985). Las PG_2 son moduladoras la respuesta inmune (Bell *et al.,* 1986; Tocher, 1995; Stanley, 2000; Smith y Murphy, 2002) en contraste, con las PG de la serie 3 (PG_3), sintetizadas a partir del EPA, consideradas moduladores depresivos de la respuesta inmune y los procesos inflamatorios en una gran diversidad de invertebrados y vertebrados acuáticos y terrestres (Sánchez y Talamás, 2002; Tahara y Yano, 2003; Matlhagela y Taub, 2006; Elmes *et al.,* 2005). Sin embargo, el principal función de las PG_2 es modular la actividad reproductiva de los organismos (Jabbour *et al.,* 2006), actuando sobre la maduración del folículo ovárico, la actividad de la hipófisis, el hipotálamo y la glándula pineal (Anton y Randall, 1987), la contracción de los músculos del útero (Cheng *et al.,* 2005), la secreción de esperma, la síntesis de hormonas esteroidales, el desarrollo de las gónadas, la ovulación y el desove. La función de las PG_2 a nivel reproductivo ha sido mayormente entendida en mamíferos superiores en los que se ha observado que gonadotropinas como la hormona leutinizante (LH) estimulan la expresión de las enzimas involucradas en las síntesis de PG_2 en el tejido gonádico,

las cuales a su vez, estimulan el rompimiento del folículo ovárico, promoviendo la liberación del ovocito. Dicho proceso, involucra la actividad de proteínas ADRP (adipose differentiation-related protein, por sus siglas en inglés) las cuales se asocian a gotas lipídicas ricas en ARA facilitando su transporte en las membranas celulares y dejándolo disponible para ser utilizado en la síntesis de PG_2 en las células de la granulosa, en donde modulan la síntesis de progesterona y la permeabilidad del tejido vascular a gonadotropinas presentes en el torrente sanguíneo (Seachord *et al.,* 2005). Asimismo, se ha observado que el estradiol (E_2) estimula la síntesis de PG_2 previo a la luteólisis (Goff, 2004) modulando la actividad de los receptores de las prostaglandinas (EP) durante la contracción y el relajamiento del tejido gonádico en el parto (Schmitz *et al.,* 2006); mientras que la función de las PG_2 en la actividad reproductiva de los machos ha sido poco estudiada, sin embargo, tanto las enzimas involucradas en su síntesis como la presencia de proteínas ADRP han sido descritas en espermatogonias, túbulos seminíferos y testículos; lo que sugiere que las PG participan de manera importante en la liberación de los gametos masculinos.

En los peces, las PG_2 actúan sobre el cerebro, induciendo el desove en las hembras y la síntesis de andrógenos en los machos (Stacey y Goetz, 1982; Liley y Stacey, 1983; Liley y Tan, 1984; Mercure y Van Der Kraak, 1996; Asturiano *et al.,* 2000). En el atún de aleta azul (*Thunnus* spp.) y el salmón coho (*Onchorynchus kisutch*) se ha registrado la presencia de PG_2 en los testículos y el semen (Bell *et al.,* 1986) y la estimulación de la síntesis de testosterona (T) en cultivos de tejido gonádico *in vitro* de machos de pez dorado (*C. aureatus*) en presencia de 25 a 400 µM de ARA (Wade

et al., 1994, Wade y Van der Kraak, 1996). Asimismo, se ha reportado la actividad de las PG_2 como feromonas en el pez dorado (*C. auratus*) y el salmón del Atlántico (*S. salar*), estimulando la sincronización del desove y por ende, el éxito reproductivo de estas especies (Moore *et al.,* 2002). En machos de lubina europea (*D. labrax*) se ha observado un incremento de PGE_2 en relación al contenido de ARA y EPA en las gónadas *in vitro*, siendo que la síntesis de PGE_2 a partir del ARA fue 26.4% mayor que con EPA, observándose un efecto inhibidor del DHA sobre la síntesis de PGE (Asturiano *et al.,* 2000).

En las hembras, las PG_2 son esenciales para la maduración y la ovulación, observándose que los niveles más bajos de ARA coinciden con los estadios finales de maduración de los ovarios y la etapa previa al desove (Booth *et al.,* 1999). Algunos de los primeros estudios que evaluaron el efecto de las PG_2 en hembras de peces teleósteos fueron realizados por Stacey (1976) quien reportó que las inyecciones de $PGF_{2\alpha}$ (5 µg g^{-1}) inducían la respuesta al desove en hembras no grávidas del pez dorado (*C. auratus*).

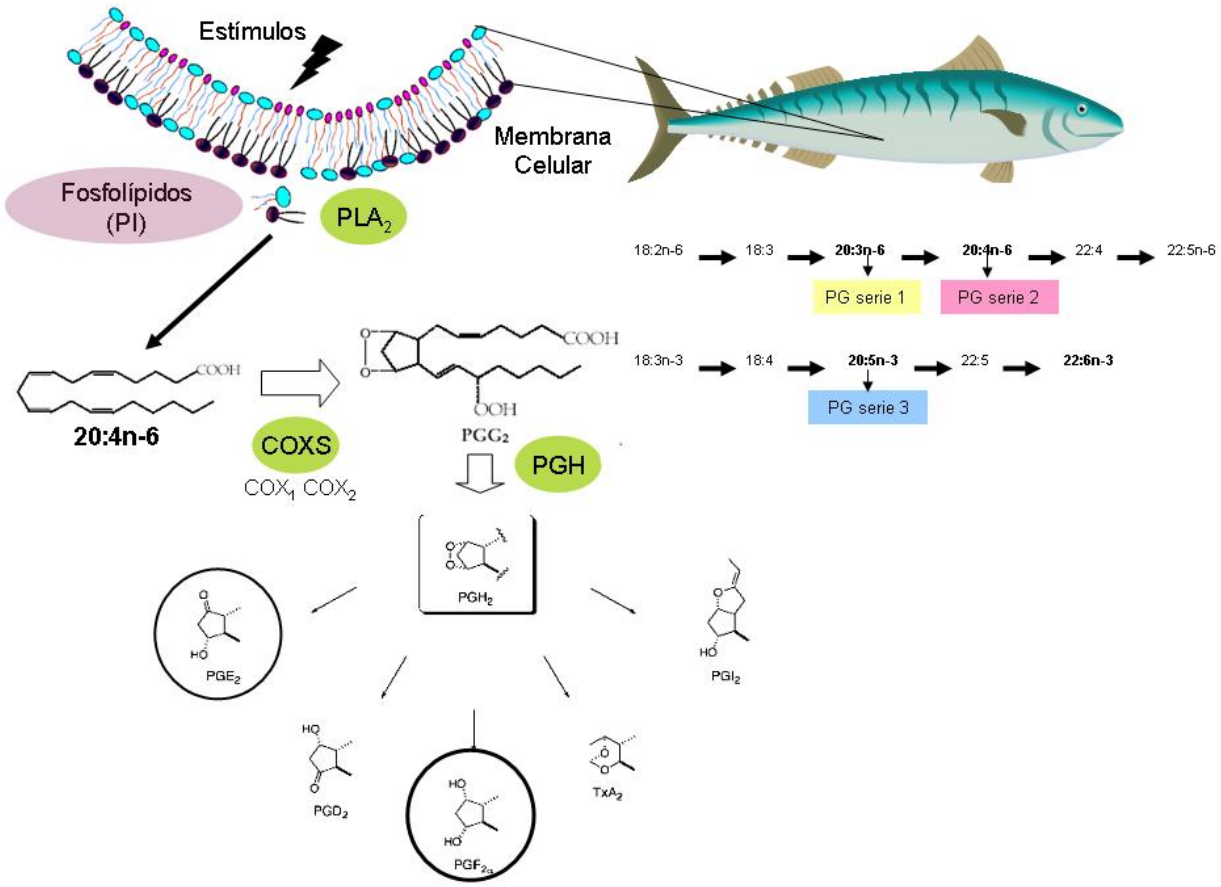

FIGURA 3. Ruta de síntesis de las prostaglandinas (PG) y tromboxanos (TX) a partir del ARA (20:4n-6) (Bell *et al.*, 1986; Rouzer y Marnett, 2005).

Tabla II. Estudios de prostaglandinas de la serie 2 en peces teleósteos.

Nombre común	Especie	Sexo	Prostaglandina	Efecto	Autor
Marinos					
Lenguado senegalés	*Solea solea*	---	PGE_2	pigmentación	Lund et al., 2008
Bacalao	*Gadus morhua*	---	PGE_2 $PGF_{2\alpha}$	cardiovascular	Stenslokken et al., 2005
Lubina europea	*Dicentrarchus labrax*	---	PGE_2, $PGF_{2\alpha}$	respuesta inmune	Mourente et al., 2005
Bacalao	*G. morhua*	---	PGF	respuesta inmune	Bell et al., 2006
Rodaballo	*Scophthalmus maximus*	---	$PGE_{1,2,3}$	metabolismo	Bell et al., 1995
Dorada	*Sparus aurata*	---	PGE_2 PGE_3	metabolismo	Ganga et al., 2005
Rodaballo	*S.*	---	PGE y PGF	metabolismo	Bell *et al.,* 1994
Abadejo	*Sebastes caurinus*	---	PGE_2	metabolismo	Busby et al., 2002
Lubina europea	*D. labrax*	♀	PG_2	ovulación	Sorbera et al., 2001
Pez lobo japonés	*Misgurnus anguillicaudatus*	♀	PGE	ovulación	Ogata et al., 1979
Halibut	*Paralichthys olivaceus*	♂	PGE_2, $PGF_{2\alpha}$	contenido en semen	Nomura et al., 1973
Atún común	*Thunnus thynnus*	♂	PGE_2, $PGF_{2\alpha}$	contenido en semen	Nomura et al., 1973
Lubina europea	*D. labrax*	♂	PGEs	regulación GnH	Asturiano et al., 2000
Catadromos					
Anguilla común	*Anguilla anguilla*	---	PGE_2	sistema digestivo	Faggio et al., 2000
Anadromos					
Trucha arcoiris	*Oncorhynchus mykiss*	--	PGE_2	respuesta inmune	Knight et al., 1995
Trucha Dolly	*Salvelinus fontinalis*	♀	PG_2	metabolismo	Hsu y Goetz, 1993
Trucha arcoiris	*O. mykiss*	---	$PGF_{2\alpha}$	metabolismo	Ghioni et al., 2002
Salmón del Atlántico	*Salmo salar*	---	$PGF_{2\alpha}$	metabolismo	Ghioni et al., 2002
Trucha salmonada	*Salmo fontinalis*	♀	PGE y PGF	ovulación	Cetta y Goetz, 1982
Trucha salmonada	*S. fontinalis*	♀	PGE y PGF	ovulación	Goetz et al., 1988
Trucha salmonada	*S. fontinalis*	♀	PGE y PGF	ovulación	Goetz et al., 1991
Salmón keta	*Oncorhynchus keta*	♂	PGE_2, $PGF_{2\alpha}$	contenido en semen	Nomura et al., 1973
Trucha arcoiris	*O. mykiss*	♂	PGE_2, $PGF_{2\alpha}$	activación esperma	Kowalsky et al., 2008

TABLA II. Continuación

Dulceacuícolas					
Tilapia mosambica	*Tilapia mossambica*	♂	PGE_2 $PGF_{2\alpha}PGI_2$	metabolismo	Bandyopadhyay et al., 1982
Carpa común	*Cyprinus carpio*	♂	$PGF_{2\alpha}PGI_2$	metabolismo	Bandyopadhyay et al., 1982
Bagre	*Heteropneustes fossilis*	♂	$PGF_{2\alpha}PGI_2$	metabolismo	Bandyopadhyay et al., 1982
Bagre asiático	*Clarias batrichus*	♂		metabolismo	Bandyopadhyay et al., 1982
Pez dorado	*Carassius aureatus*	♂	$PGE_{1,2}$, PGI_2	metabolismo	Goetz, 1993
Pez dorado	*C. aureatus*	♀	$PGF_{2\alpha}$	ovulación	Stacey, 1976
Pez dorado	*C. aureatus*	♀	PGFs	ovulación	Bouffard, 1979
Barbo plateado	*Puntius gonionotus*	♀	$PGF_{2\alpha}$	ovulación	Liley y Tan, 1984
Pez dorado	*C. aureatus*	♀♂	$PGF_{2\alpha,}kPGF_{2\alpha}$	ovulación	Sorensen et al., 1988
Guppy	*Poecilia reticulata*	♀	PGE_2, $PGF_{2\alpha}$	ovulación	Venkatesh et al.,1992
Perca amarilla	*Perca flavescens*	♀	PGE PGF	ovulación	Goetz, 1997
Pez dorado	*Carassius* spp.	♀	$PGF_{2\alpha}$	feromonas	Sorensen, 1992
Pez dorado	*Carassius* spp.	♂	$PGE_{1,2,3,}$	síntesis esteroides	Wade et al., 1994

Posteriormente, en el bagre (*Heteropneustes fossilis*) se reportó que la administración exógena diaria de PGE_2 o $PGF_{2\alpha}$ (100mg pez^{-1} con 41 a 47g de peso corporal) resultó en ovulaciones del 97% después de 5-6 días de tratamiento, mientras que en la trucha arcoiris (*S. gardneri*) se ha reportado inducción final a la maduración *in vitro* por $PGF_{2\alpha}$ (Jalabert y Szöllösi, 1975; Jalabert, 1976). Otros estudios han demostrado la importancia de las PG_2 sobre el control de la ovulación y el desove en diversas especies de peces como la carpa (*Jordanella floridae*), la tilapia (*Aequidens portalegrensis*) y el pez paraíso (*Macropodus opercularis*) (Hoar *et al.,* 1983; Liley y Tan, 1984). Asimismo, se ha descrito que el suministro de inhibidores de PG_2, tales como la endometacina, inhibe la síntesis de esteroides, la ovulación y el desove en peces y mamíferos (Bell *et al.,* 1986).

2. ESPECIE DE ESTUDIO

2.1 Familia Atherinopsidae

Los atherinópsidos están representados por 13 géneros y cerca de 170 especies que se distribuyen en ambientes marinos, salobres y dulceacuícolas de zonas tropicales, subtropicales y templadas (Miller, 2004). Los atherinópsidos dulceacuícolas se distribuyen en lagos y ríos de Australia, Madagascar, Argentina, Bolivia, Chile, México, Perú, Uruguay, Brasil, etc. (Dyer, 1996; Moyle *et al.,* 1999). Algunos de los atherinópsidos dulceacuícolas de mayor importancia económica pertenecen a los géneros *Chirostoma* spp. (*Menidia* spp.) y *Odontesthes* spp. (Fig. 4).

FIGURA 4. Distribución mundial de la familia Atherinopsidae.

En México, la familia Atherinopsidae está representada por los peces blancos y los charales (*Menidia* spp.) (Tabla III), especies endémicas de la Mesa Central del país, (Miller, 2004), cuyo origen data del Pleistoceno a partir de un ancestro común marino (Barbour, 1973).

Tabla III. Atherinópsidos en México (Blancas *et al.,* 2003, 2004; Miller, 2004).

Especie	Talla (mm)	Distribución	Hábitat	Reproducción
M. colei	42	Quintana Roo, Yucatán	marino (64 ppt) salobre	-
Membras martinica	102	New York hasta Campeche	marino, salobre	primavera-verano
M. peninsulae	96	Florida hasta Veracruz	marino, salobre	primavera-verano
M. beryllina	125	Florida hasta Veracruz	marino dulceacuícola	primavera-verano
M. alchichica	790	Puebla	salobre dulceacuícola	-
Atherinella alvarezi	79	Cam.,Chis., QRoo.,Tab., Ver.	salobre dulceacuícola	julio a febrero
A. crystallina	81	Jal.,, Nay., Sin., Son.,	salobre dulceacuícola	-
A. guatemalensis	81	Guatemala, Chis., Gro., Oax., Mich.,	salobre dulceacuícola	-
A. ammophila	74	Veracruz	dulceacuícola	-
A. balsana	65	Gro.,, Mex., Mich., Mor., Pue	dulceacuícola	-
A. callida	55	Veracruz	dulceacuícola	-
A. lisa	45	Veracruz	dulceacuícola	-
A. marvelae	95	Oaxaca, Veracruz	dulceacuícola	-
A. sallei	76	Oaxaca, Veracruz	dulceacuícola	-
A. schultzi	64	Cam., Chis., Oax., Ver.	dulceacuícola	-
Menidia aculeata	109	Michoacán, Jalisco	dulceacuícola	-
M. arge	690	Ags., Gto.,Jal., Mich.	dulceacuícola	-
M. attenuata	1200	Michoacán	dulceacuícola	enero a septiembre
M. bartoni	810	Guanajuato	dulceacuícola	-
M. chapalae	93	Jalisco, Michoacán	dulceacuícola	-
M. charari	65	Michoacán	dulceacuícola	-
M. consocia	2180	Michoacán	dulceacuícola	abril?
M. contrerasi	76	Jalisco	dulceacuícola	-
M. estor	4000	Jalisco, Michoacán	dulceacuícola	marzo a julio febrero a julio
M. ferdebueni	76	Puebla	dulceacuícola	-
M. grandocule	170	Michoacán	dulceacuícola	-
M. humboldtianum	2500	Edo. Mex., Jal., Nay., Mich.	dulceacuícola cultivo	marzo a agosto abril a junio
M. jordani	91	Edo. Mex., Mich., Jal.,Gto., Pue., Hgo., Tlax.	dulceacuícola	febrero?
M. labarca	121	Jalisco, Michoacán	dulceacuícola	-
M. lucius	3050	Jalisco, Michoacán	dulceacuícola	-
M. melanoccus	65	Michoacán	dulceacuícola	-
M. patzcuaro	104	Michoacán	dulceacuícola	-
M. promelas	170	Jalisco, Michoacán	dulceacuícola	-
M. riojai	83	Edo. Mex., Michoacán	dulceacuícola	-

2.2 El pez blanco de Pátzcuaro (*Menidia estor*)

El pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) es una especie endémica de Michoacán (Miller, 2004), en donde representa una de los principales recursos pesqueros cuyas poblaciones naturales han sido reducidas significativamente por la sobrepesca, la introducción de especies exóticas, la contaminación y la reducción del volumen de agua del embalse, lo cual se ha reflejado en su elevado costo en el mercado local y regional (250 pesos kg^{-1}) (Ross y Martínez, 2005; Martínez Palacios *et al.,* 2008) (Fig. 5).

Figura 5. Pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

El pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) es un organismo carente de estómago, con dientes faríngeos y branquiespinas ornamentadas diseñadas para hábitos zooplanctófagos, cuyo tracto digestivo en etapas juvenil y adulta es característico de un pez carnívoro que se alimenta ocasionalmente de peces y crustáceos pequeños (Martínez Palacios *et al.,* 2002; Martínez Palacios *et al.,* 2008). Algunos estudios han descrito los requerimientos de proteínas (400 g kg^{-1}), vitamina C (93 mg kg^{-1}) y

carbohidratos (150 g kg^{-1}) en la dieta de juveniles de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) cultivados (Martínez Palacios *et al.,* 2008).

2.3 Biología reproductiva

Existen pocos estudios sobre la biología reproductiva del pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*), sin embargo es posible que la determinación del sexo sea afectada por factores ambientales como la temperatura, como se ha descrito en el pez blanco del Atlántico (*Menidia menidia*) (Conover *et al.,* 1992). Durante la última década, la especie ha sido sujeta a programas de reproducción, lográndose cerrar su ciclo de vida en condiciones de cultivo (Martínez Palacios *et al.,* 2004). Más tarde, Martínez Palacios *et al*. (2007) reportaron que fotoperiodos largos (24L:0O y 18L:60) estimulan un mayor fecundidad y número de desoves en reproductores cultivados de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*), reportando resultados similares en reproductores cultivados del pez blanco de Chapala (*Menidia promelas*). El pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) alcanza la talla de primera madurez sexual (12 a 15 cm, LT) durante el primer año de vida, sin presentar dimorfismo sexual (Guzmán Arroyo, 1995). Algunos autores han reportado que especies como el pez blanco del Atlántico (*M. menidia)* y el pez blanco *(Menidia beryllina)* presentan hibridación en su ambiente natural, un fenómeno escasamente descrito en atherinópsidos dulceacuícolas. El pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) es una especie ovípara que presenta desoves múltiples (Martínez Palacios *et al.,* 2007), cuya temporada reproductiva va de marzo a junio en su hábitat natural (Miller, 2004), y que en condiciones de cultivo produce de 200 a 500 huevos por desove. Los huevos presentan un diámetro de 0.9 a 1.2

mm, presentando de 6 a 8 hilos adherentes y un período de incubación de 7 a 8 días, dependiendo de los factores ambientales (Martínez Palacios *et al.,* 2002), lo cual coincide con lo reportado para otras especies dulceacuícolas como el pejerrey (*Odontesthes regia regia*) y el pez blanco (*Chirostoma humboldtianum*), en las cuales el desarrollo de los ovocitos es asincrónico y los huevos pueden ser pelágicos o presentar filamentos adherentes (Blancas *et al.,* 2004; Alfaro *et al.,* 2006). En condiciones de cultivo, el pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) presenta mejores tasas de eclosión, supervivencia y crecimiento de las larvas (4.5 a 5 mm, LT) en salinidades de 5 a 10 psu y una temperatura de 25±1˚C (Martínez *et al.,* 2004), las cuales presentan un período lecitotrófico no mayor a tres días (Martínez Palacios *et al.,* 2002). Sin embargo, en condiciones de cultivo la especie presenta en general baja tasa de fertilización, eclosión y supervivencia de las crías. Debido a lo anterior, estudios previos analizaron el perfil de ácidos grasos en diversos tejidos y desoves de organismos silvestres y cultivados, observándose un bajo nivel de EPA (1 al 3% de ácidos grasos totales) en gónadas, hígado y tejido adiposo de reproductores silvestres y cultivados, posiblemente debido a su utilización como precursor de DHA o fuente energética durante la temporada reproductiva (Palacios *et al.,* 2007). Asimismo, se observó un alto contenido de DHA (20 al 30% de ácidos grasos totales) en el cerebro y el tejido hepático de los adultos (Aparicio, 2004) coincidiendo con el alto nivel de DHA (30% de ácidos grasos totales) en los lípidos neutros (60%) y los fosfolípidos (40%) de los desoves (huevo y larva) de organismos cultivados (Palacios *et al.,* 2007). Dicho nivel de DHA (30% de ácidos grasos totales) fue observado en larvas de 20 días alimentadas con nauplios de artemia (*Artemia franciscana*)

enriquecida con *Chlorella* spp. (<1% DHA), lo que sugiere que existe una capacidad de síntesis de este ácido graso en esta especie (Martínez Palacios *et al*., 2008). En relación al ARA, se observaron niveles bajos (4% de ácidos grasos totales) en los desoves de organismos cultivados, en comparación con el nivel de ARA (9% de ácidos grasos totales) de los desoves de las poblaciones silvestres (Palacios *et al.,* 2007). Esta diferencia se observó aún considerando que los reproductores cultivados fueron alimentados con una dieta comercial que contenía un nivel mayor de 18:2n-6 (3.5%) en comparación al nivel de 18:2n-6 (2%) del zooplancton (2003 a 2004) del hábitat natural de la especie, sugiriendo que los reproductores cultivados pudieran presentar un mayor requerimiento de ARA en la dieta debido a condiciones de estrés inherentes al cultivo y/o a la temporada reproductiva (Palacios *et al.,* 2007).

3. JUSTIFICACIÓN

La acuicultura sustenta más del 30% de la producción pesquera a nivel mundial, pero la mayoría de los estudios sobre la fisiología reproductiva y calidad del desove se han enfocado a especies marinas como la dorada (*S. aurata*), el rodaballo (*S. maximus*), el bacalao (*G. morhua*) y especies anádromas como los salmónidos; importantes fuentes de proteína y HUFA n-3, cuyas poblaciones silvestres se han reducido drásticamente por su creciente demanda en el mercado mundial. Surge así la necesidad de evaluar el potencial acuícola de otras especies, como los atherinópsidos dulceacuícolas de los géneros *Chirostoma* (*Menidia* spp.) y *Odontesthes* spp., importantes recursos económicas de pesquerías artesanales dulceacuícolas de algunas regiones de México y Argentina y a su vez, fuentes ricas de de ácidos grasos para la población. En particular, el pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) presenta un alto contenido de HUFA n-3 (20 al 30%). La tecnología de cultivo para esta especie se ha desarrollado durante la última década y se ha comenzado con la transferencia tecnológica para la creación de granjas piloto. Sin embargo, los organismos cultivados presentan una alta frecuencia de obstrucción del orificio genital en las hembras, desincronización de los desoves y un volumen escaso de semen en los machos, así como bajas tasas de fertilización, eclosión y supervivencia de las larvas.

Debido a ello, resulta primordial identificar los factores que influyen sobre la capacidad reproductiva y la calidad de los gametos de los organismos cultivados, con el fin de producir una mayor cantidad de organismos al menor costo durante la mayor parte del año. Estudios previos reportaron un bajo nivel de ARA (4%) en los desoves de organismos cultivados respecto al nivel de ARA (9%) observado en los desoves de poblaciones silvestres, dada la importancia del ARA en la reproducción, dicha deficiencia de ARA en los reproductores cultivados podría estar relacionada a los problemas reproductivos y la baja calidad de la progenie reportados. En este trabajo de investigación se ofrecerán diferentes niveles de ARA en la dieta para modificar la composición de ácidos grasos en los fosfolípidos y/o lípidos de reserva de los huevos y la síntesis de PGE_2 y subsecuentemente, evaluar la capacidad reproductiva y la calidad del desove de la especie en condiciones de cultivo.

4. HIPÓTESIS

1. El suplemento de ARA en la dieta de los reproductores cultivados de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*): a) aumentará el nivel de dicho ácido graso en las gónadas y otros tejidos, a valores cercanos a lo reportado en organismos silvestres (9% ARA) estimulando una mayor actividad y/o capacidad reproductiva de los organismos; y b) dejará disponible ARA para su transferencia a los fosfolípidos de esperma y huevo, en donde será componente estructural para el desarrollo, promoviendo la viabilidad, la fertilización y la concentración espermática.

2. Dicho suplemento de ARA en la dieta de los reproductores cultivados de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) estimulará la síntesis de PGE_2 en las gónadas, incrementado la sincronización de los desoves, la producción de esperma y por lo tanto, el éxito de fertilización. Asimismo, niveles mayores de PGE_2 estimularán un mayor número de desoves al inducir la contracción en las gónadas de las hembras, por lo que la frecuencia de desoves producidos será mayor en hembras alimentadas con un mayor suplemento de ARA en la dieta.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Analizar el efecto de alimentar reproductores cultivados de pez blanco de Pátzcuaro *(M. estor*) con artemia adulta (*A. franciscana*) enriquecida con ARA (3%, 4% y 7%) sobre la capacidad reproductiva, el contenido de PGE_2 y la calidad del desove.

5.2 Objetivos particulares

1. Evaluar la calidad del desove de los reproductores cultivados de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) alimentados con artemia adulta (*A. franciscana*) enriquecida con ARA (3%, 4% y 7 %) con base en la composición de ácidos grasos en los lípidos de reserva y membranas de los huevos, el tamaño de la gota lipídica, el diámetro de los huevos, la tasa de fertilización, la tasa de eclosión, la concentración espermática y el tamaño de larvas recién eclosionadas.

2. Evaluar la capacidad reproductiva del pez blanco de Pátzcuaro *(M. estor*) alimentado con artemia adulta (*A. franciscana*) enriquecida con diferente nivel de ARA (3%, 4% y 7%) con base en la ganancia de peso, número y tamaño de desoves, índice gonadosomático, índice hepatosomático, composición bioquímica y contenido de PGE_2 en las gónadas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*)

Se usaron reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) de dos años de edad (36.2±1.0g) cultivados por el Laboratorio de Acuicultura de Especies Nativas del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán (Fig. 6A). El experimento se llevó a cabo en un período de 90 días (noviembre 2007 a febrero 2008) en las instalaciones del IIAF, Morelia, Mich. Los organismos fueron mantenidos en ayuno por 24 horas antes de ser anestesiados con benzocaína (30 mg L^{-1}) y sexados mediante presión abdominal, diferenciando machos por liberación de esperma y hembras por dilatación de la papila genital respectivamente (Fig. 6B). Posteriormente, se colectaron datos de longitud total (LT, cm) y longitud patrón (LP, cm) con un ictiometro (30 cm); así como el peso (g) de cada organismo utilizando una balanza *Scout Pro*® SP202. Los organismos se mantuvieron en agua dulce (0 psu), temperatura ambiente (17±1˚C) y aireación constante por un período de 10 a 15 minutos para su recuperación de la anestesia en tanques de plástico (100 L) que se dejaban flotar en el interior del tanque experimental correspondiente.

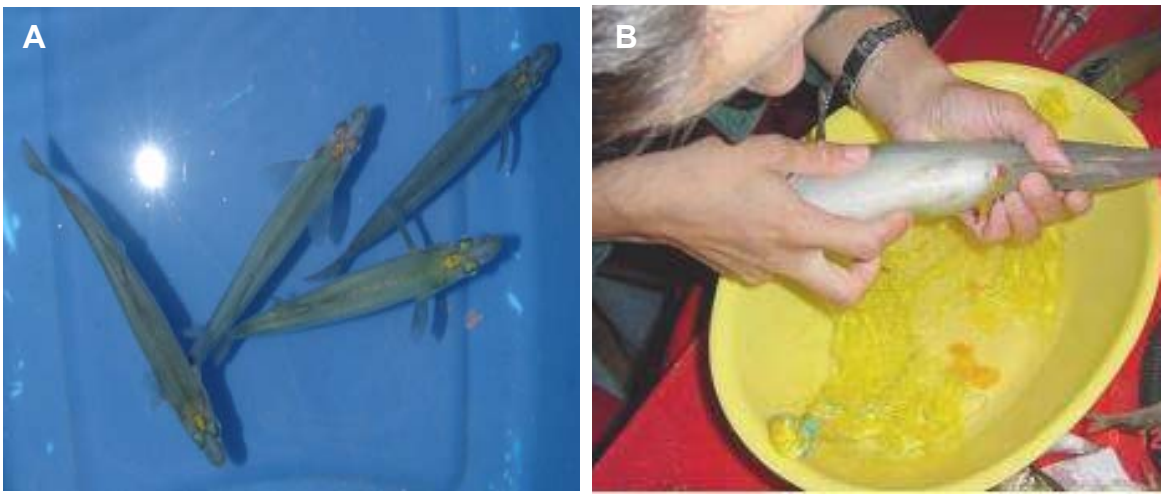

FIGURA 6. A. Reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) de 2 años de edad. **B.** Sexado de reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

6.1.1 Aclimatación de los reproductores al sistema experimental

Durante la primera semana de aclimatación los organismos fueron expuestos a un cambio lento (48 h) de salinidad (0 a 5 psu) para prevenir la infección por hongos y reducir el efecto del estrés por manejo (Martínez *et al.,* 2004), manteniendo a los organismos en tales condiciones durante 5 días, posteriores a los cuales fueron aclimatados de forma paulatina (48 h) a una salinidad de 0 psu. Durante el período de acondicionamiento (15 días) los reproductores fueron aclimatados a las condiciones de calidad de agua descritas en la Tabla VII y alimentados con una mezcla de alimento comercial (2:1, *Purina*® y *Azoo*®) (3% pez día^{-1}) suministrada 3 veces al día y artemia adulta (*A. franciscana*) (1% pez día^{-1}). Durante dicho período de aclimatación, antes de iniciar la alimentación de los reproductores con artemia adulta (*A. franciscana*) enriquecida con ARA (3%, 4% y 7% ARA), se obtuvieron muestras de desoves (3 réplicas/trat) (50mg±30%) para el análisis de ácidos grasos (Tabla

XIII), las cuales fueron almacenadas, procesadas y analizadas de acuerdo a como se describe posteriormente.

6.2 Sistema experimental

Los reproductores se mantuvieron en tanques circulares (3000 L) de lámina de acero con agua dulce (0 psu), una temperatura promedio de 17±1˚C y fotoperiodo de 18L: 60, utilizando lámparas de luz blanca fría de 70 watts (*General Electric*®, *Circuilight* 22), las cuales eran activadas automáticamente con un temporizador digital de 125V (*IPSA®,* TE102, 60Hz). El sistema experimental consistió de 3 tratamientos, cada uno de los cuales consistió de 3 réplicas de un grupo de 7 hembras y 14 machos (1♀:2♂).

6.3 Alimentación

Los reproductores fueron alimentados con una mezcla de pellet comercial (2:1 *Purina*® y *Azoo*®) considerando el 3% de la biomasa de los organismos (g pez día^{-1}) suministrada tres veces al día. La composición proximal y de ácidos grasos de los alimentos peletizados al inicio (2 semanas) y al final del período experimental (8 semanas) (Anexo 1) se muestran en las Tablas IV y V, respectivamente.

Tabla IV. Composición proximal (%) de los alimentos peletizados.

Parámetro (%)	Azoo	Purina
Humedad	5.09±0.02	5.98±0.01
Proteína	52.09±0.67	50.33±0.27
Grasa	3.48±0.36	10.20±0.09
Cenizas	9.87±0.01	7.64±0.52
Extracto libre de Nitrógeno	29.47±0.07	25.83±0.35
Total	**100**	**100**

Adicionalmente, los reproductores fueron alimentados con artemia adulta (*A. franciscana, Salt Creek*®) enriquecida durante 18 horas con diferentes emulsiones de ARA (0%, 3% y 16%). La artemia adulta enriquecida (3%, 4% y 7% ARA) (Tabla VI) fue suministrada una vez al día considerando el 1% biomasa de los organismos (g pez día^{-1}). El método para el enriquecimiento y el análisis de ácidos grasos de las emulsiones experimentales y de la artemia adulta (*A. franciscana*) enriquecida durante diferentes períodos de tiempo se muestra en el Anexo 2.

Tabla V. Proporción de ácidos grasos (%) de los alimentos peletizados.

Acido graso	**Azoo**		**Purina**	
	2 semanas	8 semanas	2 semanas	8 semanas
14:0	1.87±0.6	2.68±0.06	5.59±0.06	5.88±0.82
16:0	17.99±0.10	19.54±0.10	21.91±0.10	21.60±0.02
18:0	3.37±0.02	5.34±0.14	5.88±0.04	5.83±0.12
20:0	0.28±0.005	0.22±0.01	0.37±0.001	0.37±0.01
22:0	0.29±0.01	0.26±0.01	0.35±0.00	0.35±0.01
24:0	1.04±0.01	1.76±0.01	1.46±0.01	1.45±0.02
16:1n-9	2.40±0.09	3.35±0.20	7.99±0.05	8.14±0.11
18:1n-9	18.91±0.10	14.03±0.13	15.17±0.04	14.91±0.04
18:1n-7	1.75±0.004	2.66±0.02	2.35±0.004	2.34±0.02
20:1n-11	0.61±0.01	0.78±0.02	0.50±0.01	0.51±0.01
24:1n-9	0.31±0.002	0.62±0.04	0.40±0.01	0.39±0.002
18:2n-6	34.8±0.20	22.13±0.12	16.42±0.22	16.14±0.27
18:3n-3	3.24±0.02	2.08±0.05	1.83±0.02	1.74±0.02
18:4n-6	0.53±0.02	0.59±0.03	1.40±0.01	1.46±0.02
20:4n-6	0.53±0.01	1.19±0.01	1.35±0.02	1.36±0.02
20:5n-3	3.83±0.07	5.44±0.09	6.96±0.04	7.56±0.13
22:6n-3	5.48±0.06	12.86±0.16	4.67±0.02	4.61±0.06
Σ SAT.	25.43±0.01	31.00±0.22	36.80±0.11	36.72±0.08
Σ MUFA	25.35±0.20	23.43±0.28	28.88±0.04	28.78±0.12
Σ PUFA	49.22±0.20	45.57±0.39	34.32±0.15	34.50±0.17
(n-3)/(n-6)	0.34±0.002	0.81±0.01	0.64±0.01	0.68±0.02
22:6/20:5	1.43±0.04	2.37±0.03	0.67±0.002	0.61±0.003

Tabla VI. Proporción de ácidos grasos (%) de la artemia adulta (*A. franciscana*) enriquecida con tres emulsiones con diferentes niveles de ARA (0%, 3% y 16%) durante 18 horas.

Ácido graso	0% ARA	3% ARA	16% ARA
14:0	0.76±0.07	0.86±0.08	0.99±0.15
16:0	9.34±0.23	10.06±0.25	10.27±0.87
18:0	5.92±0.23	6.14±0.24	6.44±0.51
20:0	0.17±0.03	0.14±0.009	0.16±0.02
22:0	0.20±0.04	0.18±0.01	0.20±0.03
24:0	0.11±0.02	0.09±0.009	0.13±0.03
16:1n-9	3.37±0.21	3.72±0.20	4.05±0.54
16:1n-7	1.31±0.05	1.26±0.07	1.20±0.08
17:1n-8	1.34±0.07	1.53±0.05	1.67±0.13
18:1n-9	32.39±0.52	30.72±0.86	28.63±1.96
18:1n-7	8.19±0.07	8.52±0.31	8.10±0.19
20:1n-11	0.28±0.05	0.23±0.03	0.31±0.04
24:1n-9	0.42±0.15	0.45±0.16	0.32±0.11
18:2n-6	18.09±0.21	15.88±0.29	15.25±1.29
18:3n-6	0.27±0.02	0.36±0.028	0.52±0.12
18:3n-3	8.43±0.44	8.98±0.89	8.34±0.49
18:4n-6	0.49±0.05	0.55±0.04	0.52±0.03
20:4n-6	**2.86±0.21**	**3.93±0.39**	**6.57±1.96**
20:5n-3	2.64±0.17	2.86±0.31	2.67±0.24
22:4n-6	0.42±0.13	0.20±0.04	0.26±0.16
22:6n-3	0.06±0.01	0.06±0.01	0.07±0.02
Σ SAT.	18.88±0.63	20.18±0.15	20.98±1.83
Σ MUFA	47.72±0.21	46.87±0.65	44.63±1.57
Σ PUFA	33.39±0.75	32.95±0.77	34.39±1.02
(n-3)/(n-6)	0.50±0.03	0.57±0.05	0.48±0.04
22:6/20:5	0.02±0.01	0.02±0.007	0.03±0.01

6.4 Calidad de agua

La calidad del agua de los tanques experimentales (3000 L) de los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) fue monitoreada cada 8 días utilizando un equipo *Hach*® para determinar la concentración de amonio y nitratos (mg L^{-1}) considerando alícuotas de 10 ml por unidad experimental (3 réplicas/trat) para cada parámetro fisicoquímico, siendo todas las alícuotas tomadas a la misma profundidad y a la misma hora del día durante cada muestreo. El pH fue evaluado con un potenciómetro

(*Fisher Scientific*®) y el oxígeno disuelto (mg L^{-1}) con un oxímetro (*YSI*®). Adicionalmente, se registró la salinidad (psu) utilizando un refractómetro (*Atago*®). Finalmente, la temperatura (°C) del sistema fue monitoreada 6 veces al día en intervalos de 2 horas (8am a 6pm) con un termómetro (*Brannan*®). Los valores promedio de los parámetros de calidad de agua del sistema experimental evaluados durante el experimento (70 días) se muestran en la Tabla VII. No se observaron diferencias significativas entre los tres tratamientos.

Tabla VII. Parámetros de calidad de agua del sistema experimental.

Parámetro	3% ARA	4% ARA	7% ARA	P<0.05
Temperatura (˚C)	17.10±0.04	17.02±0.04	17.08±0.04	N.S.
Oxígeno (mg L^{-1})	7.40±0.04	7.30±0.07	7.40±0.02	N.S.
pH	7.60±0.03	7.50±0.04	7.50±0.03	N.S.
Amonio (mg L^{-1})	0.00±0.00	0.01±0.004	0.00±0.02	N.S.
Nitratos (mg L^{-1})	0.08±0.01	0.12±0.02	0.12±0.02	N.S.

Las diferencias entre los parámetros de calidad de agua se analizaron usando un análisis de varianza usando tiempo de muestreo como medida repetitiva. N.S.: no significativo (P<0.05).

6.5 Muestreos de los desoves

6.5.1 Colecta y obtención de muestras de los desoves

Durante la etapa experimental (noviembre del 2007 a febrero del 2008) se realizaron muestreos semanales (n=10) de cada unidad experimental (3 réplicas/trat) en los cuales se evaluó la calidad de los desoves y el número total de huevos producidos. Los desoves fueron colectados con sifones con malla (500 µm) y cepillos de cerdas suaves, concentrándolos en recipientes plásticos (2 L) con agua del sistema experimental (0 psu) para transferirlos a recipientes plásticos (2 L) con agua (5 psu), en donde eran mantenidos durante el proceso de limpieza y el conteo del número total de huevos (3 réplicas/ trat).

6.5.2 Número de desoves

El número total de desoves o grupos de desoves producidos en cada unidad experimental (3 réplicas/trat) a lo largo del experimento (70 días) fue estimado durante la limpieza diaria de las unidades experimentales, en las cuales era reportada la presencia o ausencia de huevos en el fondo del tanque experimental utilizando sifones con mallas y cepillos de cerda suave de acuerdo a lo previamente descrito.

6.5.3 Número de huevos producidos

Cada desove colectado en las unidades experimentales (3 réplicas/trat) era concentrado en vasos de precipitado de vidrio (500 ml), realizando el corte de los hilos adherentes de los huevos con bisturí y/o tijeras de disección en cajas de petri de vidrio, proceso durante el cual los huevos eran mantenidos en agua 5 psu con recambios periódicos de la misma. Durante el proceso de limpieza, se realizaba el conteo manual del número total de huevos colectados en cada unidad experimental (3 réplicas/trat/semana) (Fig. 7).

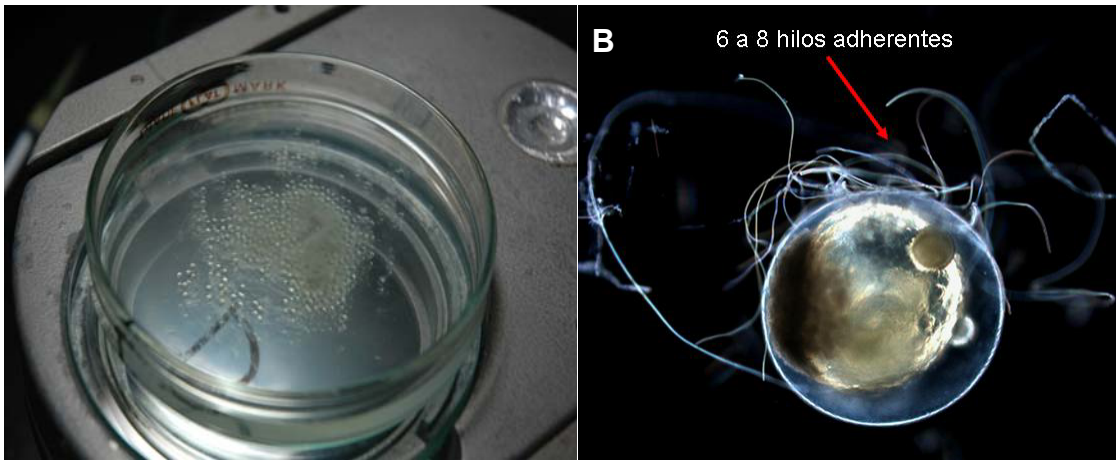

FIGURA 7. A. Huevos de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) colectados para su conteo. **B.** Huevo de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) donde se muestran de 6 a 8 hilos adherentes.

6.5.4 Tasa de fertilización

De los muestreos semanales (n=10), se obtuvieron muestras aleatorias de huevos (n=100) de cada unidad experimental (3 réplicas/trat) para la evaluación de la tasa de fertilización (%) utilizando un microcopio compuesto (4x, *Zeiss*®) para la evaluación de la presencia de divisiones celulares (fecundados) en relación al número total de huevos evaluados (n=100).

6.5.5 Obtención de muestras para el análisis de ácidos grasos

De los muestreos semanales (n=10), se obtuvieron muestras de huevos de cada unidad experimental (3 réplicas/trat) para el análisis de ácidos grasos (50mg±30%) utilizando una balanza (*Mettler Toledo PB153-S*). Las muestras de huevo fueron colectadas en viales de vidrio adicionando 6 ml de solución de Folch (2:1 cloroformo:metanol v/v), 10 µl de terbutil- hidroxitolueno (BHT) como antioxidante y 10 µl de C23:0 (*Sigma*®) como estándar interno para ser almacenadas a -20˚C hasta su análisis de acuerdo a lo descrito por Palacios et *al.* (2007).

6.5.6 Diámetro de los huevos y área de gota lipídica

De los muestreos semanales, se obtuvieron muestras aleatorias de huevos (n=35) para la evaluación del diámetro total (µm) y el área de las reservas lipídicas (μm^2), las cuales fueron fijadas en solución de Davidson (Tabla VIII), manteniéndolas a temperatura ambiente y oscuridad total hasta su análisis.

Tabla VIII. Composición general de la solución de Davidson.

Ingrediente	Cantidad (ml)
Alcohol etílico al 95%	330
Folmalina al 37%	220
Acido acético glacial	115
Agua 5 psu	335
Total	**1000**

Las muestras de huevos fueron lavadas de 3 a 5 veces con alcohol etílico al 70% para la obtención del diámetro total (µm) utilizando un microscopio de contraste de fases (4x, *Olympus*®) y el software *Sigma Scan Pro Plus*, versión 6.0 para la evaluación de las imágenes digitales (Fig. 8A). Posteriormente, las muestras de huevos fueron lavadas con alcohol al 70% por una hora y teñidas con Negro de Sudán (*Sigma*®) durante 2 a 3 horas, almacenándolas en agua destilada durante 24 horas previas a la obtención de las imágenes digitales utilizando un microscopio de contraste de fases (4x, *Olympus*®) y el software *Image Pro Plus* Versión 6.0 para realizar las mediciones correspondientes (Fig. 8B).

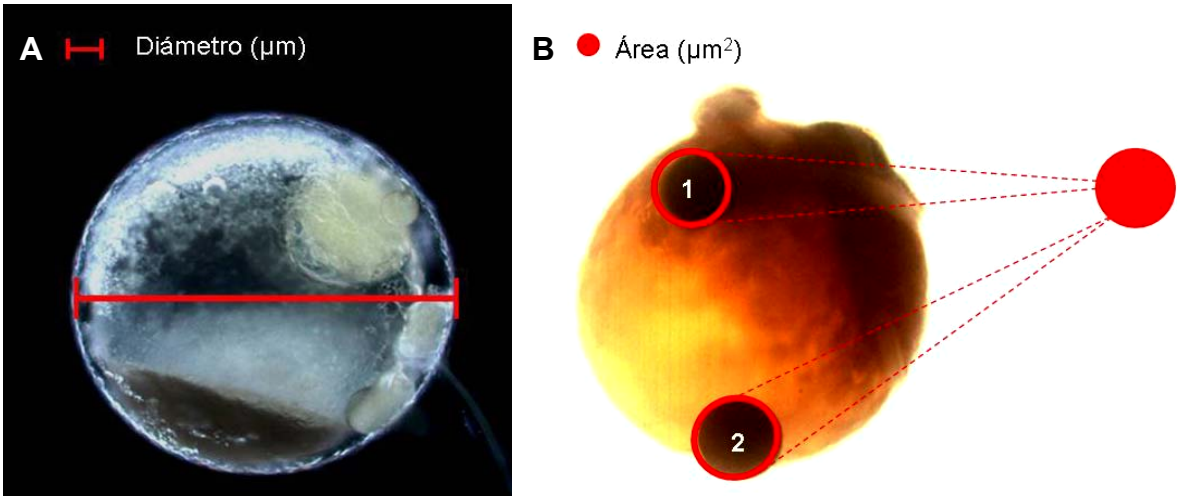

FIGURA 8. A. Diámetro de huevo fertilizado (48h) de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*). **B.** Área de gotas de lípidos teñidas con Negro de Sudán.

6.5.7 Tasa de eclosión

Posterior a la evaluación del número total de huevos, tasa de fertilización y la toma de muestras de los desoves obtenidos durante los muestreos semanales, los desoves fueron incubados de manera individual (3 réplicas/trat/semana) en incubadoras en forma de botella invertida (2 L) (Fig. 9) a temperatura ambiente, aireación constante, fotoperiodo natural (12L:12O) y salinidad de 10±2 psu para prevenir la infección por hongos del genero *Saprolegnia* spp. (Comas, 2001). Durante las 48 horas previas al término del período de incubación (día 7) la salinidad se redujo de forma gradual a 5 psu y una vez que las larvas eclosionaban, se realizó el conteo del número total de larvas eclosionadas utilizando un sifón de plástico para trasladar las larvas eclosionadas a contenedores de plástico (2 L) con agua (5 psu). La tasa de eclosión se estimó como el porcentaje de larvas eclosionadas respecto al número total de huevos por desove (3 réplicas/trat/semana). Posteriormente, se colectaron muestras de larvas recién eclosionadas (50mg±30%) para el análisis de la composición de ácidos grasos (n=35), así como muestras de larvas (n=35) para la evaluación de la longitud total (mm), las cuales eran almacenadas en solución de Davidson (Tabla VIII) a temperatura ambiente y total oscuridad hasta sus análisis.

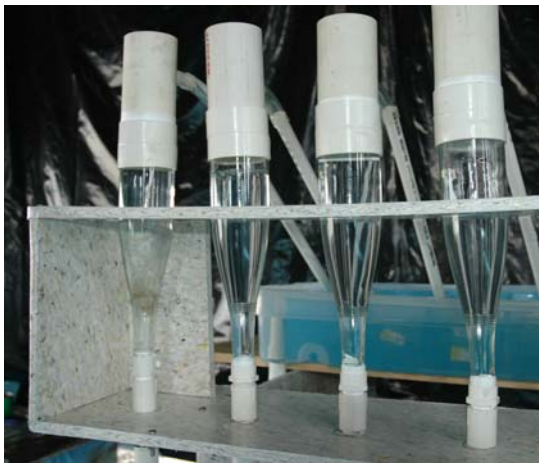

FIGURA 9. Incubadoras experimentales para los desoves de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

6.5.8 Longitud total de larvas recién eclosionadas

Las muestras de larvas recién eclosionadas obtenidas durante los muestreos semanales (n=10) fueron lavadas con agua destilada para capturar su imagen digital en un microscopio estereoscópico (1x, *Zeiss Carl*®), realizando las mediciones correspondientes con el software *Image Pro Plus* Versión 6.0.

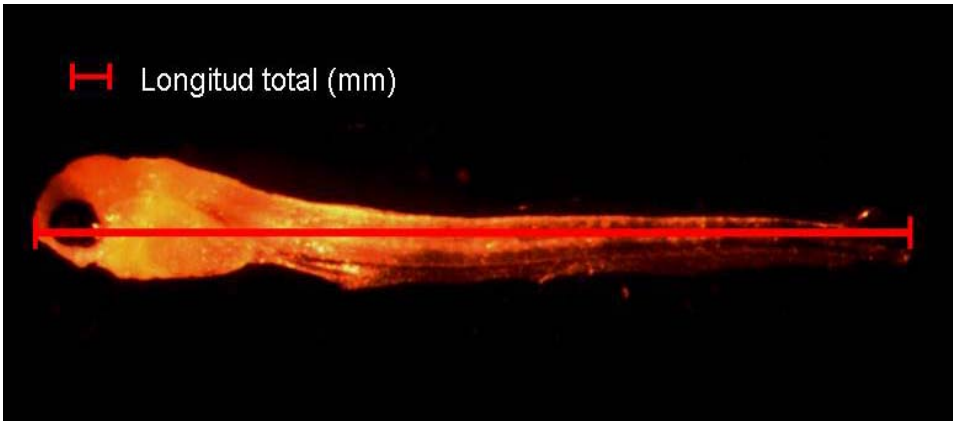

FIGURA 10. Larva (48h) de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) preservada en solución de Davidson.

6.5.9 Evaluación de la composición de ácidos grasos de los desoves

Las muestras de huevos colectadas (50mg±30%) durante los muestreos semanales (10 desoves/réplica/trat) se llevaron a temperatura ambiente para ser homogenizadas con varilla de vidrio y sonicadas (*Branson*® 2510) durante 15 minutos realizando la separación de las fracciones neutra y polar por elución diferencial en micro columnas empaquetadas con sílice hidratado al 6%, utilizando 10 ml de cloroformo:metanol (98:2 v/v) para la fracción neutra y 15 ml de metanol para la fracción polar de cada muestra (Palacios *et al.,* 2001; 2005). Todas las muestras fueron evaporadas a sequedad por medio de centrifugación al vacío y burbujeo de nitrógeno para ser trans-esterificadas con trifluoruro de boro al 14% en metanol (BF_3, *Supelco*®) a una temperatura de 85±1ºC durante 10 minutos. Posteriormente, todas las muestras se llevaron a temperatura ambiente para la eliminación de impurezas utilizando hexano (*J.T. Baker*®) y agua destilada, manteniéndolas a -20 ºC. Finalmente, el hexano fue separado de la fracción acuosa para analizar los metil esteres de ácidos grasos en un Cromatógrafo de gases con detector por ionización de flama (FID) (*Agilent*® 6890), utilizando una columna capilar de silica fundida (30m X 0.25µm X 0.25mm, *Supelco*®) y Helio como gas acarreador (0.7 ml min^{-1}) con una rampa de temperatura de 110 a 220°C. La identificación de los ácidos grasos se realizó por comparación del tiempo de retención con estándares comerciales (*Sigma*®) y la cuantificación por medio del estándar interno (23:0) de acuerdo a lo propuesto por Palacios *et al.* (2001).

6.6 Muestreo final de los reproductores

Los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) se mantuvieron en ayuno (24 h) previo al inicio del muestreo final (día 70). Los reproductores fueron anestesiados con benzocaína (30 mg L^{-1}) y sexados mediante presión abdominal diferenciando machos y hembras por la liberación de esperma y/o la dilatación de la papila genital respectivamente.

6.6.1 Muestreo de hembras

Las hembras de cada unidad experimental (6 a 7♀ /réplica) fueron anestesiadas con una sobredosis de benzocaína (90 mg L^{-1}) agregada directamente al agua. Se obtuvo la longitud total (LT, cm), la longitud patrón (LP, cm) y el peso total (Wg, g) de cada hembra utilizando una balanza (*Metter Toledo PB-153-S*). Posteriormente, fueron obtenidas muestras (1000mg±30%) de las gónadas, tejido adiposo, hígado y músculo, las cuales fueron almacenadas de inmediato en nitrógeno gaseoso y posteriormente a -80˚C hasta el análisis de los parámetros bioquímicos (proteínas, carbohidratos y lípidos totales), composición de ácidos grasos (50mg ±30%) y perfil de prostaglandina PGE_2 (300-500 mg) de un saco gonádico (S_2). Adicionalmente, se obtuvieron muestras de la zona posterior de uno de los sacos gonádicos (S_1), las cuales fueron almacenadas en solución de Davidson en las condiciones descritas previamente (Tabla VIII) para su posterior análisis histológico (Fig. 11).

6.6.2 Muestreo de machos

Los machos de cada unidad experimental (13 a 14♂/réplica) fueron anestesiados con benzocaína (30 mg L^{-1}) y subdivididos en 2 grupos de muestreo (grupos A y B). El primer grupo (grupo A) fue conformado por 6 machos elegidos al azar, los cuales fueron anestesiados con una sobredosis de benzocaína (90 mg L^{-1}) para realizar la biometría de cada organismo y obtener las muestras de tejido de acuerdo a lo descrito para el muestreo de las hembras, mientras que el segundo grupo (grupo B) fue utilizado para la evaluación de la concentración espermática de acuerdo a lo que se describe más adelante.

FIGURA 11. Obtención de muestras de tejido de reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

6.6.3 Ganancia de peso

La ganancia de peso (%) y/o proporción del la ganancia de peso de cada organismo (g) en un tiempo dado se calculó a partir de los datos de peso inicial (g) y peso final (g) de los organismos (♀ o ♂) de un tratamiento (T_1, T_2 o T_3) utilizando la fórmula propuesta por Utne (1979) (2):

$$\textbf{GP (\%)}= 100\ [(\text{Peso}_{final} - \text{Peso}_{inicial})/\ \text{Peso}_{inicial}]$$

Donde:

GP: Ganancia de peso en un tiempo dado (%).

Peso $_{final}$: Promedio de peso final (g) de organismos de un tratamiento (T_1, T_2 o T_3)

Peso $_{inicial}$: Promedio de peso inicial (g) de organismos de un tratamiento (T_1, T_2 o T_3)

6.6.4 Índice gonadosomático (IGS)

El IGS (%) y/o proporción del peso de las gónadas respecto al peso del organismo fue obtenido a partir de la sustracción del peso de ambos sacos gonádicos (g) al peso final (g) de cada organismo (día 70). Posteriormente, se aplicó la siguiente ecuación (3):

$$\textbf{IGS (\%)}= (\text{Peso}_{g}/\ \text{Peso}_{pez}) \times 100$$

Donde:

Peso$_g$: Peso total de ambos sacos gonádicos (g)

Peso$_{pez}$: Peso final del organismo – Peso total de ambos sacos gonádicos (g).

6.6.5 Índice hepatosomático (IHS)

El IHS (%) o proporción del peso del hígado respecto al peso del organismo se calculó a partir del peso final de cada organismo (día 70) y el peso del hígado (g) utilizando la ecuación (4):

$$\textbf{IHS (\%)}= (\text{Peso}_{h}/\ \text{Peso}_{pez}) \times 100$$

Peso h: Peso total del hígado (g)

Peso$_{pez}$: Peso final del organismo – Peso total de ambos sacos gonádicos (g).

6.6.6 Concentración espermática

Al final de la etapa experimental (día 70) un subgrupo de 6 machos (grupo B) de cada unidad experimental fue anestesiado con benzocaína (30 mg ml^{-1}), obteniendo la longitud total (cm) y la longitud patrón (cm) y el peso (g) de cada organismo. Las muestras de esperma se obtuvieron mediante presión abdominal y fueron colectadas en capilares de vidrio de 2 mm de diámetro. El volumen total de esperma (µl) se almacenó en tubos Eppendorf a -5˚C en total oscuridad, a partir de la cual se realizaron diluciones (1:500) utilizando una solución inhibidora de motilidad (Tabla IX). Las muestras se homogenizaron y se dejaron reposar durante 5 minutos, posteriores a los cuales cada muestra fue homogenizada antes de ser dividida en 2 submuestras por organismo (500 µl) para realizar el conteo del número total de espermatozoides (10^9 cel ml^{-1}) utilizando una cámara de Neubauer (hematocitómetro) en un microscopio compuesto (40x, Axioskop Z plus HAL 100 *Zeiss Carl*®).

Tabla IX. Composición de la solución inhibidora de la motilidad espermática.

Ingrediente	Cantidad
Bicarbonato de sodio	5.0 g
Formaldehído 37%	1.0 ml
Agua destilada	100 ml

Finalmente, la estimación de la concentración de células espermáticas (10^9 cel ml^{-1}) se determinó utilizando la ecuación (5).

$$\textbf{Concentración espermática} = (X_{cel})\ (10{,}000)\ (d)\ (2)$$

Donde:

$\mathbf{X_{cel}}$: Promedio del número espermatozoides observados (conteo)

d: Tasa de dilución (1:500).

6.7 Análisis bioquímico de gónadas

6.7.1 Procesamiento general de las muestras

Las gónadas de los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) (n=78) obtenidas durante el muestreo final (día 70) fueron disectadas sobre placas frías, pesadas (100mg±30%) para ser almacenadas de inmediato en tubos Eppendorf sellados a -80˚C. Posteriormente, las muestras fueron liofilizadas a -50˚C durante 24 horas, obteniéndose el peso seco de cada muestra. Las muestras fueron hidratadas con 1 ml de solución de cloruro de sodio al 0.9% (NaCl). Las muestras de las gónadas de las hembras fueron homogenizadas utilizando 0.20 g de arena estéril durante 2 períodos de agitación (40 s.) en un vórtex (*VWR*®) para ser almacenadas a -20˚C a medida que eran procesadas. Las muestras de gónadas de los machos fueron homogenizadas (15s.) utilizando un homogenizador (*Polytron Sentry*®) a temperatura ambiente para ser almacenadas a -20˚C a medida que fueron procesadas. Las muestras se procesaron de manera individual según el protocolo establecido para la determinación de proteínas, carbohidratos y lípidos totales**.** Los cálculos de la concentración final (mg ml^{-1}) se realizaron mediante la construcción de una curva estándar para cada parámetro bioquímico; utilizando la siguiente fórmula (6):

$$\textbf{Concentración}\ (\text{mg ml}^{-1}) = (\lambda\ \text{real}_m)\ (\text{FD}_n)/\ (y_{curva})\ (\text{Wgs}_m)$$

Donde:

λ real$_m$: Absorbancia $_{muestra}$ – absorbancia $_{testigo}$

FD$_n$: Factores de dilución (FD1, FD2, FD3)

y_{curva}: Pendiente de la curva de regresión obtenida a partir de concentraciones conocidas del estándar

Wgs_m: Peso seco (g) de la muestra

6.7.2 Carbohidratos

Las muestras de gónada (20mg±30%) homogenizadas en 1 ml de solución de cloruro de sodio al 0.9% (NaCl) se llevaron a temperatura ambiente para obtener submuestras de 100 µl, a las cuales se les adicionó 100 µl, de ácido tricloro acético al 20% (TCA) para ser centrifugadas a 3600 rpm a 5˚C (10 min.). Posteriormente, se obtuvieron alícuotas de sobrenadante de cada muestra (25 µl), las cuales se colocaron en microtubos de plástico individuales para adicionarles 250 µl de antrona (*Sigma*®), la cual fue preparada con 0.024 g de antrona disuelta en 24 ml de ácido sulfúrico al 96% (H_2SO_4) Las muestras se homogenizaron y se incubaron a 85˚C durante 10 minutos. Posteriormente, las muestras se mantuvieron en baño con hielo (3 min.), se homogenizaron para realizar la lectura de la absorbancia (λ) a 650 nm en un lector de placas (RVK *Revelation Thermolabsystem*® 11670). La curva estándar (8 puntos) se construyó utilizando 25 µl de diluciones seriales (1:2) realizadas a partir de una solución estándar de carbohidratos (*Aprotec*®) a una concentración de 2.50 mg ml^{-1}.

6.7.3 Lípidos totales

Las muestras de gónada (20mg±30%) homogenizadas en 1 ml de solución de cloruro de sodio al 0.9% (NaCl) se llevaron a temperatura ambiente para obtener submuestras de 20 µl para los machos y 10 µl para las hembras, las cuales se

colocaron en microtubos de plástico, para agregarles 200 µl de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Dichas muestras fueron homogenizadas e incubadas a 85˚C durante 10 minutos. Las muestras se mantuvieron en baño frío (5˚C) para detener la reacción. Posteriormente, se colectaron alícuotas de 20 µl de cada muestra en una microplaca para agregarles 200 µl de vainillina (*Health Hazard® EM Science*) y homogenizarlas en con un vórtex antes de ser incubadas a temperatura ambiente durante 40 minutos para realizar la lectura de la absorbancia (λ) a 540 nm utilizando un lector de placas *Biorad*® 505, 07872. La curva estándar (8 puntos) se construyó usando diluciones seriales (1:2) a partir de una solución de concentración conocida (10.0 mg ml^{-1}).

6.7.4 Proteínas totales

Las muestras de gónada (20mg±30%) homogenizadas en 1 ml de solución de cloruro de sodio al 0.9% (NaCl) se llevaron a temperatura ambiente, obteniéndose alícuota de 10 µl de cada muestra. A cada alícuota se le adicionaron 90 µl de solución de hidróxido de sodio 0.1M (NaOH) para ser homogenizadas con un vórtex e incubadas a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente, las muestras fueron homogenizadas con un vórtex para colectar alícuotas de 10 µl en una microplaca. A cada alícuota se le adicionó 1 ml del reactivo de Bradford (*Biorad*®). Finalmente, las muestras fueron homogenizadas con un vórtex para obtener la lectura de absorbancia (λ) a 595 nm utilizando un lector de placas (*Biorad*® 505, 07872). La

curva estándar (8 puntos) se construyó usando diluciones seriales (1:2) a partir de una solución de concentración conocida (2.0 mg ml^{-1}).

6.7.5 Ácidos grasos en gónadas

Las muestras de gónadas de los reproductores (♀, ♂) de pez blanco de Pátzcuaro (50 mg±30%) obtenidas durante el muestreo final (día 70) mantenidas a -80˚C durante 8 días, fueron pesadas en viales de vidrio con tapa de teflón utilizando una balanza (*Metter Toledo® PB153-S*), adicionando 6 ml de solución Folch (cloroformo metanol 2:1 v/v), 10 µl de BHT como antioxidante y 10 µl de C23:0 (20mg ml^{-1}) como estándar interno (*Sigma®*) a cada muestra para ser almacenadas a -20˚C hasta el análisis de la composición de ácidos grasos de acuerdo a lo descrito previamente para el análisis de la fracción neutra y la fracción polar de los desoves.

6.8 Análisis de PGE_2 en gónada

6.8.1 Purificación del tejido gonádico

Las muestras de gónada (S_2) de las hembras y machos destinadas para la evaluación del nivel de PGE_2 por inmunoensayo EIA (*Cayman Chemical®*) almacenadas a -80˚C hasta su análisis, fueron disectadas sobre una placa fría y pesadas en una balanza (*Metter Toledo®* AB54), utilizando 0.20 g de gónada de hembras y 0.10 g de gónada de machos para ser purificadas de acuerdo a lo implementado por Reza (2009). Las muestras se colocaron en tubos de vidrio de 20 ml a -5˚C en 500 µl a 1000 µl de solución de Hank (Tabla X) en cada caso. Posteriormente, las muestras fueron

homogenizadas en un homogenizador (*Polytron Sentry*®) durante 10 a 20 segundos en baño con hielo y almacenadas a -20˚C.

Tabla X. Composición de solución de Hank.

Ingrediente	Cantidad (ml)	Proporción (%)
Solución de Hank*	499.84	80
Etanol absoluto**	93.72	15
Ácido fórmico	31.24	5
Total	**624.8**	**100**

**Sigma **Sigma.*

Las muestras se llevaron a temperatura ambiente para adicionarles 2 ml de etanol, incubándose durante 5 minutos a -20˚C y centrifugadas a 3000 rfc (5˚C, 10 min). El sobrenadante fue recuperado en un tubo de vidrio de 15 ml para evaporar el etanol (*Sigma*®) (90 min. aprox.) utilizando un evaporador (*Jouan ThermoElectron*®) a temperatura ambiente. El pH de las muestras se obtuvo con un potenciómetro (*Thermo Orion*®), ajustando el pH a 4.0 mediante la adición del volumen adecuado de buffer de acetato pH 4 preparado como se describe en Reza (2009). Los cartuchos (*Waters*®) conectados a un manifol (*Supelco*®) a 20 Hg fueron activados con 5 ml de metanol grado HPLC (*J.T. Baker*®) seguidos de 5 ml de agua ultrapura (*Cayman Chemical*®), se colocaron las muestras y se eluyeron con 5 ml de agua ultrapura (*Cayman Chemical*®) y 5 ml de hexano grado HPLC (*J.T. Baker*®). Finalmente, las muestras fueron eluidas con 5 ml de etil acetato (*Sigma Aldrich*®) conteniendo 1% metanol para ser almacenadas a -20˚C.

6.8.2 Desarrollo del inmunoensayo por competencia enzimática

La muestras de tejido gonádico purificadas se llevaron a temperatura ambiente para ser evaporadas mediante flujo constante de nitrógeno gaseoso a 30˚C (30 min. aprox.) y adicionarles 450 µl de buffer EIA (*Cayman Chemical*®) y 150 µl de buffer de carbonato (*Cayman Chemical*®). Posteriormente, las muestras fueron homogenizadas en un vórtex e incubadas a temperatura ambiente (12 h) y total oscuridad. El desarrollo del inmunoensayo por competencia enzimática (ACE, *Cayman Chemical*®) se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, de acuerdo a lo descrito por Reza (2009). La curva estándar se construyó a partir de un estándar de prostaglandina comercial (PGEM, *Cayman Chemical*®) utilizando diluciones seriales (1:10); la cual fue procesada en la microplaca de inmunoensayo por competencia enzimática (ACE, *Cayman Chemical*®) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Cayman *Chemical*®). La cuantificación de PGE_2 (pg g^{-1}) de cada muestra se estimó de acuerdo a lo descrito por Reza (2009), considerando la absorbancia (λ) registrada para cada muestra en el lector de placas (*BIORAD*® 680) al término del desarrollo del inmunoensayo ACE (Cayman Chemical®).

6.9 Análisis estadístico

Todos los datos fueron probados para su normalidad (Anderson Darling) y homocedasticidad (Levene) (Dytham, 1999). Los datos expresados en porcentaje fueron transformados por arcoseno (Sokal y Rohlf, 1981) y analizados para su normalidad (Kolmogorov) y su homocedasaticidad (Barttlet). Sin embargo, los datos se expresan sin transformaciones. El análisis de varianza unifactorial o bifactorial se

realizó utilizando como variables independientes el nivel de ARA de la artemia adulta utilizada como alimento vivo (3%, 4% y 7%), el sexo (macho y hembra) y el tiempo (2 semanas y 8 semanas), cuando los muestreos se realizaron al principio o al final del experimento. Se usó como covariable el índice gonadosomático (%) de los organismos en las variables analizadas en las gónadas de los reproductores. Todas los análisis de varianza se realizaron en el programa *Statistica*® Versión 5.5, utilizando la prueba de Tukey para evaluar la diferencia significativa ($P<0.05$) entre las medias de los diferentes tratamientos. Todos los datos se expresan la media ± error estándar de la media y fueron graficados con el programa *SlideWrite*® Versión 5.0.

7. RESULTADOS

7.1 Desempeño de los reproductores en cultivo

7.1.1 Supervivencia de los reproductores

No se observó un efecto significativo del nivel de ARA en la dieta (3%, 4% y 7%) sobre la supervivencia (%) de los machos y las hembras de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) al final de la etapa experimental (día 70). Sin embargo, las hembras tendieron a tener una supervivencia menor que los machos en todos los tratamientos (Fig. 12).

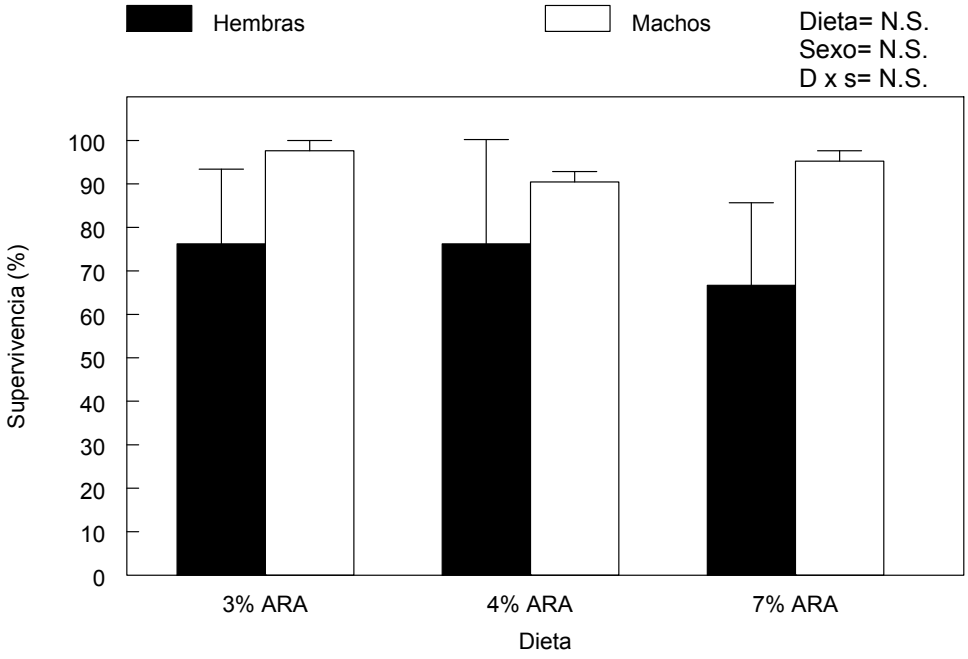

FIGURA 12. Supervivencia (%) de hembras y machos de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) al final del periodo experimental (día 70).

7.1.2 Peso hembras

En las hembras de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) se observó una tendencia significativa a disminuir el peso en relación al tiempo (peso inicial vs. peso final). No se observó ningún efecto significativo del tratamiento de ARA sobre el peso de hembras, y/o interacción entre el tratamiento de ARA y el tiempo de alimentación (Fig. 13).

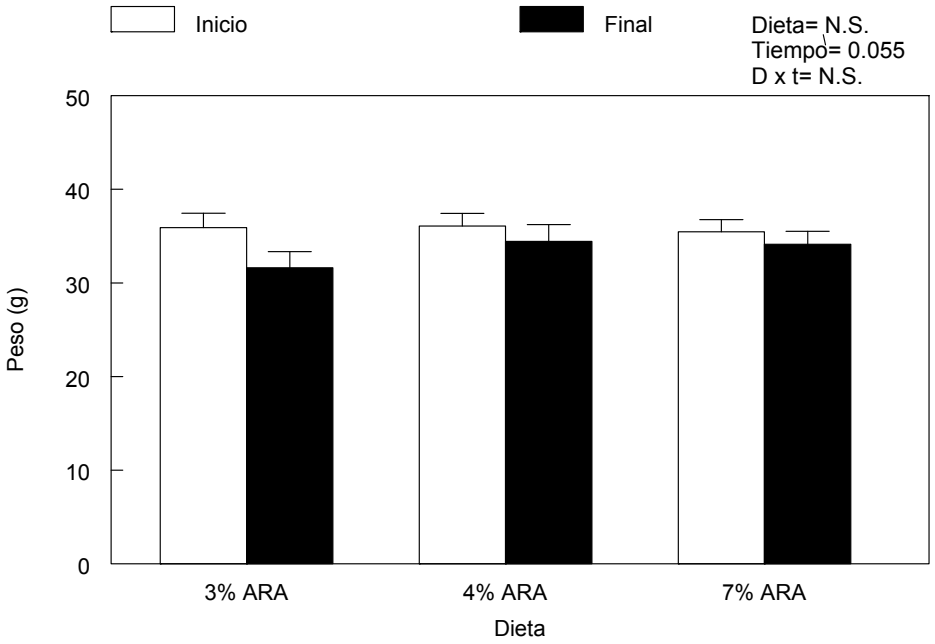

FIGURA 13. Peso inicial (g) (día 1) vs. peso final (g) (día 70) de hembras de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

7.1.3 Longitud total hembras

Las hembras de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) alimentadas con diferentes niveles de ARA (3%, 4% y 7%) no mostraron diferencias significativas entre la longitud total inicial (día 1) y final (día 70) (Fig. 14).

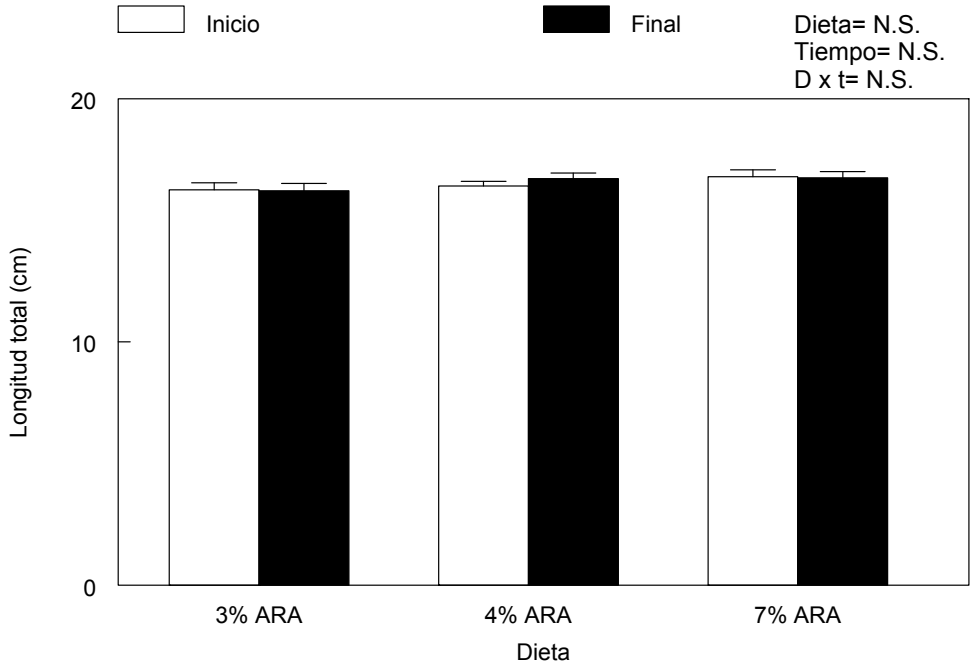

FIGURA 14. Longitud total inicial (cm) (día 1) vs. Longitud total final (cm) (día 70) de las hembras de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

7.1.4 Peso machos

Los machos de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) alimentados con diferentes niveles de ARA (3%, 4% y 7%) no mostraron diferencias significativas entre el peso inicial (día 1) y peso final (día 70) (Fig.15).

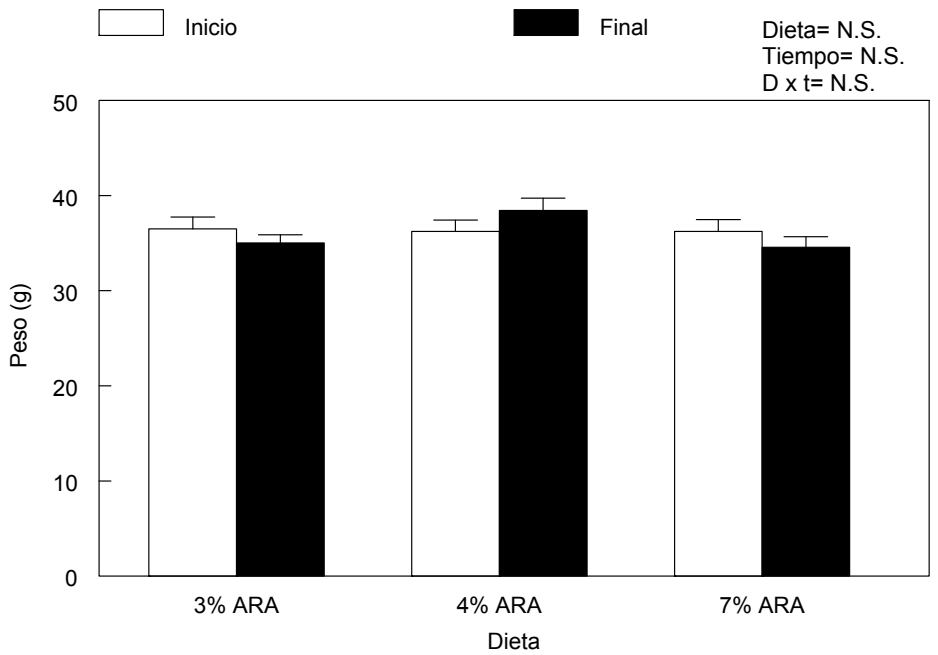

FIGURA 15. Peso inicial (g) (día 1) vs. Peso final (g) (día 70) de los machos de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

7.1.5 Longitud total machos

No se observaron efectos significativos del nivel de ARA en la dieta (3%, 4% y 7%) y/o la longitud total de machos al inicio (día 1) y al final del experimento (día 70) (Fig. 16).

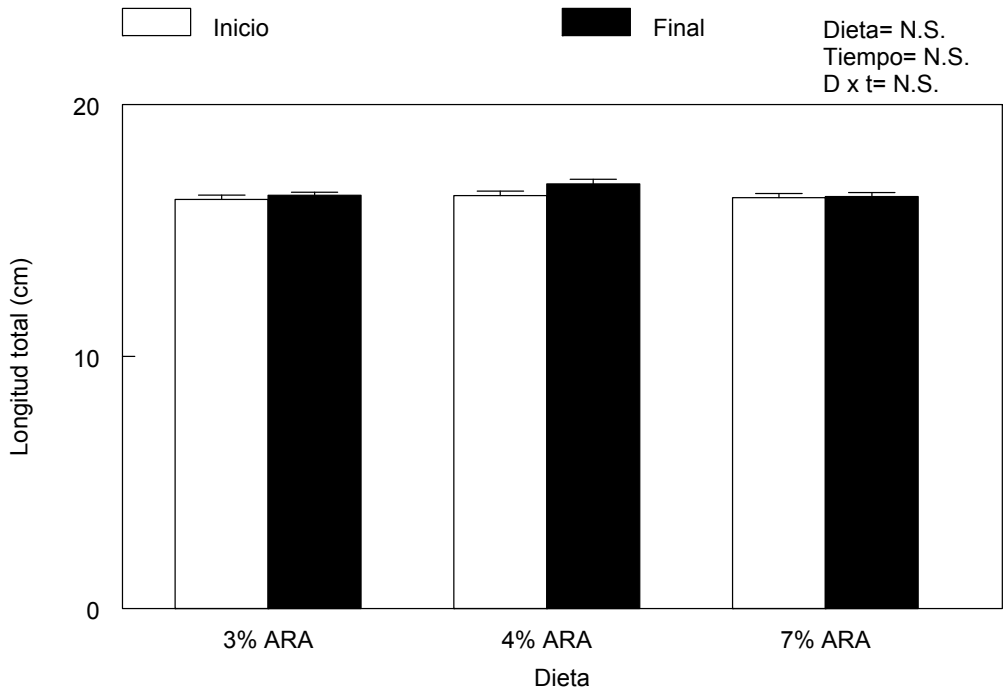

FIGURA 16. Longitud total inicial (cm) (día 1) vs. longitud total final (cm) (día 70)de los machos de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

7.1.6 Ganancia de peso

La ganancia de peso (%) de las hembras de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) mostró tendencia negativa. La mayor pérdida de peso (12%) se observó en las hembras del grupo control (3% ARA) en relación a las hembras alimentadas con 4% y 7% ARA, las cuales pérdida de peso fue del 5%. Los machos alimentados con 4% ARA presentaron una ganancia de peso del 5%, a diferencia de los machos alimentados con 3% y 7% de ARA; los cuales perdieron el 5% de su biomasa corporal.

7.1.7 Índice hepatosomático (IHS)

El IHS (%) de las hembras del pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) fue significativamente mayor que el de machos, sin observarse un efecto del nivel de ARA en la dieta (3%, 4% y 7%) y/o interacción entre la dieta y el sexo de los organismos (Fig. 17).

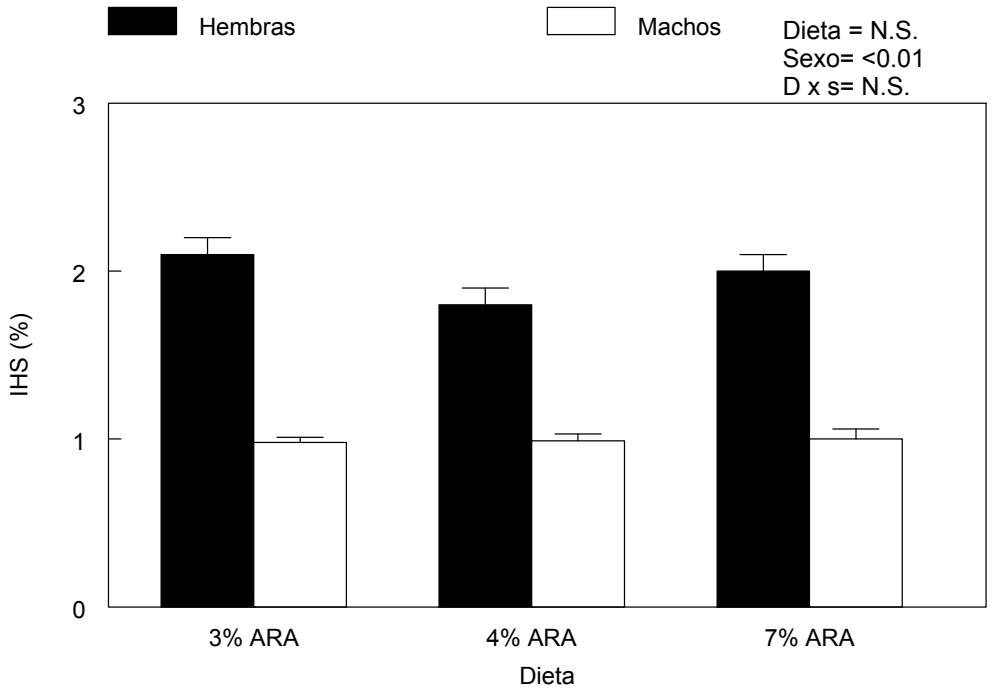

FIGURA 17. Índice hepatosomático (%) de los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

7.1.8 Índice gonadosomático (IGS)

El nivel de ARA en la dieta (3%, 4% y 7%) no mostró efecto sobre el IGS (%) de las hembras y los machos del pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*). En general, las hembras presentan un IGS (%) dos veces mayor al de los machos (Fig.18).

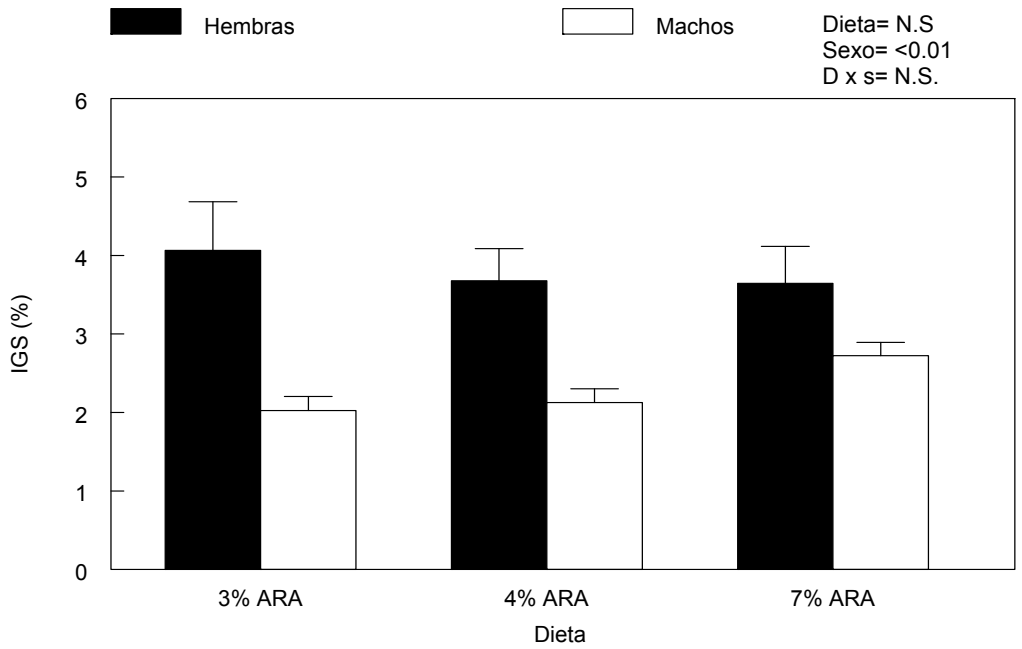

FIGURA 18. Índice gonadosomático (%) de hembras y machos de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

7.2 Composición bioquímica de las gónadas

7.2.1 Carbohidratos

Se observó una mayor concentración de carbohidratos en las gónadas de hembras (30 mg g^{-1}, peso seco) comparado a la concentración observada en el tejido gonádico de los machos (5 mg g^{-1}, peso seco). El nivel de ARA no modificó la concentración de carbohidratos en las gónadas de los reproductores. No se observó una interacción de la dieta (3%, 4% y 7% ARA) y el sexo sobre el nivel de carbohidratos de las gónadas de los reproductores (Fig. 19).

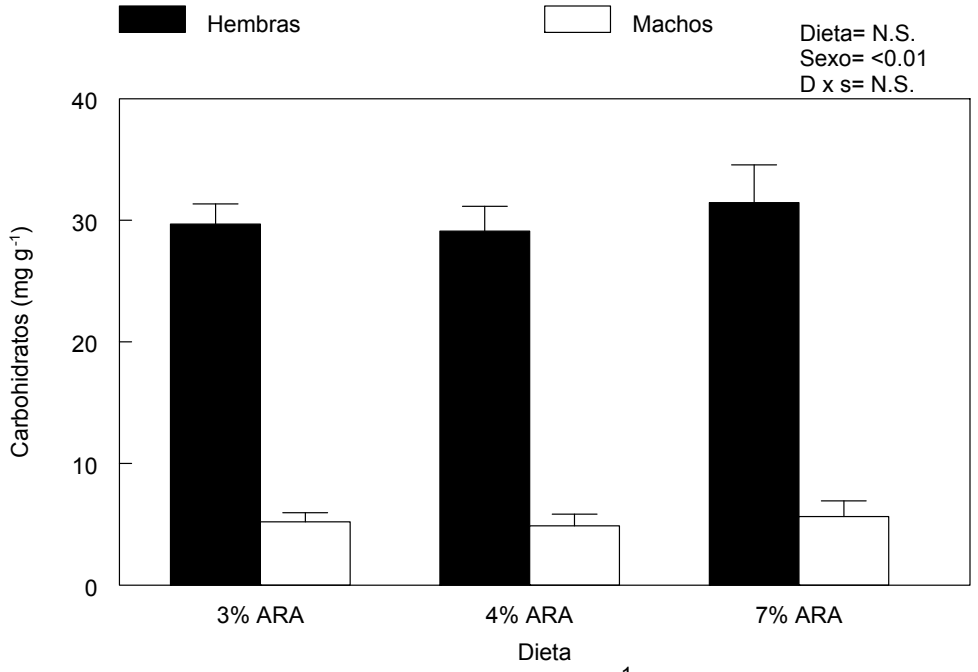

FIGURA 19. Concentración de carbohidratos (mg g^{-1}) de las gónadas de los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

7.2.2 Lípidos totales

La concentración de lípidos totales en las gónadas de las hembras (76±6 mg g^{-1}, peso seco) fue significativamente menor al observado en los machos (102±7 mg g^{-1}, peso seco). Por otro lado, los organismos alimentados con 3% ARA presentaron menores niveles de lípidos (79±14 mg g^{-1}, peso seco) en comparación con los organismos alimentados con 4% ARA (98±19 mg g^{-1}, peso seco) y 7% ARA (91±6 mg g^{-1}, peso seco) (Fig. 20).

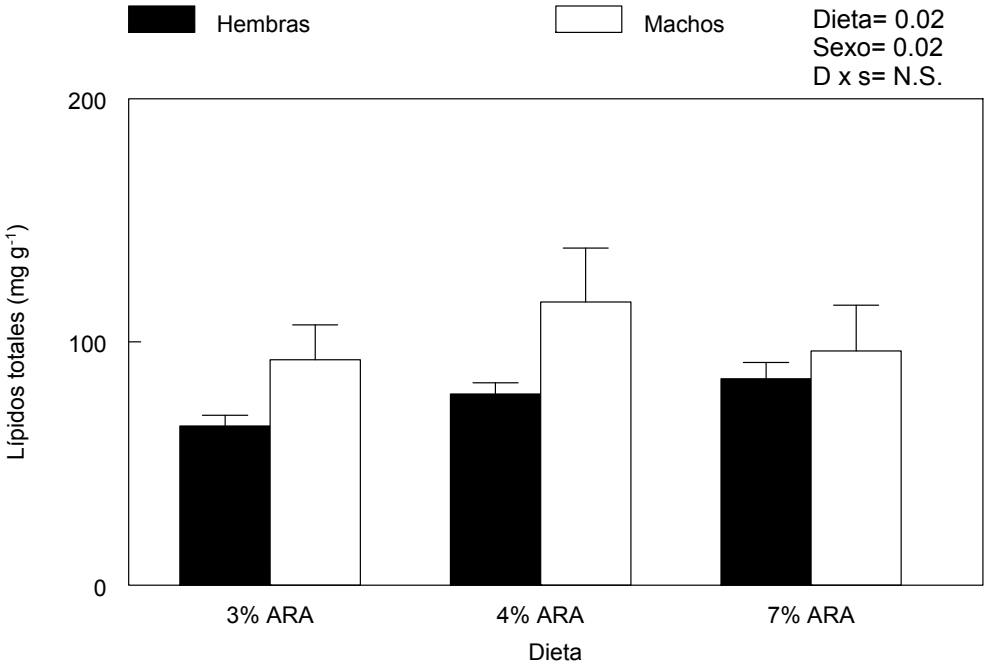

FIGURA 20. Concentración de lípidos totales (mg g^{-1}) de las gónadas de los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

7.2.3 Proteínas totales

El contenido de proteínas totales en las gónadas de los machos (490±58 mg g^{-1}, peso seco) fue mayor al observado en hembras (402±14 mg g^{-1}, peso seco). También se observó que los organismos alimentados con 3% y 4% de ARA presentaron mayor concentración de proteínas en las gónadas (P=0.01) respecto a los alimentados con 7% ARA (Fig. 21).

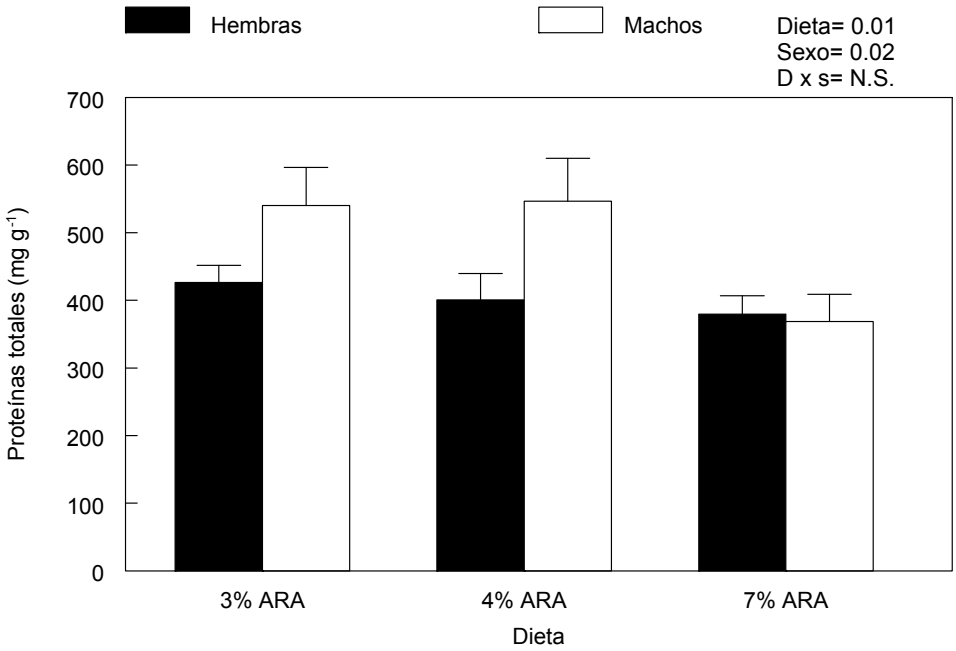

FIGURA 21. Concentración de proteínas totales (mg g^{-1}) de las gónadas de los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

7.2.4 Concentración de ácidos grasos en fosfolípidos de gónadas

No se observó efecto del nivel de ARA en la dieta (3%, 4% y 7%) sobre la concentración de ácidos grasos (mg g^{-1}) de los fosfolípidos de las gónadas de los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) (Tabla XI). Sin embargo, se observaron diferencias en el perfil de ácidos grasos de los PL entre machos y hembras. En general, los machos presentaron menor contenido de ácidos grasos saturados, 20:0, 16:1n-9; 18:2n-6 y 18:3n-3 comparado a las hembras. El contenido de HUFA n-3 y n-6 fue constante para ambos sexos, excepto para el EPA, el cual fue menor en las gónadas de los machos, afectando la relación n-3/n-6. No se observó una interacción entre la dieta (3%, 4% y 7% ARA) y sexo sobre la concentración de ácidos grasos de los fosfolípidos de las gónadas de los reproductores.

Tabla XI. Concentración de ácidos grasos (mg g^{-1}) en los PL de gónadas de reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

Ácido graso	**3% ARA**		**4% ARA**		**7% ARA**		**Dieta**	**Sexo**	**D x s**
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos			
14:0	0.68±0.06	0.76±0.03	0.63±0.05	0.69±0.07	0.60±0.060	0.64±0.03	N.S.	N.S.	N.S.
16:0	23.79±1.40	19.41±0.70	23.73±1.90	17.85±1.20	21.99±1.60	18.73±0.50	N.S.	**<0.01**	N.S.
18:0	6.96±0.70	4.93±0.40	7.89±0.80	4.39±0.50	7.56±0.90	5.34±0.30	N.S.	**<0.01**	N.S.
20:0	0.08±0.01	0.16±0.02	0.08±0.01	0.14±0.01	0.07±0.01	0.16±0.09	N.S.	**<0.01**	N.S.
16:1n-9	1.38±0.08	1.58±0.08	1.38±0.10	1.62±0.10	1.30±0.20	1.66±0.20	N.S.	**<0.01**	N.S.
18:1n-9	11.33±1.40	10.32±0.70	11.39±1.10	9.47±0.60	10.99±0.50	10.46±0.60	N.S.	N.S.	N.S.
18:1n-7	2.62±0.40	2.34±0.20	2.71±0.30	1.96±0.40	2.66±0.20	2.55±0.20	N.S.	N.S.	N.S.
20:1n-11	1.01±0.05	1.09±0.10	0.96±0.10	1.20±0.20	0.89±0.10	1.40±0.070	N.S.	**0.02**	N.S.
20:1n-9	0.08±0.01	0.25±0.04	0.09±0.01	0.28±0.04	0.08±0.02	0.33±0.04	N.S.	**<0.01**	N.S.
18:2n-6	9.65±0.80	18.73±1.10	10.15±0.10	17.14±1.00	8.57±0.80	17.97±0.90	N.S.	**<0.01**	N.S.
18:3n-6	1.67±0.09	1.70±0.20	1.64±0.20	1.49±0.20	1.47±0.20	1.61±0.07	N.S.	N.S.	N.S.
18:3n-3	0.36±0.06	0.58±0.06	0.39±0.05	0.57±0.04	0.31±0.30	0.54±0.04	N.S.	**<0.01**	N.S.
20:2n-6	2.07±0.20	1.73±0.20	2.08±0.20	1.66±0.20	1.73±0.20	2.07±0.20	N.S.	N.S.	N.S.
20:4n-6	10.00±1.00	9.65±1.30	11.25±0.80	10.51±0.10	10.14±0.90	11.45±1.40	N.S.	N.S.	N.S.
20:5n-3	2.13±0.40	1.72±0.20	2.34±0.40	1.73±0.20	2.23±0.40	1.54±0.10	N.S.	**0.02**	N.S.
21:4n-6	0.22±0.04	0.24±0.03	0.24±0.03	0.24±0.02	0.22±0.30	0.23±0.01	N.S.	N.S.	N.S.
22:5n-6	0.12±0.02	0.10±0.03	0.13±0.03	0.07±0.01	0.15±0.20	0.13±0.02	N.S.	N.S.	N.S.
22:5n-3	0.22±0.02	0.27±0.20	0.26±0.02	0.23±0.01	0.23±0.20	0.27±0.02	N.S.	N.S.	N.S.
22:6n-3	46.49±5.20	39.16±2.60	47.78±4.80	33.89±3.60	45.52±3.90	41.72±2.20	N.S.	N.S.	N.S.
Σ SAT.	35.99±2.40	29.34±1.20	37.07±3.05	26.69±1.70	34.68±2.90	29.3±0.90	N.S.	**<0.01**	N.S.
Σ MUFA	18.40±2.00	17.26±0.90	18.40±1.73	16.09±1.20	17.77±1.10	18.23±1.00	N.S.	N.S.	N.S.
Σ PUFA	73.33±6.80	74.23±4.10	76.73±6.60	67.89±5.10	70.97±5.60	77.99±3.00	N.S.	N.S.	N.S.
Σ HUFA	59.36±6.20	51.32±3.40	62.22±5.50	46.84±4.20	58.68±4.50	55.58±3.00	N.S.	N.S.	N.S.
20:4/20:5	5.06±0.60	5.62±0.40	5.05±0.60	6.46±1.00	5.44±1.10	7.63±1.10	N.S.	N.S.	N.S.
(n-3)/(n-6)	2.68±0.10	2.03±0.05	2.54±0.06	1.92±0.05	2.64±0.10	1.96±0.06	N.S.	**<0.01**	N.S.
22:6/20:5	23.18±2.10	23.97±3.00	21.22±2.90	21.07±3.50	23.63±4.60	27.74±2.40	N.S.	N.S.	N.S.
Σ TOTAL	127.71±10.80	120.84±5.90	132.2±11.30	110.66±7.60	123.43±9.50	125.53±3.80	N.S.	N.S.	N.S.

7.2.5 Proporción de HUFA en fosfolípidos de gónadas

La proporción de HUFA (%) de fosfolípidos de gónadas no fue afectada por el nivel de ARA en la dieta de los reproductores (Fig. 22). El contenido de 22:6n-3 fue mayor en las gónadas de hembras mientras que el EPA mostró un nivel constante en ambos sexos. No se observó interacción de la dieta (3%, 4% y 7% ARA) y el sexo sobre el nivel de ARA, EPA y/o DHA de los fosfolípidos de las gónadas de los reproductores.

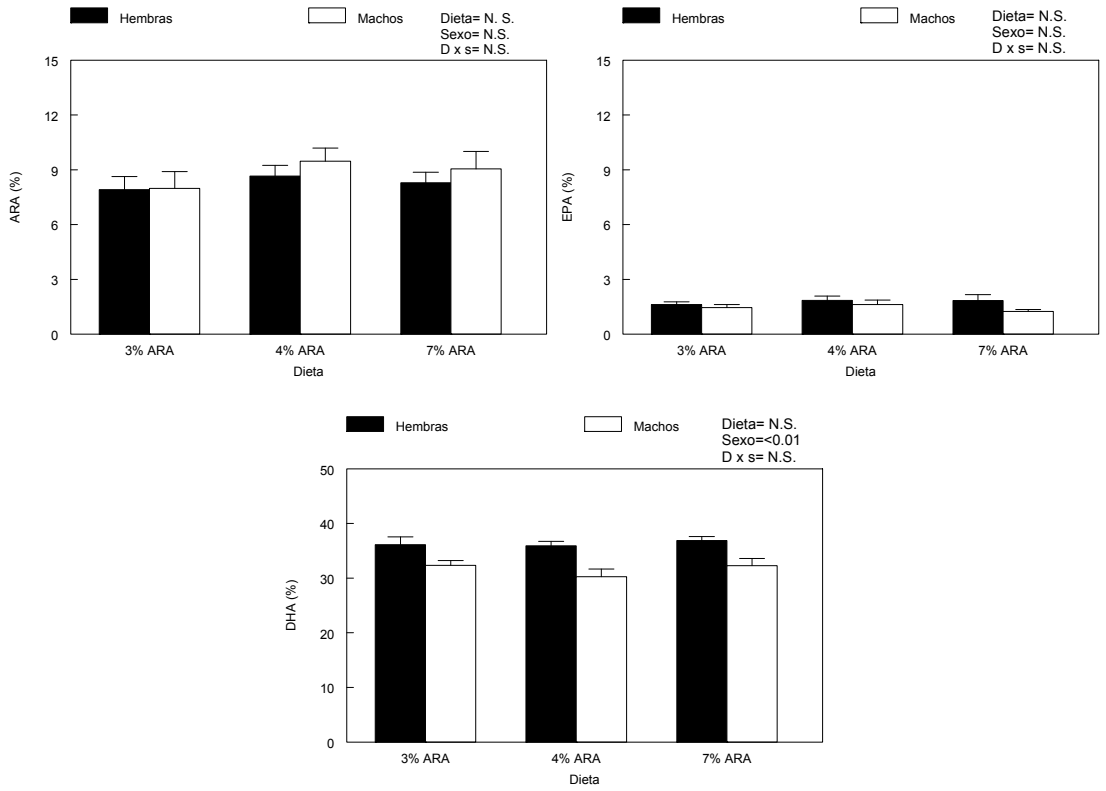

FIGURA 22. Proporción de HUFA (%) en fosfolípidos de las gónadas de reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

7.2.6 Concentración de ácidos grasos en los lípidos de reserva de gónadas

El contenido de ácidos grasos (mg g^{-1}) de las gónadas de las hembras y machos fue afectado tanto por el sexo como por el nivel de ARA en la dieta (Tabla XII). La dieta afectó los niveles de 14:0, 16:0 y 24:0, 16:1n-9, 16:1n-7, 20:1n-7, así como 22:1n-11; 18:2n-6, 18:3n-6, 18:3n-3, 20:2n-6 y en particular de HUFA como el 20:4n-6, 20:5n-3, 21:4n-6 y 22:6n-3. Algunos ácidos grasos como 20:0, 16:1n-9, 20:1n-7, 24:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3, 20:4n-6, 21:4n-6 y 22:5n-6 presentaron diferentes concentraciones según el sexo. Se observaron diferencias significativas para la interacción entre sexo y dieta de 16:1n-9, 18:2n-6, 20:2n-6, 20:4n-6 y 21:4n-6, observándose concentración más alta de 20:2n-6 en los organismos alimentados con 3% y 4% ARA; en tanto que el contenido de 18:2n-6 fue menor en las hembras, especialmente en aquellas alimentadas con 7% ARA. Finalmente, los organismos alimentados con 3% y 4% ARA mostraron el mayor contenido de HUFA n-3 (DHA y EPA) y el menor contenido de HUFA n-6 (20:4n-6 y 21:4n-6), observándose un mayor contenido de ácidos grasos totales en dichos organismos.

Tabla XII. Concentración de ácidos grasos (mg g^{-1}) en lípidos de reserva de gónadas de reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

Ácido graso	3% ARA		4% ARA		7% ARA		Dieta	Sexo	Dieta x s
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos			
14:0	0.09±0.009	0.11±0.02	0.09±0.01	0.16±0.02	0.07±0.006	0.08±0.02	**<0.01**	N.S.	N.S.
16:0	1.11±0.01	1.01±0.13	1.11±0.12	1.25±0.12	0.82±0.08	0.78±0.09	**<0.01**	N.S.	N.S.
18:0	0.48±0.04	0.49±0.05	0.45±0.03	0.51±0.03	0.41±0.05	0.38±0.02	N.S.	N.S.	N.S.
20:0	0.01±0.002	0.02±0.002	0.01±0.002	0.02±0.002	0.01±0.00	0.02±0.002	N.S.	**<0.01**	N.S.
24:0	1.11±0.10	1.00±0.13	1.10±0.12	1.25±0.12	0.68±0.16	0.78±0.09	**<0.01**	N.S.	N.S.
16:1n-9	**0.21±0.02^{ab}**	**0.39±0.07^{b}**	**0.20±0.02^{ab}**	**0.63±0.08^{c}**	**0.15±0.02^{a}**	**0.25±0.05^{ab}**	**<0.01**	**<0.01**	**<0.01**
16:1n-7	0.13±0.01	0.11±0.02	0.13±0.02	0.14±0.01	0.09±0.02	0.08±0.02	**0.02**	N.S.	N.S.
18:1n-9	0.02±0.002	0.03±0.002	0.02±0.00	0.05±0.005	0.12±0.11	0.03±0.004	N.S.	N.S.	N.S.
18:1n-7	0.02±0.002	0.01±0.002	0.01±0.002	0.01±0.003	0.04±0.03	0.01±0.00	N.S.	N.S.	N.S.
20:1n-7	0.97±0.11	2.62±0.33	1.14±0.16	3.74±0.32	0.60±0.14	2.01±0.37	**<0.01**	**<0.01**	N.S.
22:1n-11	0.24±0.02	0.27±0.05	0.26±0.03	0.31±0.03	0.16±0.04	0.19±0.04	**0.02**	N.S.	N.S.
24:1n-9	0.01±0.00	0.02±0.003	0.01±0.002	0.03±0.002	0.01±0.002	0.02±0.003	N.S.	**<0.01**	N.S.
18:2n-6	**0.97±0.11^{ab}**	**2.62±0.33^{c}**	**1.14±0.16^{ab}**	**3.74±0.32^{d}**	**0.71±0.08^{a}**	**2.01±0.37^{bc}**	**<0.01**	**<0.01**	**0.05**
18:3n-6	0.24±0.02	0.27±0.05	0.26±0.03	0.31±0.03	0.18±0.03	0.19±0.04	**0.03**	N.S.	N.S.
18:3n-3	**0.07±0.01^{a}**	**0.19±0.03^{b}**	**0.08±0.01^{a}**	**0.30±0.03^{c}**	**0.05±0.005^{a}**	**0.14±0.03^{ab}**	**<0.01**	**<0.01**	**0.02**
20:2n-6	0.17±0.02	0.17±0.02	0.18±0.02	0.21±0.01	0.12±0.02	0.15±0.02	**<0.01**	N.S.	N.S.
20:4n-6	**0.70±0.076^{ab}**	**1.54±0.18^{c}**	**0.68±0.07^{a}**	**2.34±0.21^{d}**	**0.59±0.06^{a}**	**1.31±0.20^{bc}**	**<0.01**	**<0.01**	**<0.01**
20:5n-3	0.15±0.03	0.19±0.01	0.18±0.03	0.26±0.05	0.12±0.03	0.12±0.008	**0.02**	N.S.	N.S.
21:4n-6	**0.03±0.004^{a}**	**0.08±0.01^{bc}**	**0.04±0.004^{ab}**	**0.12±0.02^{c}**	**0.03±0.004^{a}**	**0.05±0.005^{ab}**	**<0.01**	**<0.01**	**0.04**
22:5n-6	0.02±0.01	0.02±0.005	0.01±0.002	0.03±0.007	0.01±0.002	0.05±0.03	N.S.	N.S.	N.S.
22:5n-3	0.02±0.003	0.05±0.006	0.02±0.004	0.05±0.005	0.02±0.003	0.03±0.008	N.S.	**<0.01**	N.S.
22:6n-3	3.90±0.34	4.82±0.55	3.91±0.48	4.97±0.78	2.76±0.34	3.27±0.30	**0.02**	N.S.	N.S.
Σ SAT.	3.05±0.25	3.02±0.35	3.02±0.30	3.64±0.30	2.17±0.24	2.33±0.25	**<0.01**	N.S.	N.S.
Σ MUFA	2.94±0.03	5.51±0.69	3.24±0.37	7.81±0.67	2.06±0.27	4.24±0.64	**<0.01**	**<0.01**	N.S.
Σ PUFA	9.19±0.54	12.50±1.06	9.50±0.94	15.03±1.40	7.09±0.69	10.11±0.77	**<0.01**	**<0.01**	N.S.
Σ HUFA	4.86±0.43	6.75±0.68	4.87±0.57	7.82±0.98	3.56±0.40	4.86±0.43	**<0.01**	**<0.01**	N.S.
(n-3)/(n-6)	1.93±0.08	1.13±0.07	1.79±0.05	0.82±0.091	1.77±0.08	1.04±0.13	N.S.	**<0.01**	N.S.
22:6/20:5	27.61±3.07	25.61±2.83	23.51±3.09	21.00±3.50	25.42±4.70	26.11±1.20	N.S.	N.S.	N.S.
20:4/20:5	4.95±0.54	8.02±0.53	4.11±0.53	10.26±1.52	5.40±0.879	10.72±1.85	N.S.	**<0.01**	N.S.
Total	15.18±1.03	21.03±2.08	15.76±1.57	26.48±2.31	11.32±0.99	16.69±1.61	**<0.01**	**<0.01**	N.S.

7.2.7 Proporción de HUFA en los lípidos de reserva de las gónadas

La proporción (%) de 20:4n-6 fue mayor en las gónadas de machos, mientras que el nivel de 22:6n-3 fue mayor en las gónadas de las hembras (Fig. 23). Solo se observó efecto significativo de la dieta proporcionada sobre el nivel de 22:6n-3, el cual fue mayor en los organismos del grupo control (3% ARA) y menores en los organismos alimentados con 7% de ARA.

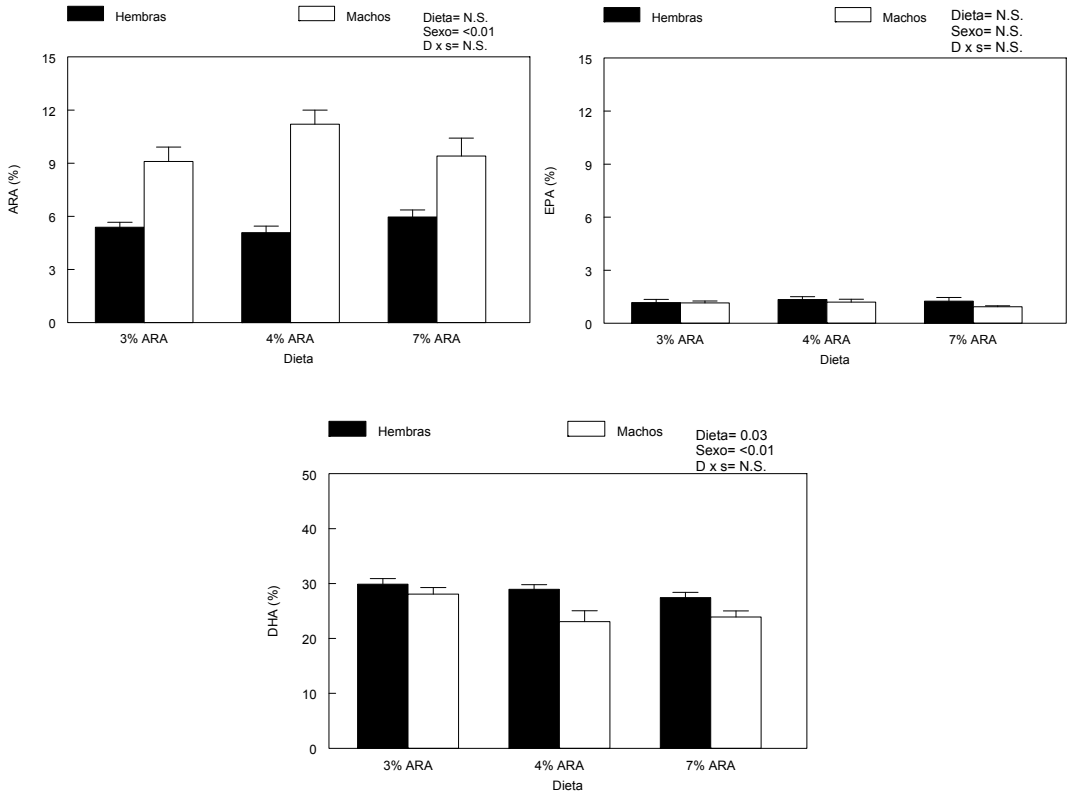

FIGURA 23. Proporción de HUFA (%) en los lípidos de reserva de las gónadas de reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

7.2.8 Contenido de PGE_2 en gónadas

El contenido de PGE_2 (pg g^{-1}) en las gónadas de los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) no fue afectado por el nivel de ARA suministrado en la dieta durante 70 días. Sin embargo, se observó que la concentración de PGE_2 en las gónadas de las hembras (245±34 pg g^{-1}, peso húmedo) fue menor a lo observado en el tejido gonádico de los machos (373±35 pg g^{-1}, peso húmedo) (Fig. 24).

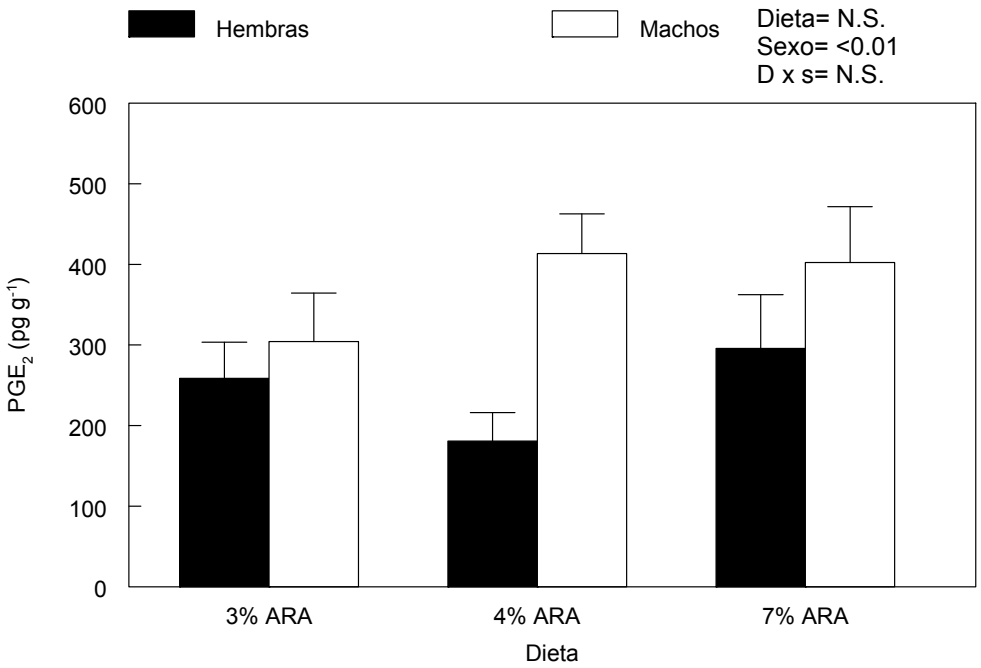

FIGURA 24. Concentración de PGE_2 (pg g^{-1}) en gónadas del pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

7.3 Calidad del desove

7.3.1 Número de desoves

No se observaron diferencias significativas para el número de desoves producidos por hembras alimentadas con distintos niveles de ARA. Sin embargo, las hembras del

grupo control (3% ARA) tendieron a producir menos desoves (24) que las hembras alimentadas con 4% ARA (28) y 7% ARA (29) (Fig. 25).

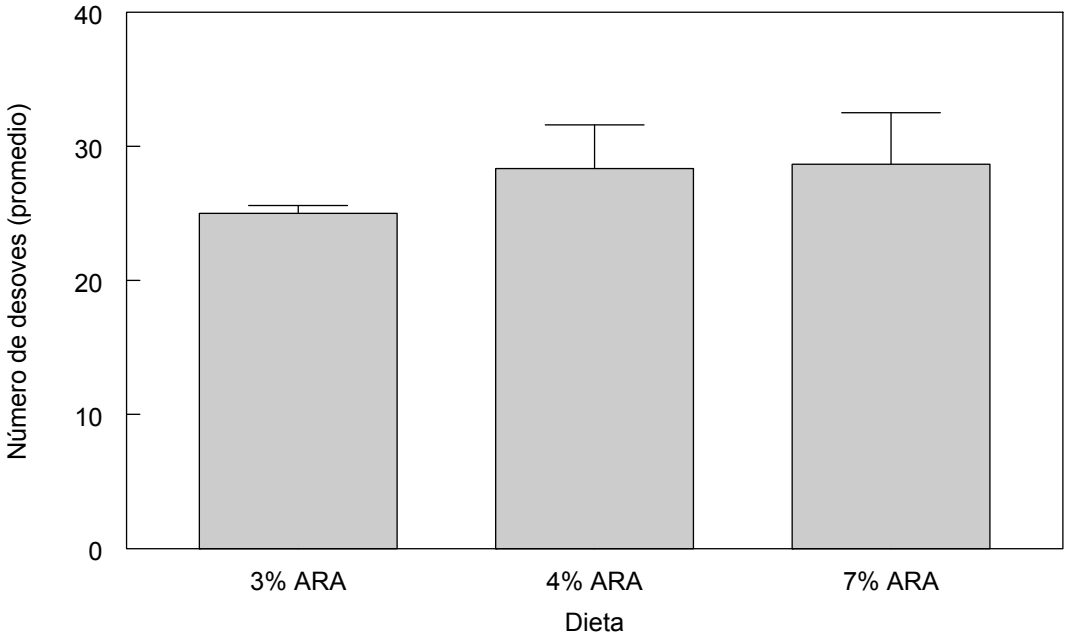

FIGURA 25. Número promedio de desoves producidos por el pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) durante el periodo experimental.

7.3.2 Número total de huevos producidos

El número total de huevos producidos durante el período experimental (diciembre 2007 a febrero 2008) por las hembras alimentadas con 7% ARA fue significativamente mayor a los producidos por las hembras del grupo control (3% ARA) y las hembras alimentadas con 4% ARA (Fig. 26).

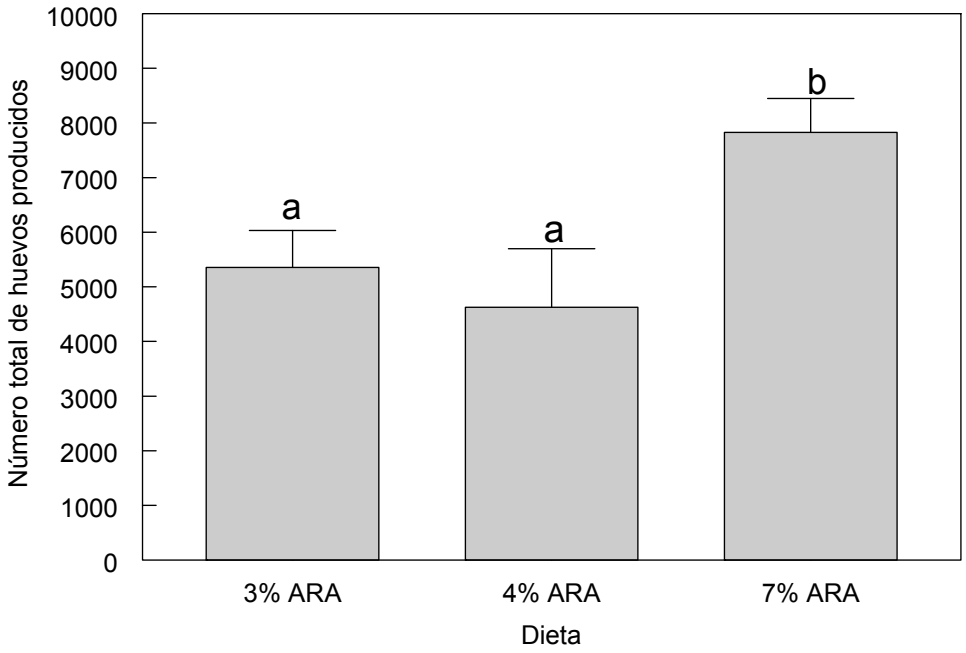

FIGURA 26. Número total de huevos producidos (diciembre 2007 a febrero 2008). Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05) entre las medias de los tratamientos.

7.3.3 Fertilización

La fertilización (%) de los desoves no fue afectada por el nivel de ARA (3%, 4% y 7% ARA) en la dieta de los reproductores y/o por el tiempo de tratamiento (semana 2 vs. semana 8). Sin embargo, se observó que un nivel alto de ARA (7%) en la dieta de los reproductores estimuló una mayor tasa de fertilización al término del período experimental (semana 8); mientras que en el grupo control (3% ARA) se observó un patrón inverso, aunque éste no fue significativo (Fig. 27).

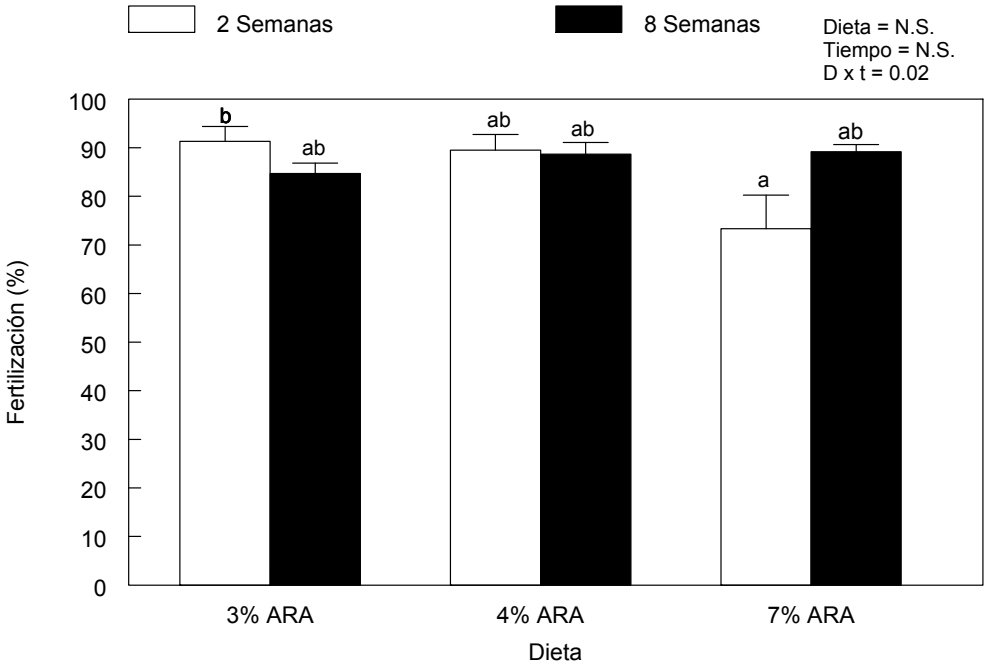

FIGURA 27. Fertilización (%) de desoves de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) a las 2 y a las 8 semanas de tratamiento con una dieta rica en ARA. Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05) entre las medias de los tratamientos.

7.3.4 Eclosión

La eclosión (%) registrada para los desoves de los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) fue similar (P=0.40) para los diferentes tratamientos (3%, 4% y 7%). No se observó un efecto por el tiempo (2 semanas 2 vs. 8 semanas) sobre la tasa de eclosión de los huevos provenientes de reproductores alimentados con diferente nivel de ARA (3%, 4% y 7%). Sin embargo, se observó una tasa de eclosión mayor en los desoves del grupo control (3% ARA) al final del periodo experimental, mientras que la tasa de eclosión de los desoves de los grupos alimentados con 4% y 7% de ARA mantuvieron valores constantes hasta el término del experimento (Fig. 28).

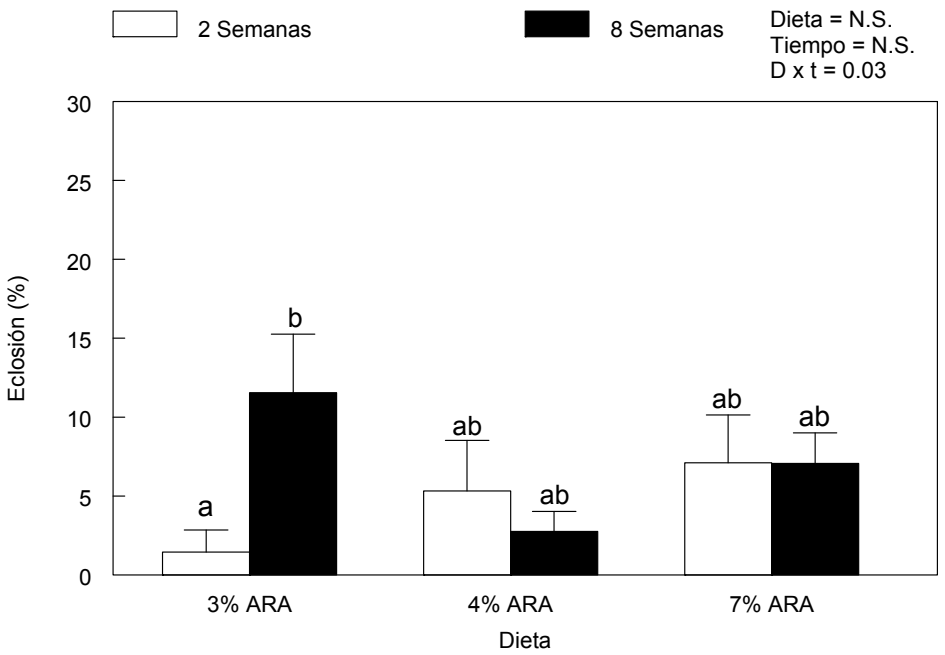

FIGURA 28. Eclosión (%) de los desoves de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) a las 2 y a las 8 semanas de tratamiento con dietas enriquecidas con diferentes niveles de ARA Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05) entre las medias de los tratamientos.

7.3.5 Tamaño de los huevos

El diámetro (µm) de los huevos de reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) fue afectado significativamente por el nivel de ARA en la dieta. Los mayores diámetros de huevos se obtuvieron en los desoves provenientes de organismos alimentados con 7% de ARA respecto al grupo control (3% ARA) sin observarse una interacción entre la dieta y el tiempo de alimentación (Fig. 29).

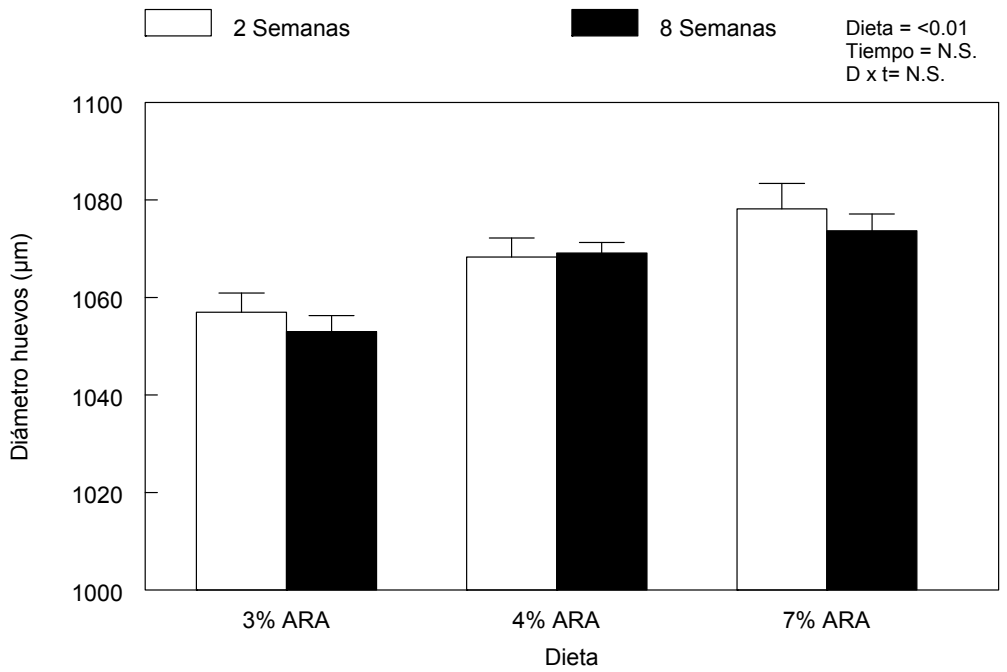

FIGURA 29. Diámetro de huevos (µm) de los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) a las 2 y a las 8 semanas de tratamiento con una dieta rica en ARA.

7.3.6 Área total de las gotas lipídicas

El área total (μm^2) de las gotas lipídicas fue afectada tanto por el nivel de ARA en la dieta de los reproductores y por el tiempo de tratamiento. Los huevos provenientes de organismos alimentados con 4% y 7% de ARA presentaron mayores áreas de gotas lipídicas a las dos semanas de tratamiento en comparación con el grupo control (3% ARA); observándose una disminución del área de las gotas en los desoves provenientes de organismos alimentados con 3% y 7% ARA al final del periodo experimental (Fig. 30).

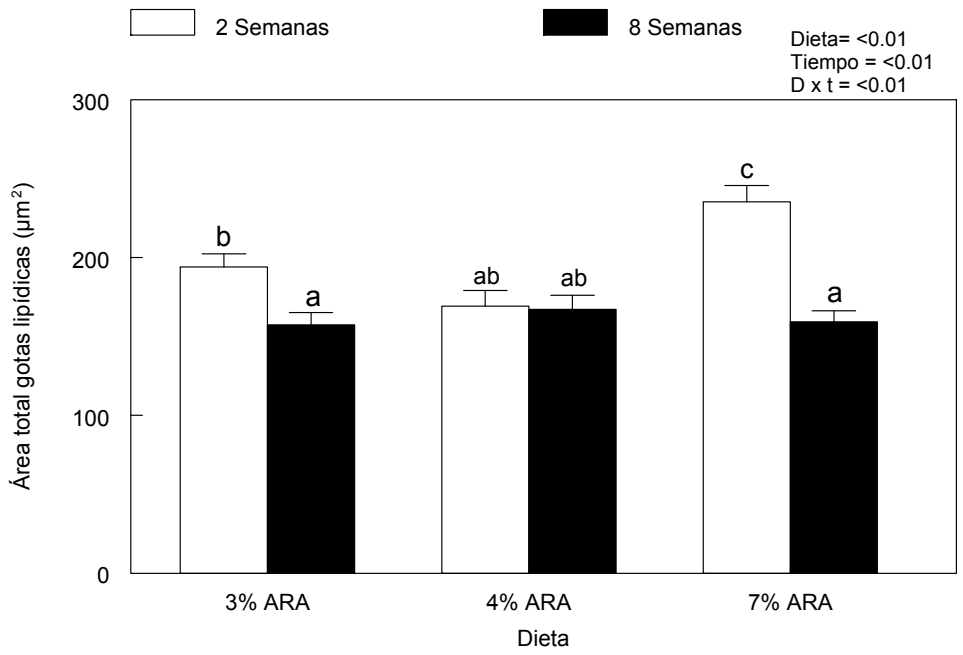

FIGURA 30. Área total de las gotas lipídicas (μm^2) de desoves de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) a las 2 y a las 8 semanas de tratamiento con una dieta rica en ARA. Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05) entre las medias de los tratamientos.

7.3.7 Longitud de larvas recién eclosionadas

La longitud total (mm) de las larvas recién eclosionadas (48 h) de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) fue mayor (P<0.01) en los desoves provenientes de reproductores alimentados con 4% ARA respecto a los organismos alimentados con 7% ARA y el grupo control (3% ARA) durante el primer mes de experimento (día 30) (Fig. 31).

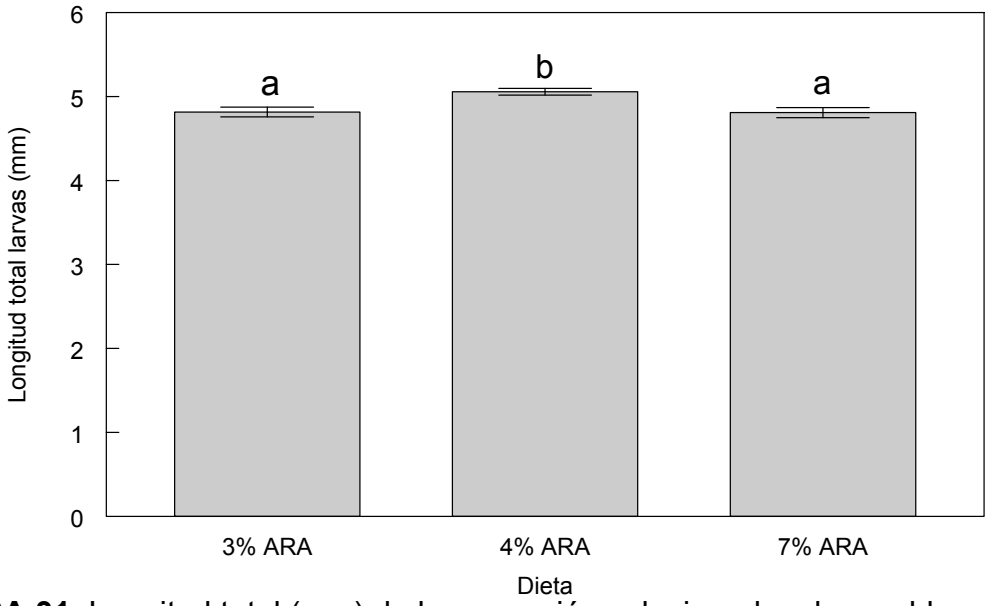

FIGURA 31. Longitud total (mm) de larvas recién eclosionadas de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*). Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0.05) entre las medias de los tratamientos.

7.3.8 Concentración espermática

La concentración espermática (10^9 cel ml^{-1}) de los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor)* evaluada al final de la etapa experimental (día 70) no fue estadísticamente diferente entre tratamientos (3%, 4% y 7%) (Fig. 32).

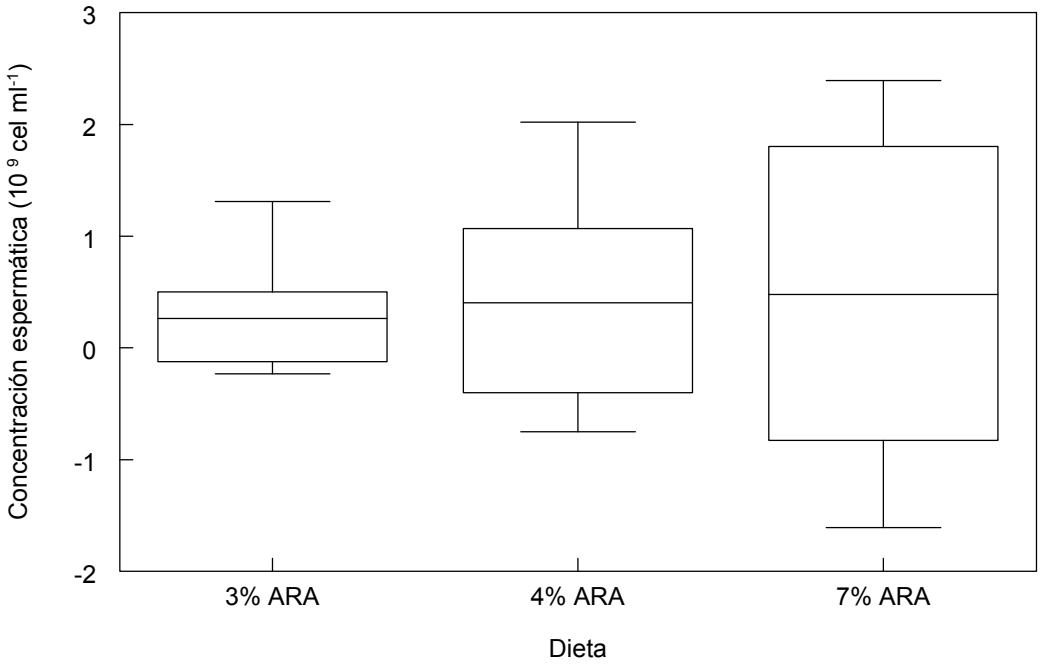

FIGURA 32. Concentración espermática (10^9 cel ml^{-1}) del pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

7.4 Composición de ácidos grasos de los desoves

7.4.1 Proporción de ácidos grasos en fosfolípidos y lípidos de reservas de huevos recién fertilizados durante la fase de aclimatación de los reproductores al sistema experimental

El nivel de 20:4n-6 en los fosfolípidos y lípidos neutros de los huevos recién fertilizados obtenidos durante la fase de aclimatación de los reproductores fue del 4%; mientras que el nivel de EPA fue del 1.5% en ambas fracciones. El nivel de DHA de los fosfolípidos fue del 29.7% mientras que en los lípidos neutros fue del 21.2% (Tabla XIII).

Tabla XIII. Proporción de ácidos grasos (%) en fosfolípidos y lípidos de reservas de los huevos recién fertilizados previo al inicio del período experimental (n=3).

Ácido graso	Fosfolípidos	Reservas
14:0	0.79±0.09	1.60±0.03
16:0	20.15±0.12	15.80±0.27
18:0	10.64±0.53	7.10±0.44
20:0	0.11±0.02	0.23±0.03
24:0	1.84±0.06	1.83±0.03
16:1n-9	1.15±0.10	4.17±0.53
16:1n-7	1.09±0.05	1.33±0.07
18:1n-9	12.81±0.23	13.40±0.27
18:1n-7	2.78±0.13	2.73±0.07
24:1n-9	0.23±0.02	0.47±0.03
18:2n-6	6.90±0.28	9.77±0.26
18:3n-6	0.69±0.03	1.50±0.06
18:3n-3	0.33±0.01	0.67±0.03
18:4n-6	0.10±0.01	0.20±0.00
20:2n-6	0.50±0.01	0.73±0.03
20:3n-6	1.90±0.12	1.50±0.00
20:3n-3	0.20±0.01	0.20±0.00
20:4n-6	4.15±0.21	4.20±0.23
20:5n-3	1.78±0.06	1.47±0.03
22:4n-6	0.08±0.03	0.17±0.03
22:5n-6	0.16±0.01	0.13±0.03
22:5n-3	0.20±0.02	0.20±0.00
22:6n-3	29.74±0.90	21.23±0.63
Σ SAT.	34.05±0.66	27.80±0.68
Σ MUFA	1.00± 0.42	24.03±0.90
Σ PUFA	46.93±1.10	48.17±1.58
(n-3)/(n-6)	2.20±0.07	1.30±0.00
22:6/20:5	16.68±0.06	14.30±0.10
20:4/20:5	2.34±0.18	2.83±0.13

7.4.2 Proporción de ácidos grasos en fosfolípidos de huevos recién fertilizados durante el experimento

Se observó un efecto significativo en relación al tiempo de tratamiento (2 y 8 semanas) sobre la proporción (%) de ácidos grasos de los fosfolípidos en huevos recién fertilizados de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) (Tabla XIV).

Los ácidos grasos 14:0 y 24:0 disminuyeron al final del período experimental (semana 8), mientras que el 18:0 presentó el efecto inverso. La proporción de monoinsaturados permaneció constante excepto para el 16:1n-9, el cual aumentó al final del experimento. El contenido de PUFA disminuyó al final del experimento, excepto para el 18:2n-6 y el 18:3n-6, los cuales aumentaron en relación al tiempo, mientras que otros como el 18:3n-3 permanecieron constantes. En términos del contenido de HUFA, se observó que la proporción de HUFA n-3, particularmente de EPA y DHA; disminuyó, mientras que la proporción de ARA aumentó al término del experimento (Fig. 33).

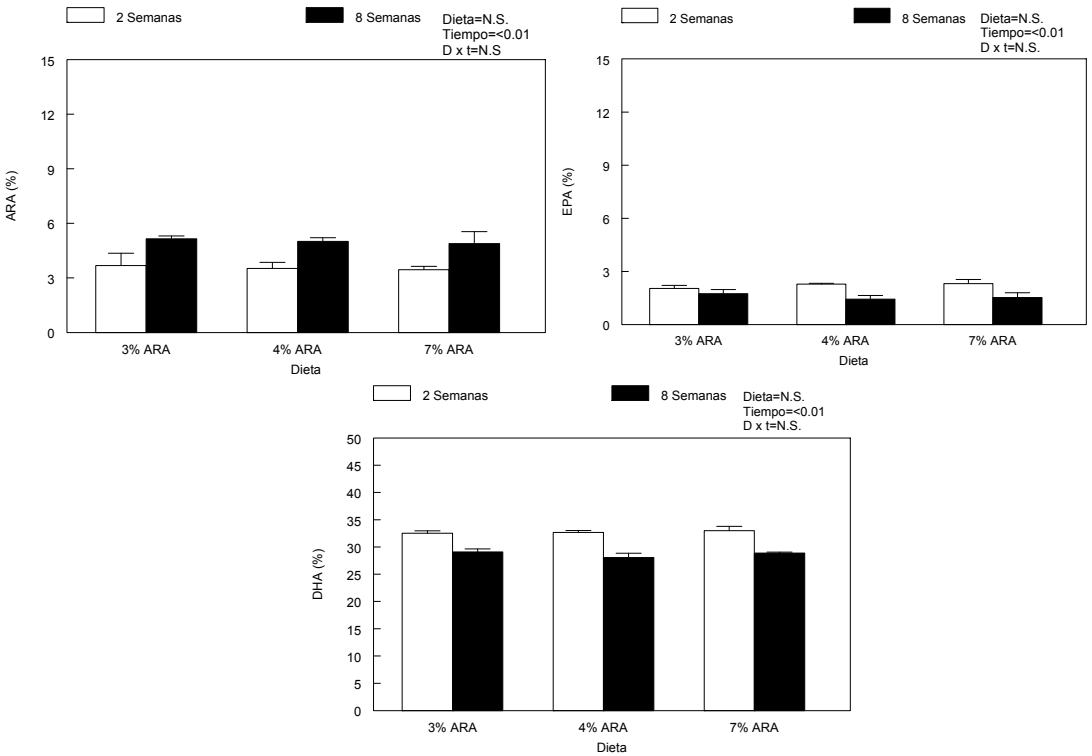

FIGURA 33. Proporción de HUFA (%) de los fosfolípidos de los huevos recién fertilizados del pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

Tabla XIV. Ácidos grasos (%) de los PL de los huevos recién fertilizados de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

Ácido graso	3% ARA	3% ARA	4% ARA	4% ARA	7% ARA	7% ARA	Dieta	Tiempo	D x t
	2 Semana	8 Semanas	2 Semanas	8 Semanas	2 Semanas	8 Semanas			
14:0	0.68±0.03	0.62±0.03	0.68±0.01	0.57±0.01	0.66±0.05	0.64±0.02	N.S.	**0.03**	N.S.
16:0	21.38±0.62	22.12±0.08	20.66±1.39	20.65±0.60	22.02±0.41	21.56±0.84	N.S.	N.S.	N.S.
18:0	8.35±0.68	9.97±0.12	8.23±0.77	9.45±0.36	8.19±0.47	10.10±0.68	N.S.	**<0.01**	N.S.
20:0	0.07±0.01	0.19±0.08	0.08±0.02	0.15±0.07	0.11±0.04	0.08±0.01	N.S.	N.S.	N.S.
24:0	2.04±0.25	1.57±0.11	1.97±0.17	1.42±0.18	2.0±0.03	1.37±0.12	N.S.	**<0.01**	N.S.
16:1n-9	0.95±0.03	2.13±0.27	1.14±0.08	1.60±0.23	0.84±0.09	2.05±0.34	N.S.	**<0.01**	N.S.
16:1n-7	0.97±0.09	1.08±0.02	0.98±0.10	0.97±0.07	1.22±0.05	1.07±0.04	N.S.	N.S.	N.S.
18:1n-9	12.68±0.31	11.05±0.23	12.72±0.69	12.55±0.72	12.07±0.18	12.38±0.21	N.S.	N.S.	N.S.
18:1n-7	2.31±0.04	2.40±0.14	2.30±0.07	2.73±0.25	2.40±0.12	2.63±0.22	N.S.	N.S.	N.S.
24:1n-9	0.39±0.06	0.30±0.08	0.24±0.07	0.22±0.05	0.21±0.07	0.22±0.05	N.S.	N.S.	N.S.
18:2n-6	6.95±0.06	7.21±0.22	6.74±0.51	9.19±0.90	6.67±0.38	7.61±0.30	N.S.	**0.02**	N.S.
18:3n-6	0.71±0.09	0.95±0.05	0.64±0.08	0.93±0.11	0.63±0.08	0.86±0.06	N.S.	**<0.01**	N.S.
18:3n-3	0.35±0.02	0.23±0.01	0.30±0.04	0.33±0.02	0.32±0.02	0.26±0.01	N.S.	N.S.	N.S.
18:4n-6	0.16±0.06	0.13±0.04	0.13±0.05	0.14±0.05	0.12±0.03	0.11±0.04	N.S.	N.S.	N.S.
20:2n-6	0.44±0.04	0.44±0.05	0.42±0.001	0.61±0.05	0.44±0.04	0.51±0.03	N.S.	N.S.	N.S.
20:3n-6	1.35±0.28	1.71±0.24	2.29±0.76	1.80±0.32	1.28±0.25	1.58±0.17	N.S.	N.S.	N.S.
20:3n-3	0.17±0.02	0.13±0.02	0.16±0.003	0.20±0.02	0.17±0.02	0.17±0.01	N.S.	N.S.	N.S.
20:4n-6	3.68±0.68	5.15±0.16	3.53±0.33	5.01±0.21	3.45±0.19	4.89±0.65	N.S.	**<0.01**	N.S.
20:5n-3	2.04±0.16	1.74±0.23	2.28±0.05	1.43±0.21	2.31±0.23	1.53±0.27	N.S.	**<0.01**	N.S.
21:4n-6	0.24±0.03	0.17±0.02	0.23±0.02	0.17±0.005	0.25±0.03	0.17±0.01	N.S.	**<0.01**	N.S.
22:4n-6	0.12±0.03	0.08±0.04	0.19±0.07	0.10±0.05	0.13±0.04	0.12±0.05	N.S.	N.S.	N.S.
22:5n-6	0.16±0.002	0.38±0.17	0.14±0.03	0.38±0.19	0.25±0.05	0.18±0.02	N.S.	N.S.	N.S.
22:5n-3	0.25±0.01	0.20±0.03	0.26±0.02	0.23±0.03	0.21±0.03	0.21±0.01	N.S.	N.S.	N.S.
22:6n-3	32.54±0.41	29.08±0.56	32.67±0.36	28.06±0.80	32.99±0.79	28.89±0.17	N.S.	**<0.01**	N.S.
Σ SAT	32.99±0.27	34.96±0.25	32.08±1.92	32.73±0.73	33.48±0.32	34.18±0.30	N.S.	N.S.	N.S.
Σ MUFA	0.52±0.08	0.46±0.03	0.56±0.05	0.63±0.07	0.57±0.11	0.39±0.12	N.S.	N.S.	N.S.
Σ PUFA	49.18±0.38	47.62±0.71	49.98±1.48	48.58±0.73	49.21±0.49	47.08±0.77	N.S.	**0.04**	N.S.
(n-3)/(n-6)	2.58±0.19	1.94±0.04	2.52±0.18	1.67±0.15	2.74±0.19	1.95±0.14	N.S.	**<0.01**	N.S.
22:6/20:5	16.10±1.04	17.57±3.04	14.33±0.15	20.18±2.11	14.48±1.14	20.01±2.99	N.S.	**0.03**	N.S.
20:4/20:5	1.84±0.44	3.12±0.56	1.55±0.17	3.60±0.37	1.50±0.08	3.46±0.86	N.S.	**<0.01**	N.S.
Total (mg g^{-1})	6.39±0.72	11.66±0.37	5.84±1.46	10.48±0.86	6.64±1.13	12.20±0.13	N.S.	**<0.01**	N.S.

7.4.3 Proporción de ácidos grasos en los lípidos de reserva de huevos recién fertilizados

Los niveles de 18:0, 18:1n-9, 22:1n-11, 22:1n-9, 20:2n-6, 18:2n-6, así como la relación n-3/n-6 y el contenido total de HUFA en los huevos recién fertilizados de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) fue afectado por el nivel de ARA (3%, 4% y 7%) y/o el tiempo de alimentación (2 semanas vs. 8 semanas) (Tabla XV). Los desoves de organismos alimentados con 4% y 7% ARA presentaron mayores niveles de 18:2n-6; pero mayores niveles de 22:6n-3 al final del periodo experimental (semana 8). Los niveles de 20:5n-3, 20:4n-6 y la relación ARA/EPA mantuvieron niveles constantes (Fig. 34). La relación de DHA/EPA aumentó al final del periodo experimental (semana 8).

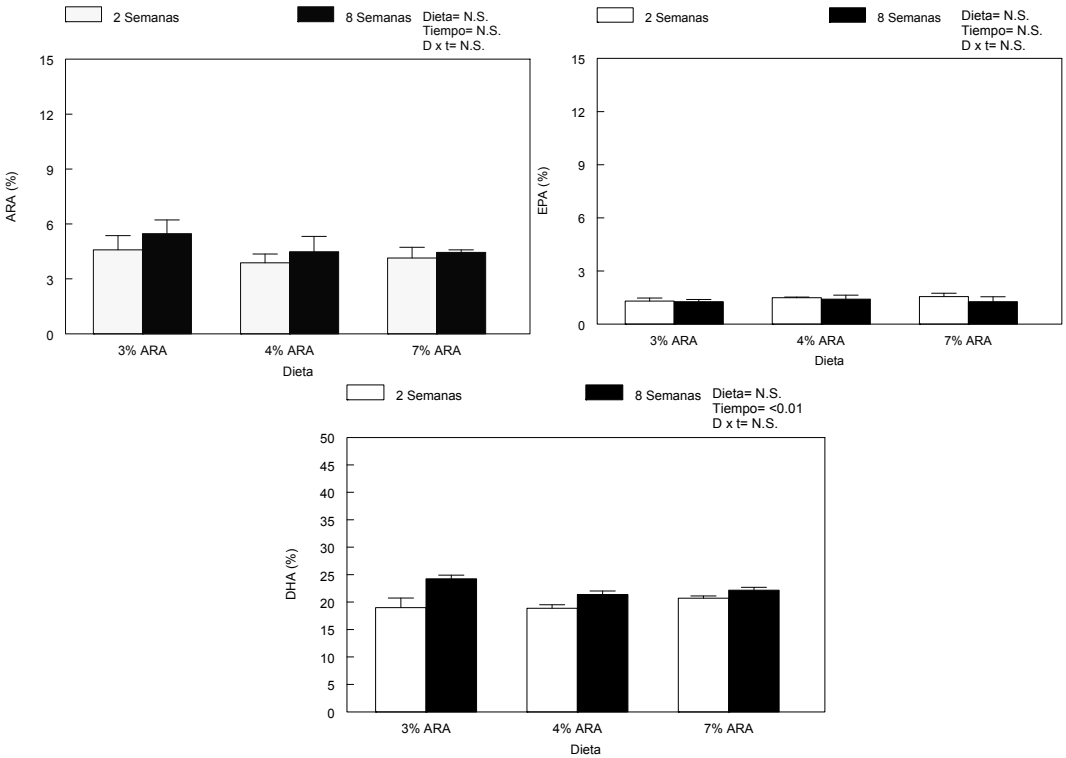

FIGURA 34. Proporción de HUFA (%) de los lípidos de reserva de los huevos recién fertilizados del pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

Tabla XV. Proporción de ácidos grasos (%) de los lípidos de reserva de los huevos recién fertilizados de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*).

Ácido graso	3% ARA	3% ARA	4% ARA	4% ARA	7% ARA	7% ARA	Dieta	Tiempo	D x t
	2 Semanas	8 Semanas	2 Semanas	8 Semanas	2 Semanas	8 Semanas			
14:0	1.37±0.13	1.28±0.12	1.48±0.09	1.21±0.10	1.36±0.07	1.23±0.13	N.S.	N.S.	N.S.
16:0	13.59±1.63	14.60±0.47	16.87±1.87	14.02±0.47	14.77±0.10	14.06±0.58	N.S.	N.S.	N.S.
18:0	**7.13±0.48[ab]**	**9.18±0.59[b]**	**7.64±0.19[ab]**	**6.41±0.81[a]**	**6.91±0.40[ab]**	**6.98±0.10[ab]**	**N.S.**	**N.S.**	**0.02**
20:0	0.49±0.22	0.21±0.09	0.32±0.15	0.13±0.00	0.31±0.10	0.14±0.03	N.S.	**0.03**	N.S.
24:0	1.48±0.06	1.51±0.06	1.48±0.07	1.58±0.20	1.62±0.06	1.45±0.09	N.S.	N.S.	N.S.
16:1n-9	3.68±0.38	3.47±0.48	4.49±0.46	3.43±0.52	4.01±0.12	3.24±0.84	N.S.	N.S.	N.S.
16:1n-7	1.40±0.36	1.47±0.03	1.86±0.45	1.26±0.03	1.20±0.06	1.01±0.44	N.S.	N.S.	N.S.
18:1n-9	**11.34±0.66[b]**	**4.55±2.67[a]**	**11.25±0.13[b]**	**12.10±0.49[b]**	**10.6±0.35[b]**	**11.17±0.24[b]**	**0.03**	**N.S.**	**0.02**
18:1n-7	2.20±0.19	4.91±2.28	2.54±0.09	2.78±0.23	2.40±0.10	2.59±0.23	N.S.	N.S.	N.S.
20:1n-11	0.54±0.07	0.74±0.23	0.55±0.03	0.43±0.15	0.48±0.00	0.66±0.03	N.S.	N.S.	N.S.
18:2n-6	**7.58±1.07[a]**	**7.91±0.20[ab]**	**7.72±0.38[a]**	**12.03±0.43[c]**	**7.69±0.12[a]**	**10.53±0.15[bc]**	**<0.01**	**<0.01**	**0.02**
18:3n-6	1.13±0.27	1.96±0.03	1.15±0.12	2.04±0.03	1.18±0.06	2.06±0.12	N.S.	**<0.01**	N.S.
18:3n-3	0.58±0.09	0.50±0.07	0.56±0.00	0.77±0.03	0.55±0.03	0.64±0.03	N.S.	N.S.	N.S.
20:2n-6	0.47±0.07	0.60±0.06	0.58±0.03	0.78±0.00	0.53±0.07	0.75±0.03	**0.03**	**<0.01**	N.S.
20:3n-6	1.41±0.24	1.32±0.06	1.34±0.13	1.32±0.12	1.00±0.30	1.28±0.09	N.S.	N.S.	N.S.
20:4n-6	4.58±0.78	5.47±0.75	3.88±0.48	4.48±0.84	4.14±0.58	4.44±0.15	N.S.	N.S.	N.S.
20:5n-3	1.30±0.17	1.26±0.13	1.49±0.03	1.40±0.23	1.55±0.19	1.26±0.29	N.S.	N.S.	N.S.
22:5n-6	0.58±0.22	0.14±0.07	0.43±0.07	0.14±0.06	0.46±0.09	0.14±0.03	N.S.	**<0.01**	N.S.
22:5n-3	0.47±0.19	0.18±0.07	0.18±0.07	0.12±0.00	0.31±0.12	0.14±0.00	N.S.	**0.04**	N.S.
22:6n-3	19.0±1.75	24.23±0.67	18.87±0.64	21.37±0.67	20.72±0.41	22.18±0.51	N.S.	**<0.01**	N.S.
Σ SAT.	25.17±1.10	27.9±1.23	28.99±1.84	24.24±2.70	26.04±0.41	24.78±0.90	N.S.	N.S.	N.S.
Σ MUFA	22.75±0.47	17.31±1.50	22.74±0.44	21.27±0.87	21.52±0.46	20.25±0.98	N.S.	**<0.01**	N.S.
Σ PUFA	52.08±1.56	54.79±2.31	48.27±2.20	54.49±0.67	52.44±0.87	54.96±1.85	N.S.	**0.02**	N.S.
Σ HUFA	26.59±0.67	31.66±1.63	25.38±1.02	27.76±0.54	27.62±0.52	28.49±0.18	**0.04**	**<0.01**	N.S.
(n-3)/(n-6)	**1.33±0.07[ab]**	**1.48±0.03[ab]**	**1.37±0.09[ab]**	**1.14±0.09[a]**	**1.53±0.15[b]**	**1.25±0.03[ab]**	**N.S.**	**N.S.**	**0.04**
22:6/20:5	14.67±0.46	19.81±2.20	12.67±4.36	15.89±2.18	13.79±1.72	19.42±3.92	N.S.	**0.02**	N.S.
20:4/20:5	3.75±1.06	4.34±0.09	2.62±0.34	3.55±1.23	2.83±0.66	3.81±0.60	N.S.	N.S.	N.S.
Total (mg g^{-1})	---	7.89±0.95	---	7.15±0.45	---	8.45±1.10	N.S.	---	---

7.5 Contenido de ARA en gónadas y relación con capacidad reproductiva

Se observó una correlación positiva entre la proporción de ARA en los fosfolípidos y la concentración de PGE_2 en gónada de machos (r=0.65, P<0.01), pero no así en hembras. La proporción de ARA en las reservas de las gónadas también estuvo correlacionada con la concentración de PGE_2 en gónada de machos (r=0.70, P<0.01), sin relación en hembras. Por otro lado, en las hembras se observó una correlación positiva entre el tamaño de las gónadas (IGS, %) y el tamaño del hígado (IHS, %) (r=0.47, P<0.05); mientras que en los machos no se observó dicha relación.

7.6 Relación entre composición del huevo y calidad del desove

El contenido ácidos grasos totales (mg g^{-1}) en las reservas de los huevos de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) presentó correlaciones bajas pero significativas con el diámetro de los huevos (r=0.26 P<0.05) y con la tasa de eclosión de los desoves (r=0.23, P<0.05).

El contenido de ARA (mg g^{-1}) en los fosfolípidos de los huevos presentó una correlación baja pero significativa con la tasa de fertilización de los desoves (r=0.23, P<0.05); mientras que el contenido de ARA (mg g^{-1}) de los lípidos de reserva presentó una correlación baja pero significativa con la tasa de eclosión de los huevos (r=0.23, P<0.05).

8. DISCUSIÓN

El presente trabajo sugiere que los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) presentan diferencias importantes en el metabolismo del ARA entre sexos. El ARA afecta el crecimiento somático y el perfil bioquímico de las gónadas, estimulando un ligero aumento en el nivel de ARA de los fosfolípidos (PL) en los desoves hacia el final de la temporada reproductiva. Dado que un período de alimentación de 10 semanas con ARA fue suficiente para inducir una respuesta a nivel bioquímico y fisiológico en los reproductores, es posible inferir que el pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) presenta una rápida asimilación de los HUFA de la dieta para el constante desarrollo de los ovocitos. Otros desovadores múltiples como el pez cebra (*D. rerio*) (Jaya-Ram *et al*., 2008), la dorada (*S. aurata*) y la lubina europea (*D. labrax*) (Fernández *et al*., 1995; 1997) requieren períodos de alimentación con HUFA de 3 a 12 semanas para estimular la actividad reproductiva y la calidad del desove, a diferencia de desovadores totales como los salmónidos, los cuales requieren períodos de alimentación con HUFA prolongados (2 meses o más) previo a la vitelogénesis para observar cambios a nivel reproductivo y/o la calidad de los desoves (Izquierdo *et al*., 2001).

8.1 Desempeño en cultivo de los reproductores

En el presente estudio, aunque no se detectaron diferencias estadísticas, se observó que las hembras presentan una tendencia a menores tasas de supervivencia (66 al 76%) respecto a los machos (91 al 96%) hacia el final del período experimental

(semana 10). Es posible que las hembras comprometan su supervivencia durante la reproducción, como se ha descrito en poblaciones silvestres del pez blanco del Atlántico (*M. menidia*) y el espinoso (*G. aculeatus*) pero no para el plateadito (*M. beryllina*) (Huber y Bengtson, 1999). Una hipótesis, es que las hembras de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) presenten mayor susceptibilidad al estrés y/o comprometan el sistema inmune, en respuesta a un esfuerzo reproductivo mayor sin que éstas suspendan su alimentación durante la reproducción, como ocurre en el salmón del Atlántico (*S. salar*) (Jonsson *et al.,* 2006).

Por otro lado, se observó una disminución en el peso corporal de los reproductores al final del presente estudio (semana 10), el cual fue mayor en las hembras (12%, Fig. 13) respecto a los machos (5%). En particular, los machos presentaron un ligero aumento de peso al ser alimentados con 4% de ARA (5%, Fig. 15). La ausencia o escaso crecimiento somático en reproductores ha sido reportado en el pez blanco del Atlántico (*M. menidia)* (Huber y Bengtson, 1999), el plateadito (*M. beryllina*) (Huber y Bengtson, 1999) y la perca (*Perca fluviatilis*) (Huntingford *et al.,* 2001). En el caso del pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) se desconoce la tasa de ingesta de alimento durante el período reproductivo, por lo que se requiere evaluar si en la especie existe un aumento de peso al inicio de la temporada reproductiva debido a la acumulación de reservas energéticas, como ocurre en el plateadito (*M. beryllina*) (Huber y Bengtson, 1999) y otros desovadores parciales como la macarela del Atlántico (*S. scombrus*) (Harel *et al.,* 1994), el bagre asiático (*C. batrachus*), el bacalao del Atlántico (*G. morhua*) y la dorada (*S. aurata*) (Trillard *et al.,* 2002). En la mayoría de los peces

teleósteos una inhibición y/o disminución de crecimiento somático durante el período reproductivo es un fenómeno asociado a una alta demanda energética para la maduración de las gónadas y el desarrollo de los gametos, la cual en general, es mayor en tropicales que en especies de zonas frías o templadas (Blanchard *et al.,* 2005).

De lo anterior se desprende que probablemente la pérdida de peso de las hembras de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) se deba a una mayor demanda energética para la incorporación de nutrientes a los ovocitos en desarrollo (vitelogénesis) (Huntingford *et al.,* 2001). Asimismo, es posible que las hembras de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) al presentar desoves múltiples, presenten mayores requerimientos energéticos que los machos durante la temporada reproductiva. Los requerimientos de reservas bioquímicas (lípidos, proteínas y carbohidratos), particularmente en las hembras, aumentan considerablemente previo o durante la maduración gónadica y la gametogénesis (Huntingford *et al.,* 2001; Trillart *et al.,* 2002; Blanchard *et al.,* 2005). En el presente estudio, se observó que el tamaño de las gónadas (IGS, %) (Fig. 18) de las hembras de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) incrementa en relación al tamaño del hígado (IHS, %) (Fig. 17). En el presente estudio sólo se puede sugerir que durante la maduración de las gónadas, no existe una transferencia importante de reservas bioquímicas del hígado a la gónada; sin embargo, se requieren estudios más detallados sobre la utilización de las reservas bioquimicas en diferentes tejidos de ambos sexos previo y/o durante el período reproductivo para poder verificarlo. En consecuencia, se utilizó como covariable el IGS (%) de los organismos con el fin de

reducir el posible efecto de la maduración de las gónadas sobre las variables bioquímicas evaluadas. Se observó mayor contenido de carbohidratos (30.1 vs. 5.2 mg g^{-1}), pero menor de lípidos (76 vs. 102 mg g^{-1}) y proteínas (402 vs. 485 mg g^{-1}) en las gónadas de las hembras respecto a los machos (Figs. 19, 20 y 21). El menor contenido de carbohidratos en las gónadas de los machos de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) posiblemente se deban a su utilización como fuente energética preferencial durante la espermatogénesis; mientras que en las hembras, es posible que exista una mayor acumulación de carbohidratos durante el período post desove, como una estrategia para asegurar la disponibilidad de lípidos (lipogénesis) para el siguiente desove como se ha reportado en hembras de salmón (*Salmo* spp.) (Luquet y Watanabe, 1986). En hembras de desovadores parciales como el bonito (*Sarda sarda*) (Zaboukas *et al.,* 2006) se ha observado una disminución de los lípidos y las proteínas en las gónadas al final del período reproductivo. En las hembras de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) no se presentaron diferencias en el tamaño de gónadas (IGS, %) y/o tamaño de hígado (IHS, %) en relación al nivel de ARA en la dieta, a pesar de que un nivel alto de ARA (7%) en la dieta estimulara una mayor producción de huevos. Es posible que las hembras contrarresten la demanda constante de nutrientes durante la producción constante de desoves al: a) aumentar la ingesta de alimento; b) asimilar rápidamente los nutrientes de la dieta y/o; c) almacenar la mayor cantidad posible de nutrientes en las reservas previo a la temporada reproductiva.

8.1.1 Requerimientos de ARA en reproductores

Estudios previos reportaron una deficiencia de ARA en los reproductores cultivados de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*), señalando una posible relación con las baja calidad de los desoves y/o supervivencia de las hembras (Palacios *et al.,* 2007). En el presente estudio se observó que un suplemento de ARA en la dieta de los reproductores cultivados podría estimular estimular una mayor actividad reproductiva e incrementar la calidad de los desoves, y que la alimentación con ARA no afecta significativamente la supervivencia o crecimiento de los reproductores (Fig. 12). Las hembras alimentadas con los mayores niveles de ARA (4% y 7%) presentaron un aumento en el contenido de lípidos en las gónadas y mayor producción de huevos, así como una tendencia a producir mayor número de desoves. Es importante considerar que enriquecer la artemia adulta (*A. franciscana*) con distintos niveles de ARA (0%, 3 y 16%) produjo artemias con 2.9%, 3.9% y 6.6% de ARA. Esto posiblemente se debe a que la artemia adulta (*A. franciscana*) incorpora de forma preferencial algunos ácidos grasos y utiliza otros para mantener estables sus propios niveles; así, se logró enriquecer solo al doble la proporción de ARA en artemia con la emulsión de 16% de ARA en comparación con el control, en el cual se utilizó una emulsión carente de ARA (0% ARA) (Tabla IV). Por ende, en el presente trabajo, no se pueden considerar los niveles del enriquecimiento con ARA (0%, 3% y 16%) como base de los requerimientos de pez blanco de Pátzcuaro, dado que los reproductores ingirieron en realidad artemias con valores distintos. Pero si se observó que los tratamientos con mayores niveles de ARA (4% y 7%) produjeron mejores resultados en las hembras,

mientras que en los machos, los mejores resultados se observaron con un 4% de ARA en la dieta. Por ende, se sugiere un estudio para evaluar los requerimientos reales de los reproductores y analizar el efecto real de una deficiencia de ARA total (0% ARA) en la dieta de los organismos, usando un diseño experimental sin artemia, dada su regulación de los niveles de ARA.

Por otro lado, el efecto del ARA sobre la respuesta al estrés y la supervivencia de los peces teleósteos es aún contradictorio, y a la fecha, no existen estudios que evalúen el efecto de ARA sobre el crecimiento, control hormonal y/o respuesta al estrés durante la reproducción. La alimentación con ARA (0.6 a 5.9 mg g^{-1}, peso seco) estimula la supervivencia en larvas de dorada (*S. aurata*) sometidas a estrés, pero si éste es continuo, el crecimiento de las larvas disminuye (Koven *et al.,* 2003), aunque algunos estudios reportan que niveles bajos de ARA en la dieta (0.1 al 1.0%, peso seco) estimulan el crecimiento (Bessonart *et al.,* 1999). En juveniles de dorada (*S. aurata*) no ha observado un efecto del ARA en la dieta (0.2% a 11.2% de ARA, total de ácidos grasos) sobre el crecimiento (Fountoulaki *et al.,* 2003), pero juveniles de rodaballo (*S. maximus*) (Castell *et al.,* 1994; Bell y Sargent*,* 2003) presentan mejor crecimiento y/o supervivencia al ser alimentados con niveles bajos de ARA (0.2 a 0.8%, peso seco) (Dantagnan *et al.,* 2008). En juveniles de trucha arcoiris (*O. mykiss*), el ARA (0.2, 0.3, y 0.85%) estimula el crecimiento y supervivencia de organismos (Dantagnan *et al.,* 2008). En adultos de dorada (*S. aurata*) y la tilapia (*O. mossambicus*), el ARA (0.9 a 2.4% y 3%, respectivamente) promueve niveles

constantes de cortisol en organismos sometidos a un estrés por confinamiento (Van Anholt *et al.,* 2004a; 2004b).

En relación al efecto del ARA en la dieta sobre la acumulación de reservas bioquímicas, se observaron niveles de proteínas menores en gónadas de reproductores alimentados con 7% de ARA (Fig. 21), mientras que el contenido de lípidos fue menor en reproductores alimentados con 3% de ARA (Fig. 20), sin efecto sobre carbohidratos (Fig. 19). Dado que las hembras alimentadas con 7% de ARA produjeron más huevos (Fig. 26); el mayor esfuerzo reproductivo podría haber estimulado una disminución de proteínas en gónadas al final del período experimental. Si este es el caso, se podría proponer que la dieta comercial combinada con artemia adulta sin enriquecer no satisface en su totalidad los requerimientos de proteínas y lípidos de los reproductores sometidos a una reproducción continua. Debido a ello, resulta necesario evaluar el consumo de alimento en ambos sexos utilizando tanques monosexuales para determinar si dicha variable afecta el peso y desempeño de hembras durante el período reproductivo.

En las gónadas de las hembras alimentadas con 4% y 7% de ARA se observó una mayor acumulación de lípidos en comparación con el grupo control (3% ARA), aún si una mayor cantidad de lípidos fue transferida a los ovocitos, como lo sugiere un mayor tamaño de gotas lipídicas en los desoves de dichos tratamientos. Dado que las emulsiones utilizadas para enriquecer la artemia adulta (*A. franciscana*) eran iso-lipídicas, se concluye que el ARA promovió una mayor acumulación y transferencia de

lípidos totales en las gónadas de los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*), lo cual podría deberse a:

1) Una inhibición de la síntesis de ARA en organismos alimentados con 4% y 7% de ARA, que implicaría un menor costo metabólico, y/o una mayor acumulación de reservas como se discute en la siguiente sección.
2) Un efecto modulador del ARA sobre el nivel de la síntesis de PG_2 y posiblemente, otras hormonas, como el cortisol. Las PG_2; modulan el cortisol, si éste último incrementa puede estimular un mayor depósito de grasa en el organismo. El efecto del ARA sobre las PG_2 se discute más adelante.

8.1.2 Ácidos grasos en reservas y fosfolípidos de gónadas

En el presente estudio, el nivel de DHA en las gónadas de los reproductores cultivados (30%) (Figs. 22 y 23) fue mayor al nivel de DHA reportado en gónadas de reproductores silvestres (24 a 26%) (Aparicio, 2004). La relación DHA:EPA en los PL de las gónadas de las hembras (22:1) y machos (21:1) de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) cultivados es similar, mientras que la relación DHA:EPA en los PL de las gónadas de hembras y machos silvestres es de 8:1 y 17:1, respectivamente. El nivel de EPA en las reservas (1.2%) y PL (1.6%) de las gónadas no difiere significativamente entre sexos, y aunque es menor al nivel de EPA reportado en organismos silvestres (3%) (Aparicio, 2004), presenta un valor similar a lo reportado para especies de agua dulce (1 al 3%), considerablemente menor a lo reportado para especies marinas (10 al 15%), lo que sustenta que no existe una deficiencia de EPA en los organismos cultivados. Sin embargo, es posible que los reproductores

cultivados presenten un desbalance en la relación DHA:EPA debido a un aumento de DHA y/o disminución en el nivel de EPA, lo cual puede afectar negativamente la calidad de la progenie (Sargent *et al.,* 1999).

En términos de proporción, un nivel mayor de DHA (36%) en los PL de gónadas de las hembras respecto a los machos (32%) (Fig. 22) sugiere que en las hembras existe una mayor acumulación o retención de este ácido graso, posiblemente para su incorporación a los ovocitos y su posterior utilización durante el desarrollo del sistema nervioso y ocular de embriones y larvas (Watanabe *et al.,* 1993). Alternativamente, se sugiere que los niveles menores de DHA en los machos estén asociados a la constante producción de esperma dada la importancia de este ácido graso en la actividad y función de las membranas plasmáticas del espermatozoide y su motilidad. Lo anterior, coincide con una mayor concentración de EPA (2.2 mg g^{-1}) y DHA (46.6 mg g^{-1}) en los PL de las gónadas de las hembras en comparación con el contenido de EPA (1.2 mg g^{-1}) y DHA (38.3 mg g^{-1}) de los machos (Tabla XI). Se observó que el nivel de EPA y DHA de los PL no fue afectado por el nivel de ARA en la dieta, mientras que el nivel de DHA de las reservas de las gónadas de ambos sexos (Fig. 23) disminuyó en relación al nivel de ARA en la dieta de los reproductores, lo cual sugiere una mayor transferencia de DHA a los gametos. Paradójicamente, el nivel de ARA en las gónadas de los reproductores no fue afectado por el nivel de ARA en la dieta, pero si su concentración en los lípidos de reserva, observándose un mayor contenido de ARA en los machos alimentados con 4% de ARA (Tabla XII).

En la actualidad, no existen estudios que analicen el nivel de ARA en los PL y lípidos de reserva de peces de agua dulce durante la temporada reproductiva; sin embargo, el alto nivel de ARA registrado en el tejido gonádico del pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) (aprox. 8%) concuerdan con el nivel de ARA (5.5 a 10%) reportado en tejidos y/o desoves de especies marinas tropicales como el pargo (*Lutjanus argentimaculatus*), el pez conejo (*S. guttatus* y *S. canalicutatus*), el jurel rayado (*Carans fulvoguttatus*) y la trucha coral (*P. leopardus*) (Emata *et al.,* 2003; Ogata *et al.,* 2004). Es interesante que el nivel de ARA en los PL de las gónadas de los reproductores cultivados de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) presenta un nivel similar en ambos sexos (8 a 8.5%), considerablemente menor al nivel de ARA en hembras (12%) y machos silvestres (11%). Asimismo, el nivel de ARA en los lípidos de reserva de las gónadas de hembras (5.5%) y machos (9.9%) cultivados es menor al nivel observado en hembras (7%) y machos (14%) silvestres (Aparicio, 2004). Lo anterior sugiere que los reproductores cultivados están invirtiendo una mayor cantidad del ARA de los PL y los lípidos de reserva de las gónadas, probablemente para síntesis de eicosanoides, la actividad reproductiva y/o producción de gametos. Un menor contenido de ARA en los lípidos de reserva de las gónadas de las hembras (5 a 7%) en comparación con los machos (11 a 14%) podrían indicar que el ARA se transfiere hacia los PL para aumentar la síntesis de PG_2 durante el desove y la atracción de machos (Moore *et al.,* 2002) como una estrategia para aumentar la probabilidad de fertilización de los desoves. Sin embargo, no se descarta un posible efecto de las condiciones inherentes al cultivo, el tiempo en el que se obtuvieron las

muestras, la dieta, entre otros factores que comprometan el nivel de ARA incorporado a las gónadas.

Los niveles de ARA reportados en las gónadas de los reproductores no concuerdan con la hipótesis de que un suplemento de ARA en la dieta (4% y 7%) estimularía un mayor contenido de este ácido graso en las gónadas de las hembras, particularmente en los lípidos de reserva. Por ende, es posible que la regulación del nivel de ARA en PL y lípidos de reserva del tejido reproductivo de las hembras sea un proceso altamente selectivo durante la temporada reproductiva e independiente al nivel de ARA en la dieta. Por lo tanto, se propone evaluar el efecto del nivel de ARA en la dieta sobre la acumulación diferencial de ARA en el tejido adiposo e hígado así como en otros tejidos (branquias, retina, cerebro y corazón), en los cuales existe por lo general, mayor requerimiento de ARA para procesos específicos como la actividad de cromatóforos, la osmorregulación, la respuesta inmune, la actividad del hipotálamo y la hipófisis, entre otros (Lands, 1991).

La mayor producción de huevos en los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) alimentados con mayor nivel de ARA (4% y 7%) (Fig. 26) sugiere que el contenido de ácidos grasos en las gónadas se incrementa previo y/o durante la vitelogénesis; y disminuye en el período post-desove. Lo anterior indica la importancia de evaluar el estadio de desarrollo de los ovocitos en las muestras de gónada utilizadas para el análisis de ácidos grasos. En contraste, la acumulación y transferencia de ácidos grasos durante la espermatogénesis no presenta variaciones tan evidentes. En cualquier caso, el perfil de HUFA del pez blanco de Pátzcuaro (*M.*

estor) se asemeja más al de especies dulceacuícolas, que al de marinas. Sin embargo, si se compara el perfil de HUFA n-6 de organismos cultivados con silvestres se observa que si la especie presenta capacidad de síntesis de HUFA n-6, ésta no es suficiente para satisfacer sus requerimientos en condiciones de cultivo, y específicamente, para revertir los efectos de una producción constante de desoves sobre la calidad de los huevos.

8.1.3 Capacidad de síntesis de HUFA n-6

Dado que el pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) es una especie dulceacuícola, es posible que presente la capacidad de sintetizar HUFA (Sargent *et al*., 1995b). En especies dulceacuícolas de zonas templadas se ha sugerido que un aporte de 0.5 a 1% de 18:3n-3 y 18:2n-6 en la dieta es suficiente para inducir síntesis de HUFA (Tocher, 2008); y en especies tropicales como las tilapias *O. niloticus* y *Tilapia zilli* los requerimientos de 18:2n-6 o 20:4n-6 son mayores (3 al 5%) para el crecimiento y la reproducción (Santiago y Reyes, 1993). En el presente estudio, un aumento de 6 a 9.5 veces en el nivel de 18:2n-6 en las gónadas de reproductores cultivados de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) respecto al nivel de 18:2n-6 reportado por Aparicio (2004) en poblaciones silvestres indicaría que un suplemento de ARA en la dieta inhibió su síntesis a partir del 18:2n-6. En contraste, un nivel de 18:3n-3 de 2 a 3 veces menor en las gónadas de los reproductores cultivados respecto a su nivel en organismos silvestres, sugiere que una mayor estimulación reproductiva inducida por 4% y 7% de ARA en la dieta estimuló una mayor utilización de 18:3n-3 para sintetizar

EPA y DHA. Por lo tanto, si el pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) presenta capacidad de síntesis de HUFA, es posible que a diferencia de otras especies dulceacuícolas, los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) cultivados presenten requerimientos mayores a 0.5 a 1% de 18:3n-3 y 18:2n-6 (Tocher, 2008). En cualquier caso, se sugiere evaluar la actividad de desaturasas y elongasas para la síntesis de HUFA a partir de precursores PUFA en el pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) dado que algunos autores mencionan que los requerimientos de HUFA se incrementan considerablemente durante la reproducción y en condiciones de cultivo (Luquet y Watanabe, 1986) y en algunas especies, dichos requerimientos no son cubiertos en su totalidad por la actividad de las elongasas y/o desaturasas.

Un mayor contenido de 18:2n-6 en los PL de las gónadas de los machos (18%) respecto a las hembras (9.5%), sugiere que los requerimientos de HUFA n-6 en machos fueron cubiertos por 4% y 7% de ARA en la dieta, al menos durante las primeras etapas de la temporada reproductiva (3 meses) (Tablas XI);en contraste con que las hembras, las cuales parecen presentan mayor requerimiento de HUFA n-6 que los niveles ofrecidos en la dieta, y que por tanto, están utilizando el 18:2n-6 de sus PL de las gónadas para alcanzar un nivel de ARA similar (8.3%) al de los machos (8.8%). Lo anterior podría ser una de las razones del por qué los desoves del pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) presentan bajo nivel de ARA (4%) respecto a las poblaciones silvestres (9%) (Palacios *et al.,* 2007) y que por lo tanto, los requerimientos de los reproductores cultivados pudieran ser aún mayores al de las poblaciones silvestres. Lo anterior posiblemente se debe a que la especie presenta

alta vulnerabilidad al estrés, cuyos efectos, podrían intensificarse durante el período reproductivo. Por lo tanto, se sugiere evaluar la composición de PUFA en las gónadas de las hembras y machos cultivados al inicio del período reproductivo y no sólo al final, con el fin de inferir los requerimientos de ARA para los reproductores cultivados.

Finalmente, el origen marino del pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) sugiere que éste adquirió en los últimos 2.5 millones de años aprox. la capacidad de sintetizar ácidos grasos a partir de sus precursores de 18 carbonos presentes en la dieta zooplantófaga de su medio dulceacuícola, consistente en larvas de insectos e invertebrados del lago de Pátzcuaro, ricos en HUFA (12% DHA, 13% EPA y 4% ARA) (Aparicio, 2004). Por otro lado, el pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) es una especie zooplanctófaga durante sus primeros estadios de vida, mientras que en etapa adulta se alimenta ocasionalmente de peces y crustáceos pequeños (Martínez *et al.,* 2002; 2008). Dado que durante su etapa adulta y en particular, durante la etapa reproductiva la especie presenta mayores requerimientos de HUFA n-3 y n-6 que al no ser cubiertos por su capacidad de síntesis a partir de los precursores de 18 carbonos, podrían ser cubiertos a través de la ingesta de peces y crustáceos, fuentes ricas de HUFA. Lo anterior cobra interés en relación a reportes de que en diversas especies de peces y otros vertebrados se ha observado que la capacidad de síntesis de HUFA disminuye conforme al aumento de la edad de los organismos (Tocher, 2008).

8.2 Capacidad Reproductiva

8.2.1 Contenido de PGE_2 en las gónadas de reproductores

En los peces, el efecto de las PG_2 se ha enfocado a su papel en la ovulación, el desove y su uso como feromonas. El sustrato preferencial de la PGE_2 es el ARA y su síntesis puede ser inhibida por altos niveles de EPA y DHA (Asturiano *et al.,* 2000). En el tejido reproductivo, la actividad de las ciclooxigenasas (COX) se encuentra regulada por los niveles de algunas hormonas como las gonadotropinas y el cortisol, entre otros (Cheng *et al.,* 2005). La mayoría de los estudios referentes a las PG_2 en peces se han realizado en hembras sin comparar con el nivel de PG_2 en los machos de la misma especie. Este es el primer estudio en considerar dicho aspecto. Se registró un contenido menor de PGE_2 en las gónadas de las hembras respecto a los machos (245 pg g^{-1}vs. 373 pg g^{-1}). El análisis de la concentración de PGE_2 en las gónadas de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) se realizó utilizando como covariable al IGS con el fin de minimizar el efecto del estadio de maduración sobre dicha variable (Fig. 24). Estudios previos reportan que el grado maduración de las gónadas de hembras de peces teleósteos afecta el nivel de PGE_2, dado que éste por lo general, aumenta significativamente durante la maduración final de lo ovocitos, período en el cual las hembras liberan abundantes cantidades de PG_2 en la orina y/o fluido ovárico para atraer a los machos y la contracción del los sacos ováricos durante la ovulación y el desove (Moore *et al.,* 2002; Laberge y Hara, 2003). Asimismo, en algunos peces como el pez dorado (*C. aureatus*) se ha observado que el nivel de PGE_2 es altamente variable en función del tiempo, alcanzando los niveles más altos previo a la

maduración final de los ovocitos, descendiendo drásticamente durante la ovulación y las primeras 24 horas posteriores a la ovulación (Cetta y Goetz, 1982), mientras que en truchas (*Oncorhynchus* spp.) los niveles de $PGF_{2\alpha}$ aumentan durante la ovulación y se mantienen estables en las gónadas de las hembras durante los 5 a 7 días posteriores a la ovulación (Goetz y Cetta, 1983). Lo anterior sugiere un patrón en el nivel de PG_2 altamente variable en los diferentes estadios de desarrollo de los ovocitos y una respuesta altamente especifica entre especies (Ruggeri y Thoroughgood, 1985). Asimismo, se debe considerar el patrón de desarrollo de los ovocitos de la especie (sincrónico o asincrónico), dado que esta variable determina la coexistencia de 2 o más estadios de maduración en un momento dado en las gónadas de las hembras; por tanto, podría ser que la incorporación activa de HUFA y PG_2 en los ovocitos presente un patrón diferencial de acuerdo a la zona de la gónada utilizada para el análisis (anterior, media o posterior). Por ejemplo, los ovocitos en vitelogénesis, presentan una incorporación de HUFA activa, mientras que ovocitos en maduración final, presentan el contenido total de HUFA. Es posible también que exista un patrón diferencial en la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de ARA en zonas específicas de las gónadas del pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) y/o que exista un efecto por la etapa del período reproductivo en el que se obtuvieron las muestras, aún si se trató de obtener muestras de la misma zona del saco gonádico para el análisis de ácidos grasos.

En relación a la poca variabilidad observada en los niveles de PGE_2 en los machos podría responder al patrón de desarrollo de los espermatozoides, un proceso que por

lo general, es más corto y homogéneo que la ovogénesis. Los resultados muestran que más que un relación entre el nivel de ARA en la dieta de los reproductores, la cantidad de ARA incorporada a las membranas de las gónadas es un factor limitante para la síntesis de PG_2. Son escasos los estudios que hacen referencia al efecto de las PGE_2 sobre la actividad reproductiva en machos; en la lubina europea (*D. labrax*) se han observado que los niveles basales de PGE_2 oscilan entre 55 y 82 pg ml^{-1} en cultivos celulares de tejido gonádico estimulando una síntesis 40 veces mayor de PGE_2 (2000 pg $ml^{-}1$) con niveles adecuados de ARA, y alcanzando niveles de 4000 pg ml^{-1} en presencia de niveles adecuados de gonadotropina (Asturiano *et al.,* 2000). Lo anterior, sugiere que en peces, las PG_2 producen contracción del músculo liso durante la liberación del esperma. En el pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) se requieren más estudios sobre el efecto de las PG_2 sobre la regulación hormonal y la calidad espermática de los machos.

En las hembras no se observó una relación entre el contenido de ARA en los fosfolípidos de las gónadas y el nivel de PGE_2, lo que sugiere, que la regulación de PG_2 durante la actividad reproductiva es un proceso complejo a nivel del eje hipotálamo-pituitaria-gónadas y que aunque es afectado por la dieta en diversas especies; posiblemente el nivel de estrés durante el muestreo de las hembras, el estadio de maduración de los ovocitos, entre otros pudieron influido en el nivel de PG_2 observado en esta especie (Anton y Randall, 1987; Lands, 1991). En peces, son pocos los estudios que describen el efecto de la PG_2 sobre dicho eje, sin embargo, en el pez dorado (*Carassius* spp.) se ha descrito el efecto del ARA sobre la liberación de

gonadotropina y síntesis de esteroides (Pati y Habibi, 2002) y un efecto modulador de $PGF_{2\alpha}$ y PGE_2 de las gónadas de hembras sobre el nivel de gonadotropinas (Peter y Crim, 1979). Por otra parte, en mamíferos se ha observado que niveles altos de cortisol pueden bloquear la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de PG_2 y alterar la respuesta de las células a la oxitocina; es posible que el bajo nivel de PGE_2 en las gónadas de hembras del pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) respecto a lo observado en los machos sea un reflejo de la susceptibilidad al estrés de esta especie. Debido a ello, se sugiere evaluar los niveles hormonales de machos y hembras (cortisol, PG_2, esteroides, otros) durante el período reproductivo, y su posible relación con la incidencia en la obstrucción del orificio genital y hemorragias abdominales en las hembras, un fenómeno reportado previamente (comunicación personal de C. Martínez-Palacios) y observado durante el presente experimento.

Otra posible explicación, para la falta de relación entre el ARA en dieta y el PGE_2 en las gónadas de los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) sea que en el pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) al igual que en otras especies, se sintetice de manera preferencial otro tipo de PG_2, como la $PGF_{2\alpha}$, la cual ha sido descrita como la principal feromona e inductora de la ovulación en especies como el bagre (*H. fossilis*) y el pez dorado (*Carassius* spp.) (Stacey y Peter, 1969; Singh y Singh, 1976). Alternativamente, es posible que los niveles de PGE_2 estén regulados negativamente por el contenido de DHA y EPA en los PL de las gónadas, que compiten por el sitio activo de la COX durante la síntesis de PG_2 (Ruggeri y Throughgood, 1985; Asturiano *et al.,* 2000), o bien, en relación a otras PG_2, tales como la PGH_2, como se ha

observado en tilapia (*O. mossambica*), carpa (*C. carpio*), y bagres (*H. fossilis* y *C. batrachus*) (Bandyopadhyay *et al.,* 1982).

8.3 Calidad del desove

En la mayoría de las especies, la calidad del huevo puede disminuir hacia el final de la temporada reproductiva (Babin, 2007). La comparación del nivel de ácidos grasos en huevos de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) alimentado con diferentes niveles de ARA (3%, 4% y 7%) reveló una acumulación mayor de ARA en los PL al final del experimento (semana 8) respecto a su nivel inicial (semana 2) (Tabla XIV), lo que indica que el tiempo de muestreo en el presente trabajo fue suficiente para que los reproductores transfirieran los HUFA n-6 adicionados en la dieta hacia los ovocitos.

Como se discutió previamente, es posible que los reproductores cultivados del pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) requieran ser alimentados con una dieta rica en HUFA n-6 para revertir los efectos de una producción constante de desoves sobre la calidad de los huevos. Así, el aumento en la producción de huevos en las hembras alimentadas con 4% y 7% de ARA podría deberse a una estimulación de la síntesis de PG_2 la cual a su vez, estimuló la síntesis de esteroides, y por último, una mayor síntesis de vitelogenina. Si dicha hipótesis sobre el efecto de las PG_2 es correcta, es posible que la administración exógena de PGE_2 u otra PG_2 y/o con la inducción de la síntesis de PGE_2 con peróxido de hidrógeno tenga efectos benéficos sobre el desove, y posiblemente, reduzca la frecuencia de obstrucción del orificio genital de las hembras de esta especie.

En general, los huevos con mayor cantidad de nutrientes son más grandes, por lo que el diámetro de éstos es uno de los parámetros más utilizados para la evaluación de la calidad del desove de especies marinas y dulceacuícolas, dado que por lo general, se correlacionan con la supervivencia de los organismos en etapas posteriores del desarrollo (Einum y Fleming, 1999; 2000). En el presente estudio, se observó que los huevos provenientes de reproductores alimentados con 4% y 7% de ARA presentaron mayor tamaño respecto al grupo control (3% ARA) (Fig. 29). Esto concuerda con el mayor contenido de lípidos en las gónadas de las hembras y mayor tamaño de los gotas de aceite en desoves provenientes de reproductores alimentados con los mayores niveles de ARA (4% y 7%) (Fig. 30). Sin embargo, el tamaño de huevo sigue siendo un criterio de calidad larvaria en discusión, dado que puede ser influenciado por la talla de las hembras, la duración de la temporada reproductiva, el patrón de desarrollo de los ovocitos y/o estrategia reproductiva de la especie (Kristjánsson y Vollestad, 1996). El diámetro de los huevos de poblaciones silvestres del pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) oscila entre 900 y 1200 µm mientras que las larvas recién eclosionadas miden entre 4.5 y 5.0 mm (Martínez *et al.,* 2002). En estudios recientes, se ha reportado un tamaño de huevos de reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) cultivados de 1111 µm y que el tamaño no varía en relación al tiempo (López, 2009). En el presente estudio, se observó que el tamaño de los huevos de los organismos del grupo control (3% ARA) fue significativamente menor (1077 µm) al tamaño de los huevos de los organismos alimentados con 3% y 7% de ARA (1085 µm) (Fig. 29). Es necesario especificar que en el presente estudio y el realizado por

López (2009) se usaron los mismos desoves (3% ARA) para estimar el tamaño de los huevos, sin embargo en el estudio de López (2009) se usó una regleta micrométrica, mientras que en el presente estudio, los diámetros fueron analizados con un software especializado. De lo anterior, se desprende la hipótesis de que en el pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*), el tamaño de los huevos no es afectado por período de desoves continuos, pero si por la dieta ofrecida a los reproductores. Si las hembras de esta especie mantienen un tamaño de huevo constante a lo largo de la temporada reproductiva es posible que comprometan el número de huevos producidos por evento y/o desove. El tamaño de los huevos de las hembras cultivadas alimentadas con 4% y en particular con 7% de ARA (Fig. 29) es más cercano al diámetro máximo reportado para huevos de organismos silvestres (1200 µm), lo cual posiblemente indique que éstos son de mejor calidad. A pesar de que en el presente estudio, no se evaluó la cantidad de vitelo en los huevos, un parámetro frecuentemente relacionado con la cantidad de PL transferidos al huevo; se observa que los huevos a las 8 semanas de suplementación con ARA presentaron mayor concentración de ácidos grasos en PL (Tabla XIV), sin observarse un efecto por el nivel de ARA en dieta de los reproductores.

El nivel de ARA en los PL (4%) de los desoves obtenidos de reproductores en fase de aclimatación (Tabla XIV) disminuyó durante las primeras dos semanas de experimento (3%), posiblemente como resultado del estrés de los reproductores durante las biometrías y/o el manejo inicial. Después de varias semanas de reproducción, el nivel de ARA en los PL de los desoves fue del 4 al 5% (Tabla XV).; mientras que niveles de

ARA (4.5%), DHA (22.6%) EPA (1.4%) en los lípidos de reserva de los desoves al final de experimento (semana 8) presentaron valores similares a lo observado en los desoves obtenidos durante el período de aclimatación de los reproductores (Tablas XIV y XVI). Esto podría ser el motivo por el cual se observa que algunos parámetros de la calidad del desove (fertilización, tamaño de gota lipídica) iniciales (2 semanas) se estabilizan al final del experimento (8 semanas).

La proporción de EPA en las membranas y reservas de los desoves fue constante entre tratamientos pero disminuyó en el tiempo (2.1% a 1.6%), lo que sugiere que fue necesaria su transferencia hacia los PL y/o que el EPA fue utilizado preferentemente para la síntesis de DHA, un ácido graso esencial para el desarrollo del sistema nervioso y ocular en los embriones (Sargent *et al.,* 1995a). Alternativamente, el uso de EPA podría estar relacionada a su función como precursor de eicosanoides involucrados en la respuesta inmune, pudiendo afectar la resistencia de los embriones al ataque de parásitos como los hongos (*Saprolegnia* spp.), un fenómeno observado frecuentemente en los desoves de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) en condiciones de cultivo. Si lo analizamos más detalladamente, observamos que un nivel bajo de ARA en los PL de los desoves parece ser más determinante de la calidad de éstos, dado que mientras en los lípidos neutros el ARA se mantuvo constante entre tratamientos y a lo largo del tiempo, en los PL se observó una retención selectiva o aumento de este ácido graso en los desoves finales (8 semanas). Lo anterior, se sustenta en que en el presente estudio, se observó una relación entre el contenido de ARA (mg g^{-1}) de los fosfolípidos y la tasa de fertilización de los desoves la cual es uno

de los parámetros más relacionados con la calidad de los huevos para la mayoría de las especies (Bobe y Labbé, 2009), mientras que el contenido de ARA (mg g^{-1}) en los lípidos de reserva parecen estar más relacionados con la tasa de eclosión de los desoves.

En particular, la tasa de fertilización también fue afectada por el tiempo de muestreo (2 semanas vs. 8 semanas) y el nivel de ARA en la dieta de los reproductores. Se observa una disminución de la fertilización en relación al nivel de ARA a las 2 semanas de muestreo, y un efecto negativo por el tiempo, el cual fue revertido en los desoves provenientes de reproductores alimentados con 7% ARA (Fig. 27). Lo anterior indica que el suplemento de ARA en la dieta disminuyó los efectos provocados por el agotamiento reproductivo o estrés de los organismos en cautiverio, y por consecuencia, también estimuló una mayor calidad de los desoves producidos al final del período experimental. Asimismo, se ha reportado una correlación entre la cantidad de PUFA n-3 y n-6 en PL y la tasa de fertilización en especies como el rodaballo (*S. maximus*) (Lavens *et al*., 1999) y la dorada (*S. aurata*) (Fernández *et al.,* 1995) y algunas especies de agua dulce como el pez cebra (*D. rerio*) (Meinelt *et al.,* 1999). Sin embargo, no hay estudios que reportan el efecto de HUFA n-6 sobre la calidad del desove de especies de agua dulce. En especies marinas como el halibut (*Paralichthys. olivaceus*) el ARA (0.6%) estimula mayores tasas de fertilización, eclosión y supervivencia de las crías (Furuita *et al.,* 2003).

El área de la gota lipídica de los huevos del pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) presenta un comportamiento similar a la tasa de fertilización (Fig. 30). Es decir, la

fertilización y el área de la gota lipídica están directamente relacionadas con los niveles de ARA en el huevo, mientras que otros parámetros podrían estar asociados a otras variables. Como se discutió antes, en la mayoría de las especies se observa que los huevos con mayores gotas de aceite tienen mayor cantidad de reservas energéticas, y por lo tanto, tienen una mayor probabilidad de eclosionar (Berg *et al.,* 2001). Sin embargo, en el pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*), los huevos de mayor diámetro y mayor tamaño de gotas de aceite presentan menores tasas de eclosión, por lo que es posible inferir que si un mayor tamaño de gotas confiere mayor contenido de lípidos, entonces es posible que la proporción de HUFA (DHA:EPA:ARA) en las gotas de aceite de los desoves de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) no sea la adecuada. Se ha sugerido que dicha relación es específica de cada especie (Bell *et al.,* 1997b) y que un cambio en dicha relación afecta el crecimiento, el desarrollo y la pigmentación de los organismos durante los primeros estadios de desarrollo (Rainuzzo *et al.,* 1997). En la mayoría de los peces marinos dicha proporción se estima alrededor de 10:5:1, aunque en algunas especies puede llegar a ser de 40:5:4. En el presente trabajo, se observó una relación DHA:EPA:ARA de 16:1:2 en los PL de los huevos de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) al inicio del experimento y conforme avanzó la temporada reproductiva, esta relación se modificó a 15:1:2.5; mientras que en huevos recién fertilizados de poblaciones silvestres la relación es de 10:3:4.5 (Aparicio, 2004). Un incremento en el contenido de ARA en los PL al final del experimento podría deberse a una disminución relativa en la proporción de otros ácidos grasos que podrían implicar cambios sustanciales en la relación DHA:EPA:ARA. Es necesario profundizar en la relación DHA:ARA:EPA en las

diferentes etapas del ciclo de vida, dado que si bien, el DHA es importante para el desarrollo del sistema nervioso y ocular (Kim y Lee, 2004) y el ARA para la síntesis de eicosanoides; un bajo nivel de EPA pudiera tener efectos negativos sobre los primeras etapas del desarrollo de la especie, tales como la eclosión.

Se observó que el ARA es retenido selectivamente en los PL de los desoves (Fig. 33), particularmente en los desoves obtenidos hacia el final de período experimental (semana 8); mientras que el nivel de ARA permanece constante en los lípidos de reserva (Fig. 34). Es posible que aunque las deficiencias de ARA existan en ambas fracciones lipídicas de los huevos, el nivel de ARA suministrado en la dieta de los reproductores fue incorporado selectivamente en los PL de los huevos, y que el efecto benéfico del ARA sobre la calidad del desove se relacione más con el aumento de ARA (3 al 5%) en los PL de los huevos, mientras el nivel de ARA en lípidos de reserva de los huevos posiblemente se relacione con otros parámetro de calidad de la progenie no evaluados en el presente trabajo (supervivencia de larvas recién eclosionadas u otros). Si bien, se sugiere que el requerimiento de ARA en las hembras cultivadas es mayor al de las hembras silvestres, un suplemento de 16% de ARA en la dieta de las hembras mostró efectos benéficos sobre algunos de los parámetros de calidad del desove, promoviendo un contenido de ARA (12.2 mg g^{-1}) en las gónadas de las hembras similar, aunque aún menor al reportado en las hembras silvestres (16.0 mg g^{-1}) (Palacios *et al.,* 2007).

En especies de agua dulce, el nivel de ARA en los desoves ha sido escasamente estudiada; en el walleye (*Sander sande*r), una especie dulceacuícola de agua

templada se han reportado niveles de ARA de 8 a 10% en los PL de los huevos y del 2 al 4% en los lípidos de reserva (Wiegand *et al*., 1996) mientras que en especies tropicales de agua dulce como el pez cebra (*D. rerio*) y el pez cola doble espada (*X. helleri*) se ha descrito una retención selectiva de ARA en los desoves (Ling *et al.,* 2006; Jaya-Ram *et al.,* 2008). Sin embargo, el nivel de ARA registrado en PL y lípidos de reserva de los desoves de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) es similar a su nivel en especies marinas de zonas frías o templadas (1 al 4%), como el arenque (*Clupea* spp.), bacalao (*Gadus* spp.) y haddock (*Sebastes* spp.) (Sargent, 1995a). Lo anterior sugiere que aunque niveles de 4% y 7% de ARA en la dieta de los reproductores cultivados de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) aumentaron la calidad del desove, aún existe una deficiencia de este ácido graso, dado que se esperaría que el nivel de ARA de los desoves de pez blanco (2 al 5%) fuera mayor al de especies templadas (1 al 4%) (Sargent, 1995a) aunque en algunas especies templadas como la lubina europea (*D. labrax*) y el rodaballo (*S. maximus*) también existe una retención selectiva de ARA en los desoves (Bell *et al.,* 1996; 1997b).

La proporción de EPA en los PL de los desoves disminuyó en relación al tiempo (2.2 a 1.6%) y fue ligeramente menor a su nivel en desoves de organismos silvestres (3.6%) (Palacios *et al.,* 2007). La proporción de DHA en desoves de organismos cultivados fue similar a lo reportado en desoves de organismos silvestres (29%) (Palacios *et al.,* 2007). El nivel de DHA en reservas aumentó de 19 a 22% pero bajó en PL (33 a 29%) al final del período experimental, lo cual se asemeja más a desoves silvestres. Asimismo, se observó que la calidad de los desoves y la frecuencia de éstos

comenzaron a disminuir después de 8 semanas de alimentación, por lo cuál se tuvo que suspender el muestreo. Lo anterior posiblemente sea un efecto de un esfuerzo reproductivo constante de los organismos al ser sometidos a un período de reproducción intensivo con fotoperiodo largo (18L:6O), el cual podría involucrar un desgaste energético de los organismos, afectando su capacidad reproductiva.

8.3.1 Calidad del huevo: eclosión, tamaño, gotas lipídicas y longitud larvaria

La tasa de eclosión de los desoves del pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) presentó una interacción significativa entre el nivel de ARA en la dieta (Fig. 28) y más estrechamente vinculado al contenido (mg g^{-1}) en las reservas de los huevos. Asimismo, se observó una mayor tasa de eclosión en desoves provenientes de organismos alimentados con 3% de ARA. Lo anterior, contrasta con lo observado en el bacalao del Atlántico (*G. morhua*), en el cual existe una correlación positiva entre el contenido de ARA en los PL de los huevos y la tasa de eclosión (Pickova *et al.,* 1997). Así, puede existir un efecto negativo de las condiciones de incubación de los desoves (la salinidad, temperatura, etc.) sobre la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de las membranas. A pesar de que el pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) es una especie dulceacuícola, los huevos, larvas y juveniles presentan mayor tasa de supervivencia y mejor crecimiento en salinidades de 5 a 10‰, y se ha reportado un efecto del ARA sobre la osmorregulación (Van Anholt *et al.,* 2004b), por lo que se sugiere, que alternativamente, puede existir un daño en el corión de los huevos durante el manejo de los desoves. En este sentido, es posible que el método de limpieza y/o corte de los hilos adherentes utilizado tenga efectos negativos en la

permeabilidad o cause daños estructurales en el corión. Dichas hipótesis se sustentan en una alta incidencia de hongos, una baja tasa de eclosión y una alta incidencia de malformaciones congénitas. Es necesario hacer más estudios que permitan elevar la tasa de eclosión, dado que podría llegar a ser un factor limitante para la reproducción de la especie en condiciones de cultivo. Aunado a la relación entre el contenido de ARA en las reservas de los huevos y la tasa de eclosión, es posiblemente que la eclosión se encuentre relacionada con el contenido de otros nutrientes, por ejemplo, los niveles de HUFA n-3, como ha sido descrito en la dorada (*S. aurata*) (Fernández *et al.,* 1995; Rodríguez *et al.,* 1998); o bien, el nivel de vitamina A (Furuita *et al.,* 2001), aminoácidos y/o otros nutrientes que pudieran afectar el sistema inmune y/o supervivencia de los embriones. Lo anterior, se sugiere, en base a que un suplemento del 4% de ARA en los reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) estimuló un mayor crecimiento de las larvas recién eclosionadas (48 h) (Fig. 31).

8.3.1 Concentración espermática

La cantidad y calidad del esperma son factores cruciales para el éxito reproductivo y la calidad de la progenie, dado que una mayor cantidad de espermatozoides (cel ml^{-1}) aumenta la probabilidad de fertilización (Wirtz y Steinmann, 2006). En los peces, la tasa de motilidad, tiempo de viabilidad, morfología y concentración de espermatozoides en relación al tiempo son parámetros afectados por factores endógenos (carga genética, edad, nivel de hormonas como PG, GnH y/o hormonas esteroideas, entre otros) y el medio ambiente (salinidad, temperatura) y etapa de la temporada reproductiva, entre otros (Tabares *et al.,* 2005). Asimismo, el volumen de

esperma puede ser afectado por el peso de los organismos, mientras que la concentración espermática usualmente está relacionada al volumen de esperma producido; siendo ambos parámetros altamente variables entre poblaciones e individuos y/o en relación a la etapa del período reproductivo. Por ejemplo, la concentración espermática de la perca (*P. fluviatilis*) oscila entre 19 x 10^{-9} cel ml^{-1} y 128 x 10^{-9} cel ml^{-1} (Wirtz y Steinmann, 2006), mientras que en la lubina europea (*D. labrax*) la concentración espermática disminuye hacia el final de la temporada reproductiva, con valores promedio de 55 x 10^{-9} cel ml^{-1} (Fauvel *et al.,* 1999). En especies cercanas al pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) como el charal (*Chirostoma humboldtianum*) existe una amplia variación en la concentración espermática cuando los machos son sometidos a diferentes regimenes de temperatura y fotoperiodo (7.2 x10^{9} a 23 x 10^{9} cel ml^{-1}) (Blancas *et al.* 2004), mientras que en el pejerrey (*O.. bonariensis*) se ha registrado una concentración espermática de 4.0 x 10^{9} cel ml^{-1} en machos inducidos al desove con gonadotropina coriónica humana (hCG) en comparación con controles inyectados con solución salina (Miranda *et al.,* 2005). En el presente estudio, se observó una concentración espermática de 1.9 x 10^{9} cel ml^{-1} para el pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*), la cual se determinó durante el muestreo final (semana 10). Es posible que ésta haya sido mayor al inicio de la temporada reproductiva, no determinada en el presente estudio.

Los espermatozoides de los peces presentan un alto contenido de PUFA y HUFA, en particular de DHA, en los PL (Bell *et al.,* 1997a). Sin embargo dicha composición es variable en función de factores endógenos y exógenos previamente mencionados

(Drokin, 1992). La composición de ácidos grasos, en particular de HUFA interviene en procesos de señalización celular, osmorregulación, homeostasis celular, actividad enzimática, determinando además, la estructura y la función de la membrana plasmática del espermatozoide. Sin embargo, si bien se observó una tendencia a aumentar la concentración espermática en relación al nivel de ARA en la dieta de los machos del pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*), ésta no fue significativa, por lo que no es posible relacionar este parámetro con el éxito de fertilización de los desoves (Fig. 32). Debido a ello, se concluye que el efecto del ARA sobre la fertilización se debe principalmente a variables relacionadas con las hembras. En cualquier caso, se requieren estudios más detallados sobre la composición de ácidos grasos de la membrana plasmática, así como de la composición específica de PL de los espermatozoides de la especie, y/o su relación con otros parámetros de calidad espermática como la viabilidad, la motilidad, etc.

9. CONCLUSIONES

1. El suplemento de 4% y 7% de ARA estimuló una mayor incorporación de lípidos en las gónadas de hembras, mayor producción de huevos de mayor diámetro y mayor crecimiento de larvas recién eclosionadas.

2. Se observó una relación entre el contenido de ARA en los lípidos de reserva de los huevos y la tasa de eclosión; mientras que el contenido de ARA en los fosfolípidos afectó la fertilización de los huevos.

3. Existen patrones diferenciales entre machos y hembras en el perfil de ácidos grasos en lípidos de reserva y fosfolípidos; particularmente en el contenido de 18:2n-6 y/o ARA, es posible que estas diferencias sean reflejo de una diferente utilización de ácidos grasos durante la maduración entre sexos.

4. Se observó un patrón diferencial en la concentración de PGE_2 de las gónadas de machos y hembras. La relación entre el contenido de ARA de los fosfolípidos y el contenido de PGE_2 en las gónadas de los machos, y la falta de correlación en las hembras, sugiere que la síntesis de PGE_2 en las hembras esta afectada por otros factores además de la maduración, y podría ser una indicación de que las hembras son mas susceptibles al estrés.

5. Existe un efecto del tiempo de alimentación de los reproductores con un suplemento de ARA (2 semanas vs. 8 semanas) sobre la calidad de los desoves, lo cuál podría indicar que hay un desgaste energético después de un determinado período de reproducción, o bien, que los reproductores presentan una adaptación al estrés después de cierto tiempo.

10. CONCLUSION GENERAL

La mayoría de las especies de agua dulce presentan capacidad de elongar y desaturar ácidos grasos altamente insaturados como el ARA (20:4n-6); sin embargo, la exposición a las condiciones de cultivo y estrés en algunas especies como el pez blanco de Pátzcuaro (*M. estor*) parecen conferirle mayores requerimientos de ARA durante la actividad reproductiva que los niveles de ARA reportados en organismos silvestres. Con base a los resultados obtenidos, se sugiere que el esfuerzo reproductivo es mayor en las hembras que en los machos; y que un suplemento de 3% y 7% de ARA en la dieta de los reproductores induce cambios en el perfil bioquímico y fisiológico en la gónada de los organismos; así como un efecto benéfico sobre algunas variables relacionadas con la calidad de los desoves, como son la producción de huevos, la tasa de fertilización, el tamaño de los huevos, y el crecimiento de larvas recién eclosionadas. El nivel de ARA de los PL presentó una estrecha relación con el nivel de PGE_2 del tejido reproductivo de los machos y una ausencia de dicho patrón en las hembras, indicando que en éstas la regulación de ARA es afectada por otras variables como el estrés, el esfuerzo reproductivo, entre otras. Por lo tanto, la hipótesis de que ofrecer a reproductores cultivados niveles altos de ARA (4% y 7%) estimularían un nivel de dicho ácido graso cercano a lo observado en los organismos silvestres queda descartada.

11. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios sobre la biología reproductiva de la especie y el tipo de desarrollo de los ovocitos.

2. Evaluar el perfil bioquímico de diferentes tejidos en los reproductores silvestres que permitan identificar los patrones de acumulación y reserva de nutrientes y realizar comparaciones con reproductores silvestres.

3. Evaluar la tasa de ingesta de alimento en adultos, utilizando tanques monosexuales.

4. Identificar y probar dietas adecuadas para la especie en cuanto al contenido de macronutrientes (proteínas y aminoácidos, carbohidratos, lípidos).

5. Evaluar el perfil bioquímico de las gónadas y los desoves al inicio y al final del período reproductivo que permitan identificar deficiencias nutricionales (vitaminas, proteínas, antioxidantes, HUFA) en relación al agotamiento reproductivo y su relación con la calidad de los huevos.

6. Evaluar la proporción adecuada de DHA:EPA:ARA en la dieta de los reproductores y su efecto sobre parámetros de calidad de la progenie.

7. Evaluar el efecto del EPA y eicosanoides derivados sobre el crecimiento, la respuesta al estrés por manejo y condiciones ambientales y la calidad de los desoves.

8. Evaluar el efecto del ARA y PGE_2 en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y su relación con el nivel de otras hormonas, el crecimiento, la respuesta al estrés y la respuesta inmune de los reproductores cultivados.

9. Evaluar el efecto de diferentes PG_2 y/o ARA en cultivos celulares (*in vitro*) utilizando otras técnicas más sensibles para la cuantificación de PG, como HPLC, técnicas histoquímicas para localizar receptores de PG en gónadas de ambos sexos, así como la expresión de genes específicos.

10. Evaluar el efecto de administración exógena de PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$ sobre la estimulación al desove y/o incidencia de obstrucción de orificio genital de las hembras, considerando el estadio de desarrollo de los ovocitos *in vivo* o *in vitro*.

12. LITERATURA CITADA

Abi-ayad, S. M. E. A., Melard, C., Kestemont, P. (1997). Effects on n-3 fatty acids in Eurasian perch broodstock diet on egg fatty acid composition and larvae stress resistance. *Aquaculture International*, **5**: 161-168.

Acharia, K., Lal, B., Singh, T. P. (2000). Modulatory effect of temperature on the influence of dietary linolenic (18:3n-3) and linoleic (18:2n-6) acids on the gonadal recrudescence in *Clarias batrachus* (L.). *Journal of Fish Biology*, **57**: 968-980.

Ackman, R. G., Mcleod, C., Rakshit, S., Misra, K. K. (2002). Lipids and fatty acids of five freshwater food fishes of India. *Journal of Food Lipids*, **9**: 127-145.

Agius, V. R., Watanabe, T., Yoshizaki, G., Satoh, S., Takeuchi, Y. (2001). Quality of eggs and spermatozoa of rainbow trout fed an n-3 fatty acid-deficient diet and its effects on the lipid and fatty acid components of eggs, semen and livers. *Fisheries Science*, **67**: 818-827.

Aguilar, P. S., Mendoza, D. (2004). Control of fatty acid desaturation: a mechanism conserved from bacteria to humans. *Molecular Microbiology*, **62** (6): 1507-1514.

Ako, H., Kraul, S., Tamaru, C. (1991). Pattern of fatty acid loss in several warmwater fish species during early development. Larvi´91. Fish and Crustacean Larviculture Symposium. Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. Editors. Gent, Belgium. *European Aquaculture Society* (*Special Publication)*, **15**. 23-25.

Alessandri, J. M., Guesnet, P., Vancassel, S., Astorg, P., Denis, I., Langelier, B., Aid, S., Poumes, B. C., Champell, G. P., Lavialle, M. (2004). Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reproduction and Nutrition Development*, **44**: 509-538.

Alfaro, G. C., Perea de la Matta, A., Williams de Castro, M. (2006). Aspectos reproductivos del pejerrey *Odontesthes regia regia* (Humboldt 1821) en la zona de pisco durante el período 1996-97 y Mayo-Julio del 2002, relacionados a su conservación. *Ecología Aplicada*, **5** (1,2):141-147.

Almansa, E., Martin, M. V., Cejas, J. R., Badìa, P., Jerez, S., Lorenzo, A. (2001). Lipid and fatty acid composition of female gilthead seabream during their reproductive cycle: effects of a diet lacking n-3 HUFA. *Journal of Fish Biology*, **59**: 267-286.

Anton, R. F., Randall, C. L. (1987). Central nervous system prostaglandins and ethanol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, **11** (1): 10-18.

Aparicio, S. B. (2004). **Importancia de los lípidos en la reproducción y ontogenia del pez blanco de Pátzcuaro (*Chirostoma estor estor*).** Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, Baja California Sur. 120 pp.

Arcos, F. G., Ibarra, A. M., Palacios, E., Vazquez, B. C., Racotta, I. S. (2003). Feasible predictive criteria for reproductive performance of White shrimp *Litopenaeus vannamei*: egg quality and female physiological condition. *Aquaculture*, **228**: 335-349.

A. O. A. C. (2000). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Seventeenth Edition. Washington, D.C. The United States of America. 1018 pp.

Arjona, L. O., Palacios, M. E. (2009). **Análisis de ácidos grasos metal-esterificados (Derivatización directa) en alimentos peletizado enriquecido con ácidos grasos**. Manual. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. Primera Edición. La Paz, B. C. S. México. Reporte técnico No. 1.].

Arukwe, A., Goksoyr, A. (2003). Eggshell and egg yol proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population ande evolutionary implications of endocrine disruption. *Comparative Hepatology*, **2** (4): 1-21.

Asturiano, J. F., Sorbera, L. A., Zanuy, S., Carrillo, M. (2000). Effects of polyunsaturated fatty acids and gonadotropin on prostaglandin series E production in a primary testis cell culture system for the European sea bass. *Journal of Fish Biology*, **57**: 1563-1574.

Asturiano, J. F., Sorbera, L. A., Carrillo, M., Zanuy, S., Ramos, J., Navarro, J. C., Bromage, N. (2001). Reproductive performance in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) fed two PUFA-enriched experimental diets: a comparison with males fed a wet diet. *Aquaculture*, **194**: 173-190.

Ballestrazzi, R., Rainis, S., Tulli, F., Bracelli, A. (2003). The effect of dietary coconut oil on reproductive traits and egg fatty acid composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture International*, **11**: 289-299.

Babin P. J., Cerdá, J., Lubzens, E. (2007). **The Fish Oocyte**. The Springer Editorial. First Edition. The Netherlands. 510 pp.

Barbour, C. D. (1973). A biogeographical history of *Chirostoma* (Pisces, Atherinidae): a species flock from the Mexican plateau. *Copeia*, **3**: 533–556.

Bandyopadhyay, G., Dutta, J., Ghosh, S. (1982). Synthesis of diene prostaglandins in freshwater fish. *Lipids,* **17** (10): 755 -758.

Beckman, B., Mustafa, T. (1992). Arachidonic acid metabolism in gill homogenate ans isolated gill cells from rainbow trout, *Oncorhynchis mykiss*: the effect of osmolality electrolytes and prolactin. *Fish Physiology and Biochemistry*, **10** (3): 213-222.

Bell, M. V., Henderson, J. R., Sargent, J. R. (1985). Changes in the fatty acid composition of phospholipids from turbot (*Scophthalmus maximus*) in relation to dietary polyunsaturated fatty acid deficiencies. *Comparative Biochemistry and Physiology*., **81B** (1): 193-198.

Bell, M. V., Henderson, R. J., Sargent, J. R. (1986). The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **83B** (4): 711-719.

Bell, J. G., D. R. Tocher, J. R. Sargent. (1994). Effect of supplementation with 20:3(n-6), 20:4(n-6) and 20:5(n-3) on the production of prostaglandins E and F of the 1-, 2- and 3-series in turbot (*Scophthalmus maximus*) brain astroglial cells in primary culture. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1211** (3): 335-342.

Bell, J. G., Castell, J. D., Tocher, D. R., MacDonald, F. M., Sargent, J. R. (1995). Effects of different dietary arachidonic acid: docosahexaenoic acid ratios on phospholipid fatty acid compositions and prostaglandin production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, **14** (2): 139-151.

Bell, J. G., Ashton, I., Secombes, C. J., Weitzel, B. R., Dick, J. R., Sargent, J. R. (1996). Dietary lipid affects phospholipid fatty acid compositions, eicosanoid production and immune function in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **54** (3): 173-182.

Bell, M.V., Dick, J.R., Buda, C. (1997a).Molecular speciation of fish sperm phospholipids: large amounts of dipolyunsaturated phosphatidylserine. *Lipids*, **32** (10): 1085-1091.

Bell, J. G., Farndale, B. M., Bruce, M. P., Navas, J. M., Carrillo, M. (1997b). Effects of broodstock dietary lipid on fatty acid compositions of eggs from sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, **149**: 107-119.

Bell, J. G., Tocher, D. R.., Farndale, B. M., Sargent, J. R. (1998). Growth, mortality, tissue histopatology and fatty acid compositions, eicosanoid production and response to stress, in juvenile turbot fec diets rich in γ-linilenic acid in combination with eicosapentaenoic acid or docosahexanoic acid. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **58** (5): 353-364.

Bell, J. G., Sargent, J. R. (2003). Araquidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture*, **218**: 491-499.

Bell, M. V., Dick, J. R. (2004). Changes in capacity to synthesis 22:6 n-3 during early development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **235**: 393-409.

Bell, J. G., Strachan, F., Good, J. E., Tocher, D. R. (2006). Effect of dietary echium oil on growth, fatty acid composition and metabolism, gill prostaglandin production and macrophage activity in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research*, **37**: 606-617.

Bessonart, M., Izquierdo, M. S., Salhi, M., Hernández, C. C. M., González, M. M., Fernández, P. H. (1999). Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquaculture*, **179**: 265-275.

Berg, H., Modig, C., Olsson, P. E. (2004). 17-beta-estradiol induced vitellogenesis is inhibited by cortisol at the post-transcripcional level in Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Reproductive Biology and Endocrinology*, **2** (62):1-10.

Bjerselius, R., Olsen, K. H. (1993). A study of the olfactory sensitivity of crucian carp (*Carassius carassius*) and goldfish (*Carassius aureatus*) to 17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one and prostaglandin $F_{2\alpha}$. *Chemical Senses*, **18**: 427-436.

Blancas, A. G. A., Figueroa, L. G., Arredondo, F., J. L., Barriga, S. I. (2003). Primeras experiencias sobre el manejo de reproductores de pez blanco (*Chirostoma humboldtianum* Valenciennes, 1835) bajo condiciones controladas Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. México, *CIVA*: 30-42.

Blancas, A. G. A., Figueroa, L. G., Barriga, S. A., Arredondo, F. J. L. (2004). Effects of an artificial photothermal cycle on the reproduction of the shortfin silverside, *Chirostoma humboldtianum*, Valenciennes, 1835 (Pisces: Atherinopsidae). *Aquaculture*, **241**: 575-585.

Blanchard, G., Druart, X., Kestemont, P. (2005). Lipid content and fatty acid composition of target tissues in wild *Perca fluvialitis* females in relation to hepatic status and gonad maturation. *Journal of Fish Physiology*, **66**: 73-85

Bobe, J., Labbé, C. (2009). Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*, *In press*.

Boersma, M., Stelzer, C. P. (2000). Response of zooplancton community to the addition of unsaturated fatty acids: an enclosure study. *Freshwater Biology*, **45**: 179-188.

Booth, R. K., McKinley, R. S., Ballantyne, J. S. (1999). Plasma non esterified fatty acid profiles in wild Atlantic salmon during freshwater migration and spawning. *Journal of Fish Biology*, **55**: 260-273.

Bord Iascaigh Mhara. Irish Sea Fisheries. (BIM). Board.P.O. Box 12, Crofton Road, Dun Laoghaire, Co. Dublin, Ireland. +353 1 2144 100. (www.bim.ie).

Bouffard, R. E. (1979). **The role of prostaglandins during sexual maturation, ovulation, spermiation in the goldfish, *Carassius auratus*.** Master thesis. Universisy of British Columbia. Vancouver, Canada, 158 pp.

Bransden, M. P., Cobcroft, J. M., Battaglene, S. C., Dunstan, G. A., Nichols, y Bell, J. G. (2004). Dietary arachidonic acid alters tissue fatty acid profile, whole body eicosanoid production and resistance to hypersaline challenge in larvae of the temperate marine fish, striped trumpeter (*Latris lineata*). Fish *Physiology and Biochemistry*, **30**: 241-256.

Bransden, M. P., Butterfield, G. M., Walden, J., McEvoy, Bell, J. G. (2005a). Tank colour and dietary arachidonic acid affects pigmentation, eicosanoid production and tissue fatty acid profile of larval Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, **250**: 328- 340.

Bransden, M. P., Battaglene, S. C., Morehead, D. T., Dunstan, G. A., Nichols, P. D. (2005b). Effect of dietary 22:6n-3 on growth, survival and tissue fatty acid profile of striped trumpeter (*Latris lineata*) larvae fed enriched Artemia. *Aquaculture*, **243**:331-344.

Brett, T. M., Navarra, M. D. C. (1997). The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. *Freshwater Biology*, **38**: 483-499.

Brodtkorb, T., Rosenlund, G., Lie, O. (1997). Effects of dietary levels of 20:5 n-3 y 22:6 n-3 on tissue lipid composition in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*, with emphasis on brain and eye. *Aquaculture nutrition*, **3**: 175-187.

Bromage, N. (1995). Broodstock management and seed quality. General considerations. In: **Broodstock management and egg and larval quality.** N. R. Bromage and J. R. Roberts (Eds).. Blackwell Sciences. First Edition. Oxford, England. 424 pp.

Bruce, M. P., Shields, R. J., Bell, M. V., Bromage, N. R. (1993). Lipid class and fatty acid composition of eggs of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), in relation to egg quality in captive broodstock. *Aquaculture and Fisheries Management*, **24**: 417-422.

Busby, E. R., Cooper, G. A., Mommsen, T. P. (2002). Novel role for prostaglandin E2 in fish hepatocytes: regulation of glucose metabolism. *Journal of Endocrinology*, **174**: 137-146.

Calder, P. C., Miles, E. A. (2000). Fatty acids and atopic disease. *Pedriatic Allergy and Immunology*, **13**: 29-36.

Carrillo, M., Zanuy, S., Oyen, F., Cerdá, J., Navas, J. M., Ramos, J. (2000). Some criteria of the quality of the progeny as indicators of physiological broodstock fitness. In: Recent advances in Mediterrean aquaculture finfish species diversification. Proceedings of the seminar of CIHEAM Network on technology of aquaculture in the Mediterrean (TECAM). FAO and CIHEAM, Zaragoza, Spain. May 3-5,1999. 61-73 p.

Castell, J. D., Bell, J. G., Tocher, D. R., 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*, **128**: 315-333.

Cetta, F., Goetz, F. W. (1982). Ovarian and plasma prostaglandin E and F levels in Brook trout (*Salvelinus fontinalis*) during pituitary-induced ovulation. *Biology of reproduction*, **27**: 1216-1221.

Chapelle, S. (1986). Aspects of phospholipid metabolismo in crustaceans as related to changes in environmental temperatures and salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **84** (4): 423-439.

Cheng, Z., Abayasekara, D. R. E., Wathes, D. C. (2005). The effect of supplementation with n-6 polyunsaturated fatty acids on 1-, 2- and 3- series prostaglandin F production by ovine uterine epithelial cells. *Biochimica et Byophysica Acta*, **1736**: 128-135.

Comas, M., J. (2001). **Tolerance of *Chirostoma estor estor* (Family: Atherinidae) larvae to saline environments.** Master thesis. Institute of Aquaculture. University of Stirling. United Kingdom. 61 pp.

Conover, D. O., Van Voorhees, D. A., Ehtisham, A. (1992). Sex ratio selection and the evolution of the environmental sex determination in laboratory populations of *Menidia menidia*. *Evolution*, **46** (6): 1722-1730.

Copeman, L. A., Parrish, C. C. (2002). Lipid composition on malpigmented and normally pigmented newly settled yellowtail flounder, *Limanda ferruginea* (Storer). *Aquaculture Research*, **33**: 1209-1219.

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 ferrugiena*): a live food enrichment experiment. *Aquaculture*, **210**: 285-304.

Coutteau, P., Sorgeloos, P. (1997). Manipulation of dietary lipids, fatty acids and vitamins in zooplankton cultures. *Freshwater Biology*, **38**: 501-512.

Dantagnan, P., Borquez, A., Hernandez, A., Gonzales, A., Pavez, C. (2008). Evaluation of Arachidonic acid as dietary supplement in Atlantic salmon fingerlings. In: XIII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding. Fish and Crustacean Nutrition: Present Knowledge and Future Perspectives. Florianópolis, Brazil. June 1- 5, 2008.

De Pablo, M. A., Álvarez de Ceinfuegos, G. (2000). Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. *Immunology and Cell Biology*, **78**: 31-39.

De Silva, S. S., Gunasekera, R. M., Collins, R., Ingram, B. A., Austin, C. M. (1997). Changes in the fatty acid profile of the Australian shortfin eel in relation to development. *Journal of Fish Biology*, **50**: 992-998.

Dhert, P., González, M. F., Van, R. K., Geurden, I., Thysen, F., Lebegue, E., Lavens, P., Zorruelos, P. (1999). Cofeeding of phospholipids to turbot *Scophthalmus maximus* L. larvae as a tool to reduce live food consumption. *Aquaculture Nutrition*, **5**: 237-245.

Dyer, B.S., Chernoff, B. (1996). Phylogenetic relationships among atheriniform fishes (Teleostei: Atherinimorpha). *Zoological Journal of the Linnean Society*, **117**: 1-69.

Dytham, C. (1999). **Choosing and using Statistics. A biologist´s guide**. Blackwell Science Editorial. First Edition. Oxford, The United Kingdom. 218 pp.

Elmes, M., Green, L. R., Poore, K., Newman, J., Burrage, D., Abayasekara, D. R. E., Cheng, Z., Hanson, M. A., Wathes, D. C. (2005). Raised dietary n-6 polyunsaturated fatty acid intake increases 2-series prostaglandin production during labour in the ewe. *Journal of Physiology*, **562**: 583-592.

El Sayed, A. F. M., Mansour, C. R., Ezzart, A. A. (2005). Effects of dietary lipid sources on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock reared at different water salinities. *Aquaculture*, **248**: 187-196.

Emata, A. C., Ogata, H. Y., Garibay, S. E., Furuita, H. (2003). Advanced broodstock diets for the mangrove red snapper and a potential importance of arachidonic acid in eggs and fry. *Fish Physiology and Biochemistry*, **28**: 489-491.

Estévez, A., Ishikawa, M., Kanazawa, A. (1997). Effects of arachidonic acid on pigmentation and fatty acid composition of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel). *Aquaculture Research*, **28**: 279-289.

Estévez, A., McEvoy, L. A., Bell J. G., Srgent, J. R. (1999). Growth, survival, lipid composition of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed live-prey enriched in Arachidonic and Eicosapentaenoic acids. *Aquaculture*, **180**:321-343.

Evans, P. D. (1998). **Advances in insect physiology**. Volume 27. Academic Press Editorial. First Edition United Kingdom. 447 pp.

Evans, R. P., Parrish, C. C., Brown, J. A., Davis, P. J. (1995). Biochemical composition of eggs from repeated and first time spawning captive Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, **139**: 139-149.

Faggio, C., Denaro, M. G., Lionetto, M. G. (2000). Protective effects of prostaglandins in the isolated gastric mucosa of the eel, *Anguilla anguilla*. *Journal of Comparative Physiology*, **170** (B): 357-363.

Fernández, P, H., Izquierdo, M. S., Robaina, L., Valencia, A., Salhi, M., Vergara, J. M. (1995). Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, **132**: 325-337.

Fernández, P. H., Izquierdo, M., Robaina, L., Valencia, A., Salhi, M., Montero, D. (1997). The effect of dietary protein and lípid form squid and fish meals on egg quality of broodstock for gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, **148** (2-3): 233-246.

Fountoulaki, E., Alexis, M. N., Nengas, I., Venoue, B. (2003). Effects of dietary arachidonic acid (20:4n-6), on gorwth, body composition and tissue fatty acid profile of gilthead bream fingerlings (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, **225**:309-323.

Furuita, H., Tanaka, H., Yamamoto, T., Shiraishi, M., Takeuchi, T. (2001). Effects of a high dose of vitamin A on reproduction and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*, **67**: 606-613.

Furuita, H., Yamamoto, T., Shima, T., Suzuki, N., Takeuchi, T. (2003). Effect of arachidonic acid levels in broodstock diet on larvae and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **220** (1-4): 725-735.

Ganga, R., Bell, J. G., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M. J., Izquierdo, M. S. (2005). Effect of dietary lipids on plasma fatty acid profiles and prostaglandin and leptin production in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **142** (B): 410-418.

Ghioni, C., Tocher, D. R., Bell, M. V., Dick, J. R., Sargent, J. R. (1999). Low C_{18} to C_{20} fatty acid elongase activity and limited conversion of stearidonic acid, 18:4(n-3), to eicosapentaenoic acid, 20:5(n-3), in a cell line from the turbot, *Scophthalmus maximus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1437**: 170-181.

Ghioni, C., Porter, A. E. A., Taylor, G. W., Tocher, D. R. (2002). Metabolism of 18:4n-3 (stearidonic acid) and 20:4n-3 in salmonid cells in culture and inhibition of the production of prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) from 20:4n-6 (arachidonic acid). *Fish Physiology and Biochemistry*, **27**: 81-96.

Gill, I., Valivety, R. (1997). Polyunsaturated fatty acids, part 1: Occurrence, biological activities and applications. *Elsevier Science Reviews*, **15**: 401-409.

Goetz, F. W., Duman, P., Ranjan, M., Herman, C. A. (1988). Prostaglandin F and E synthesis by specific tissue components of the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) ovary. *Journal of Experimental Biology*, **250** (2):196-205.

Goetz, F. W., Hsu, S. Y., Selover, A. (1991). Stimulation of prostaglandin synthesis in fish follicles by a phorbol ester and calcium ionophore. *Journal of Experimental Zoology*, **259** (3): 355-364.

Goetz, F. W. (1993). Involvement of protein kinase C in agonist-stimulated goldfish ovulation. *Biology of Reproduction*, **48**: 846-850.

Goetz, F. W. (1997). Follicle and extracellular tissue interaction in 17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one-stimulated ovulation and prostaglandin synthesis in the yellow perch (*Perca flavescens*) ovary. *General and Comparative Endocrinology*, **105** (1): 121-126.

Goldberg, K. I., Cohen, Z., Leibowitz, P. M., Nechev, J., Zilberg, D. (2006). Feeding with arachidonic acid rich triacylglycerols from the microalga *Parietochloris incisa* improved recovery of guppies from infection with *Tetrahymena sp*. *Aquaculture*, **255**: 142-150.

Guzmán, A. M. (1995). **La pesca en el lago de Chapala: hacia su ordenamiento y explotación racional**. Universidad de Guadalajara. Primera Edición. Jalisco, México. 302 pp.

Han, K., Geurden, I., Meeren, P. V., Bai, S. C., Sorgeloos, P. (2005). Particle size distribution in two lipid emulsions used for the enrichment of *Artemia* nauplii as a function of their preparation methods and storage time. *Journal of the World Aquaculture Society*, **36** (2): 196-202.

Harel, M., Gavasso, S., Leshin, J., Gubernatis, A., Place, A. R. (2001). The effect of tissue docosahexaenoic and arachidonic acids levels on hypersaline tolerance and leucocyte composition in striped bass (*Morone saxatilis*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, **24**: 113-123.

Harrel, R. M., Woods, L. C. (1995). Comparative fatty acid composition of eggs from domesticated and wild striped bass (*Morone saxatilis*). *Aquaculture*, **133**: 225-233.

Henderson, R. J., Tocher, R. D., (1987). The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Progress in Lipid Research*, **26**: 281-347.

Hoar, W. S., Randall, D. J., Donaldson, E. M. (1983). **Fish Physiology**. Reproduction. Volume IX. Part B. Behaviour and Fertility control. Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich Publishers. First Edition. Orlando, Florida, The United States of America. 477 pp.

Hsu, S., Goetz, F. W. (1993). Cellular mechanisms for orthovanadate, phorbol ester- and Calcium Ionophore- stimulated prostaglandin production in Brooke trout (*Salvelinus fontinalis*) follicles. *Biology of Reproduction*, **48**: 1202-1209.

Huber, M., Bengtson, D. A. (1999). Interspecific differences in growth of somatic and reprodcutive tissues during the breeding season in *Menidia menidia* and *M. beryllina*. *Journal of Fish Biology*, **55**: 274-287.

Huntingford, F. A., Chellappa, S., Taylor, A. C., Strang, R. H. C. (2001). Energy reserves and reproductive investment in male three-spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. *Ecology of Freshwater Fish*, **10**: 111-117.

ICES, 1997. Report of the working group on marine fish culture for the international council for the exploration of the sea. Murcia, España. 23 a 26Junio,1997. ICES. M. 1997/F, 7.

Izquierdo, M. S., Fernández, P. H., Tacon, A. G. J. (2001). Effect of broodstock nutrition on reproductive performance on fish. *Aquaculture*, **197**: 25-42.

Jabbour, H. N., Sales, K. J., Milling Smith, O. P., Battersby, S., Boddy, S. C. (2006). Prostaglandin receptors are mediators of vascular function in endometrial pathologies. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **252** (1-2): 191-200.

Jalabert, B., Szollsi, D. (1975). In vitro ovulation of trout oocytes, effects of prostaglandins on smooth muscle like cell of the theca. *Prostaglandins*, **9**: 765–778.

Jalabert, B. (1976). In vitro oocytes maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gardneri*), northen pike (*Esox lucius*) and goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, **33**: 974–988.

Jaya-Ram, A., Kuah, M. K., Lim, P. S., Kolkovski, S., Shu-Chien, A. C. (2008). Influence of dietary HUFA levels on reproductive performance, tissue fatty acid

profile and desaturase and elongase mRNAs expression in female zebrafish *Danio rerio*. *Aquaculture*, **277** (3-4): 275-281.

Jobling, M. (1995). Development of eggs and larvae. In: **Environmental biology of fishes**. Fish and Fisheries Series Vol. 16. Chapman and Hall Editors. First Edition. London, United Kingdom. 455 pp.

Jonsson, N., Jonsson, B., Hansen, L. P. (2006). Energetic cost of spawning in males nad female Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Fish Biology*, **39** (5): 739-744.

Karp, G. (2005). **Biología Celular y Molecular**. Editorial Mcgraw-Hill. Cuarta Edición. México, D.F. 746 pp.

Knight, J., Rowley, A. F. (1995). Immunoregulatory activities of eicosanoids in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunology*, **85**: 389-393.

Kolkovski, S., Czesny, S., Yackey, C., Moreau, R., Cihla, F., Mahan, D., Dabrowski, K. (2000). The effects of vitamins C and E in (n-3) highly unsaturated fatty acids-enriched Artemia nauplii on growth, survival, and stress resistance of fresh water walleye Stizostedion vitreum larvae. *Aquaculture Nutrition*, **6**: 199-206.

Koven, W., Barr, Y., Lutzky, S., Ben-Atia, I., Weiss, R., Harel, M., Behrens, P., Tnadler, A. (2001). The effect of dietary arachidonic acid (20:4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, **193**: 107-122.

Koven, W., Anholt, R. V., Lutzky, S., Ben Atia, I. B., Nixon, O., Ron, B., Tandler, A. (2003). The effect of dietary arachidonic acid on growth, survival and cortisol levels in different-age gilthead seabram larvae (*Sparus auratus*) exposed to handling or daily salinity change. *Aquaculture*, **228**: 307-320.

Kowalsky, R. K., Shiba, K., Yoshida, M., Glogowski, J. (2008). Prostaglandins in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) sperm biology-searching for answers. *Journal of Applied Ichthyology*, **24**: 487-491.

Laberge, F., Hara, T. J. (2003). Behavioural and electrophysiological responses to F-prostaglandins, putative spawning pheromones, in three salmonid fishes. *Journal of Fish Biology*, **62**: 206-221.

Lands, W. (1991). Biosynthesis of prostaglandins. *Annual Reviews*, **11**: 41-60.

Lavens, P., Sorgeloos, P. (1996). **Manual on the production and use of live food for aquaculture.** FAO. Fisheries Technical Paper 361. Laboratory of Aquaculture and Artemia Reference Center. University of Ghent. Belgium. 295 pp.

Lavens, P., Lebegue, E., Jaunet, H., Brunel, A., Dhert, P, Sorgeloos, P. (1999). Effect of dietary essential fatty acids and vitamins on egg quality in turbot broodstocks. *Aquaculture International*, **7**: 225-240.

Liley, N. R., Stacey, N. (1983). Hormones, pheromones and reproductive behaviour in fish. In: **Fish Physiology**. Hoar, W. S., Randall, D. J., Donaldson, E. M. Volume IX. Part B. Behaviour and Fertility Control. Academic Press Editorial. First Edition. New York, The United. States of America. 1-49 p.

Liley, N. R., Tan, E. S. P. (1984). The induction of spawning behaviour in *Puntius gonionotus* (Bleeker) by treatment with prostaglandin $PGF_{2\alpha}$. *Journal of Fish Biology*, **26**: 491-502.

Ling, S., Kuah, M. K., Muhammad, T. S. T., Kolkovski, S., Shu-Chein, A. C. (2006). Effect of dietary HUFA on reproductive performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNAs in female swordtail *Xiphophorus helleri*. *Aquaculture*, **261** (1): 204-214.

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, L., Darnell. J. (2003). **Molecular Cell Biology**. Fifth Edition. W. H. Freeman Editorial. New York.The United States of America. 973 p.

López, H. J. L. (2009). Evaluación de la frecuencia y calidad de desove en reproductores de pez blanco de Pátzcuaro (*Menidia estor*) bajo condiciones controladas. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Biología. Michoacán, México. 32 pp.

Lund, I., Steenfeldt, S. J., Hansen, B. W. (2007). Effect of dietary arachidonic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on survival, growth and pigmentation in larvae of common sole (*Solea solea* L.). *Aquaculture*, **273**:532-544.

Lund, I., Steenfeldt, S. J., Banta, G., Hansen, B. W. (2008). The influence of dietary concentrations of arachidonic acid and eicosapentaenoic acid at various stages of larval ontogeny on eye migration, pigmentation and prostaglandin content of common sole larvae (*Solea solea* L.). *Aquaculture*, **276** (1-4): 143-153.

Lunn, J., Theobald, H. E. (2006). The health effects of dietary unsaturated fatty acids. British Nutrition Foundation. *Nutrition Bulletin*, **31**: 178-224.

Luquet, P., Watanabe, T. (1986). Interaction “nutrition-reproduction” in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, **2** (1-4): 121-129.

Martínez, P. C. A., Ríos, D. M. G., Campos, M. A., Toledo, C. M., Ross, L. G. (2002). Avances sobre el cultivo del pescado blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor estor.*

En: **Avances en la nutrición acuícola**. VI Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Cruz, S. I. E., Ricque, M. D., Tapia, S. M. Gaxiola, C. M. G., Simoes, N. 3 a 6 Septiembre, 2002. Cancún, Quintana Roo. México.

Martínez, P. C. A., Comas, M. J., Tello, B. J. A., Toledo, C. M., Ross, L. G. (2004). The effects of saline environments on survival and growth of eggs and larvae of *Chirostoma estor estor* Jordan 1880 (Pisces: Atherinidae). *Aquaculture*, **238**:509-522.

Martínez. P. C. A., Chávez, S. J. C., Santoyo, G. V. O., Campos, M. A., Martínez, C. C. C., Ross L. G. (2007). The effect of photoperiod on the reproduction of Chirostoma estor estor Jordan 1879 from Lago de Patzcuaro, Mexico. *Journal of Applicated Ichthyology*, **23**: 621-623.

Martínez, P. C. A., Ríos, D. M. G., Fonseca, M. J., Toledo, C. M., Sotelo, L. A., Ross, L. G. (2008). Developments in the nutrition of *Menidia estor* Jordan 1880. *Aquaculture Research*, **39**: 738-747.

Matlhagela, K., Taub, M. (2006). Prostaglandins regulate transcription by means of prostaglandin response elements located in the promoters of mammalian Na, K-ATPase β1 subunit genes. *Annuals of the New York Academy of Sciences*, **1091**: 233-243.

Masuda, S., Murakami, M., Matsumoto, S., Eguchi, N., Urade, Y., Lambeau, G., Gelb, M. H., Ishikawa, Y., Ishii, T., Kudo, I. (2004). Localization of various secretory phospholipase A_2 enzymes in male reprodcutive organs. *Biochemica et Byophisica Acta*, **1686**: 61-76.

Mazorra, C., Bruce, M., Bell, J. G., Davie, A., Alorend, E., Jordan, N., Rees, J., Papanikos, N., Porter, M., Bromage, N. (2003). Dietary lipid enhancement of broodstock reproductive performance and egg and larval quality in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, **227**:21-33.

Meinelt, T., Schulz, C., Wirth, M., Kürzinger, H., Steinberg, C. (1999). Dietary fatty acid composition influences the fertilization rate of zebrafish (Danio rerio Hamilton-Buchanan). *Journal of Applicated Ichthyology*, **15**: 19-23.

Mercure, F., Van Der Kraak, G. (1996). Mechanisms of action of free arachidonic acid on ovarian steroid production in the golsfish. *General and Comparative Endocrinology*, **102** (1): 130.140.

Miller, R. R. (2004). **Freshwater Fish of Mexico**. Edited by: Minckley, W. L., Norris, S. M., Gach H. M.. First Edition. University of Chicago Press Chicago. The United States of America. 652 pp.

Miranda, L. A., Cassará, M. C., Somoza, G. M. (2005). Increase in milt production by hormonal treatment in the pejerrey fish *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes 1835. *Aquaculture Research*, **36**: 1473-1479.

Moore, A., Olsen, K. H., Lower, N., Kindahl, H. (2002). The role of F-series prostaglandins as reproductive priming pheromones in the brown trout. *Journal of Fish Biology*, **60**: 613-624.

Mourente, G., Good, J. E., Bell, J. G. (2005). Partial substitution of fish oil with rapeseed, linseed and olive oils for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) effects on flesh fatty acids composition, plasma prostaglandins E_2 y $F2_\alpha$, immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Aquaculture Nutrition*, **11**: 25-40.

Moyle, P. B., Cech, J. J., Cech, J. (1999). **Fishes. An introduction to Ichthyology**. Pearson Education Press. Fourth Edition. The United States. 612 pp.

Navas, J. M., Bruce, M., Thrush, M., Farndale, B. M., Bromage, N., Zanuy, S., Carrillo, M., Bell, J. G., Ramos, J. (1997). The impact of seasonal alteration in the lipid composition of broodstock diets on egg quality in the European sea bass. *Journal of Fish Biology*, **51**: 760-773.

Nelson, D. L., Lenhinger, M. C. (2000). **Principles of Biochemistry**. W. H. Freeman and Company Editorial. Third Edition. New York, The United States. 1200 pp.

Nobel, S., Abrahmsen, L., Oppermann, U. (2001). Metabolic conversion as a pre-receptor control mechanism for lipophilic hormones. *European Journal of Biochemistry*, **268:** 4113-4125.

Nomura, T., Ogata, H., Ito, M. (1973). Ocurrence of prostaglandins in fish testis. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, **24** (3): 138-144.

Ogata, H., Nomura, T., Hata, M. (1979). Prostaglandin F2α changes induced by ovulatory stimuli in the pond loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **45** (7): 929-931.

Ogata, H. Y., Ahmed, K., Garibay, E. S., Chavez, D. R., Furuita, H. (2003). The importance of arachidonic acid in fry production of tropical/subtropical fish species. *JIRCAS Research Highlights*, []: 52-54.

Ogata, H. Y., Emata, A. C., Garibay, E. S., Furuita, H. (2004). Fatty acid composition of Five candidate aquaculture species in Central Philippines. *Aquaculture*, **236** (1-4): 361-375.

Olsen, A. I., Maeland, A., Waagbo, R., Olsen, Y. (2000). Effect of algal addition on stability of fatty acids and some water-soluble vitamins in juvenile *Artemia fransciscana*. *Aquaculture Nutrition*, **6**: 263-273.

Olvera, N., M. A., Martínez, P. C. A., Real de León, E. (1993). **Manual de Técnicas para laboratorio de nutrición de peces y crustáceos.** Programa Cooperativo Gubernamental FAO-Italia. Documento de Campo No. 7. México, D.F. 104 pp.

Om, A. D., Ji, H., Umino, T., Nakagawa, H., Sasaki, T., Okada, K., Asano, M., Nakagawa, A. (2003). Dietary effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic on lipid metabolism in black sea bream. *Fisheries Science*, **69**: 1182-1193.

Palacios, E., I. S. Racotta, H. Heras, Y. Marty, J. Moal, J. F. Samain. (2001). The relation between lipid and fatty acid composition of eggs and larval survival in white pacific shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture International*, **9**: 531-543.

Palacios, E., I. S. Racotta, Y. Marty, E. Kraffe, J. Moal, J. F. Samain. (2005). Lipid composition of the Pacific lion-paw scallop, Nodipecten (*Lyropecten*) *subnodosus*, in relation to gametogenesis. I. Fatty acids. *Aquaculture,* **250**: 270-282.

Palacios, E., Racotta, I., Aparicio, B., Arjona, O., Martínez, P. C. A. (2007). Lipid classes and fatty acids during embriogénesis of captive and wild silverside (*Chirostoma estor estor*) from Pátzcuaro Lake. *Fish Physiology and Biochemistry*, **33**: 81-91.

Palmtag, R. M., Faulk, C. K., Holt, G. J. (2006). Highly unsaturated fatty acid composition of rotifers (*Brachionus plicatilis*) and *Artemia* fed various enrichments. *Journal of World Aquaculture Society*, **1** (37): 126-131.

Pati, D., Habibi, H. R. (2002). Involvement of protein kinase C and arachidonic acid pathways in the gonadotropin-relasing hormone regulation of oocyte meiosis and follicular steroidogenesis in the goldfish ovary. *Biology of Reproduction*, **66**: 813-822.

Patiño, R., Yoshizaki, G., Bolamba, D., Thomas, P. (2003). Role of arachidonic acid and proteína kinase C during maturation-inducing hormona-dependent meiotic resumption and ovulation in ovarian follicles of Atlantic Croaker. *Biology of Reproduction*, **68**: 516-523.

Penney, R. W., Lush, P. L., Wade, J., Brown, J. A., Parrish, C. C., Burton, M. P. (2006). Comparative utility of egg blastomere morphology and lipid biochemistry for prediction of hatching success in Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Aquaculture Research*, **37**: 272-283.

Peter, R. E., Crim, L. W. (1979). Reproductive endocrinology of fishes. Gonadal cycles and gonadotropin in teleosts. *Annual Reviews of Physiology*, **41**: 323-335.

Pickova, J., Dutta, P. C., Larsson, P. O., Kiessling, A. (1997). Early embryonic cleavage pattern, hatching sucess, and egg-lipid fatty acids composition: comparasion between two cod (*Gadus morhua*) stocks. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **54** (10): 2410-2416.

Poole, W. R., Dillane, M. G. (1998). Estimation of sperm concentration of wild and reconditioned brown trout, *Salmo trutta* L. *Aquaculture Research*, **29**: 439-445.

Rainuzzo, J. R., Reitan, K. I., Olsen, Y. (1997). The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*, **155** (1-4): 103-115.

Reza, S. M. (2008). **Análisis de prostaglandinas en relación al ciclo reproductivo de ostión del placer (*Crassostrea corteziensis*)**. Tesis Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. S. C. La Paz, B. C. S. México. 150 pp.

Rodríguez , C., Cejas, J. R. , Martin, M. V., Badía, P., Samper, M., Lorenzo, A. (1998). Influence of n-3 highly unsaturated fatty acid deficiency on the lipid composition of broodstock gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) and on egg quality. *Fish Physiology and Biochemistry*, **18**: 177-187.

Ross, L. G., Martínez, P., C., A. (2005). **Towards a culture technology for pescado blanco *Chirostoma estor estor***. In : *Aquaculture News January Edition*. (December, 2004). Scotland, The United Kingdom. 1-2.

Rouzer, C. A., Marnett, L. J. (2005). Structural and functional differences between cyclooxygenases. Fatty acid oxygenases with a critical role in cell signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **338**: 34-44.

Ruggeri, B., Thoroughgood, C. A. (1985). Prostaglandins in aquatic fauna: a comprehensive review. *Marine Ecology Progress Series*, **23**: 301-306.

Ruiz, O., Amat, F., Navarro, J. C. (2008). A comparative study of the fatty acid profile of *Artemia fransciscana* and *A. persimilis* cultures at mesocosm scale. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **354**: 9-16.

Salze, G., Tocher, D. R., Roy, W. J., Robertson, D. A. (2005). Egg quality determinants in cod (*Gadus morhua* L.) egg performance and lipids in eggs from farmed and wild broodstock. *Aquaculture Research*, **36**: 1488-1499.

Sampath, H., Ntambi, J. M. (2005). Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annual Reviews of Nutrition*, **25**: 317-340.

Sánchez, R. B., Talamas, R. P. (2002). The importance of prostaglandins in hepatic amebiasis. *Salud Pública Mex*, **44:** 247- 257.

Santiago, C. B., Reyes, O. S. (1993). Effects of dietary lípido source on reproductive performance and tissue lipid levels of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) broodstock. *Journal of Applicated Ichthyology*, **9**: 33-40.

Sargent, J. R., Bell, V., 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**. Drevon, C. A., Baksaas, I., Krokan, H. E. Editors. First Edition. Birkhauser. Basel.139-149 p..

Sargent, J. R. (1995a). Origins and functions of egg lipids: nutritional implications. In: **Broodstock management and egg and larval quality.** N. R. Bromage and J. R. Roberts (Eds).. Blackwell Sciences. First Edition. Oxford, England. 424 pp.

Sargent, J. R., Bell, J. G., Henderson, R. J., Tocher, D. R. (1995b). Requirement criteria for essential fatty acids. *Journal of Appl. Ichthyology*, **11**: 183-198.

Sargent, J. R., McEvoy, L. A., Bell, J. G. (1997). Requeriments, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, **155** (1-4): 117-127.

Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J., Tocher, D. (1999). Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture,* **179** (1-4): 217-229.

Smith, W. L., Murphy, R. C. (2002). The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase and epoxygenase pathways. En: Vance, D. E., Vance J. E. (2004). **Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes**. New Comprehensive Biochemistry. Volume 36. Elsevier Editorial. First Edition. Amsterdam, The Netherlands. 607 pp.

Sokal, R. R., Rohlf, F. J. (1981). Biometry: **The principles and practice of statistics in biological research**. W.H. Freeman and Company Editorial. Second edition. San Franscisco, California. The United States of America. 859 pp.

Sorbera, L. A., Asturiano, J. F., Carrillo, M., Zanuy, S. (2001). Effects of polyunsaturated fatty acids and prostaglandins on oocyte maturation in a marine teleost, the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biology of Reproduction*, **64**: 382-389.

Sorensen, P. W., Hara, T. J., Stacey, N., Goetz, F. W. (1988). F Prostaglandins function as potent olfactory stimulants that comprise the postovulatory female sex pheromone in goldfish. *Biology of Reproduction*, **39**: 1039-1050.

Sorensen, P. W. (1992). Hormonally derived sex pheromones in goldfish: a model for understanding the evolution of sex pheromone systems in fish. *The Biological Bulletin*, **183** (1): 173-177.

Stacey, N. E. (1976). Effects of indomethacin and prostaglandin on spawning behavior of female goldfish. *Prostaglandins*, **12**: 113-126.

Stacey, N. E., Goetz, F. W. (1982). Role of prostaglandins in fish reproduction. *Journal of Fish. Aquat. Science*, **39**: 92-98.

Stanley, D. W. (2000). **Eicosanoids in Invertebrate Signal Transduction Systems.** Princenton University Press. First Edition. The United States of America. 277 pp.

Steffens, W. (1997a). Effects of variation in essential fatty acids in fish feeds on nutritive value of freshwater fish for humans. *Aquaculture*, **151** (1-4): 97-119.

Steffens, W., Wirth, M. (1997b). Influence of nutrition on the lipid quality of pond fish: common carp (*Cyprinus carpio*) and tench (*Tinca tinca*). *Aquaculture International*, **15** (3-4): 313-319.

Stenslokken, K. O., Sundin, L., Nilsson, G. E. (2005). Endothelin receptors in teleost fishes: cardiovascular effects and brnachial distribution. *The American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology,* **290**: 852-860.

Tahara, D., Yano, I. (2003). Development of hemolymph prostaglandins assay systems and their concentration variations during ovarian maturation in the kumura prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, **220**: 791-800.

Tanaka, T., Iwawaki, D., Sakamoto, M., Takai, Y., Morishige, J. I., Murakami, K., Stouchi, K. (2003). Mechanisms of accumulation of arachidonate in phosphatidyl inositol in yellowtail. *European Journal of Biochemistry*, **270**: 1466-1473.

Tessier, A. P., Pageaux, J. F., Fayard, J. M., Lagarde, M., Laugier, C., Cohen, H. (1996). Arachidonic acid up-regulates and prostaglandin E_2 down-regulates the expression of pancreatic-type phospholipase A_2 and prostaglandin-endoperoxide synthase 2 in uterine stromal cells. *European Journal of Biochemistry*, **241**: 872-878.

Tocher, D. R. (1995). Glycerophospholipid metabolism**.** In: **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**. Metabolic Biochemistry. Hochachka, P. W., Mommsen, T. P. Volume 4. Elsevier Series Editor. First Edition. Amsterdam, The Netherlands. 515 pp.

Tocher, D. R., Bell, J. G., Dick, J. R., Henderson, R. J., McGhee, F., Michell, D., Morris, P. C. (2000). Polyunsaturated fatty acids metabolism in Atlantic salmon

(*Salmo salar*) undergoing parr-smolt transformation and the effects of dietary linseed and rapeseed oils. *Fish Physiology and Biochemistry*, **23**:59-73.

Tocher, D. R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, **11**(2): 107-184.

Tocher, D. (2008). Relevance of essentials fatty acids metabolism in fish to human nutrition. In: *SciTopics. Research summaries by experts*.(www.scitopics.com).

Trillart, G. V. D., Vianen, G., Zaagsma, J. (2002). Adrenergic Regulation of lipid mobilization in fishes; a possible role in hypoxia survival. *Fish Physiology and Biochemistry*, **27**: 189-204.

Van Anholt, R. D., Koven, W. M., Lutzky, S. E., Wendelaar Bonga, S. E. (2004a). Dietary supplementation with arachidonic acid alters the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, **238**: 369-383.

Van Anholt, R. D., Spanings, F. A. T., Koven, W. M., Lutzky, S. E., Wendelaar Bonga, S. E. (2004b). Dietary supplementation with arachidonic acid in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) reveals physiological effects not mediated by prostaglandins. *General and Comparative Endocrionology*, **139**: 215-226.

Van Anholt, R. D., Spanings, F. A. T., Koven, W. M., Nixon, O., Bonga, S. E. W. (2004c). Arachidonic acid reduces the stress response of gilthead seabream *Sparus aurata* L. *The Journal of Experimental Biology*, **207**: 3419- 3430.

Van der Kraak, G., Chang, J. P. (1990). Arachidonic acid stimulates steroidogenesis in golsfish preovulatory ovarian follicles. *General and Comparative Endocrinology*, **77:** 221-228.

Van der Kraak, G., Biddiscombe, S. (1999). Polyunsaturated fatty acids modulate the properties of the sex steroids binding protein in goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry*, **20**: 115-123.

Venkatesh, B., Tan, C. H., Lam, T. J. (1992). Prostaglandin synthesis in vitro by ovarian follicles and extrafollicular tissue of the viviparous guppy (*Poecilia reticulata*) and its regulation. *Journal of Experimental Zoology*, **262** (4): 405-415.

Villalta, M., Estévez, A., Bransden, M. P. (2005). Arachidonic acid enriched live prey induces albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture,* **245**: 193-209.

Wade, M. G., Van Der Kraak, G., Gerrits M. F., Ballantyne, J. S. (1994). Release and steroidogenic actions of polyunsaturated fatty acids in the Goldfish testis. *Biology of Reproduction*, **51:** 131-139**.**

Wade, M. G., Van Der Kraak, G. (1996). Arachidonic acid and prostaglandin E2 stimulate testosterone production by goldfish testis in vitro. *Gen-Comparative Endocrinology*, **90** (1): 109-118.

Watanabe, T. (1993). Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *Journal of the World Aquaculture Society*, **24** (2): 152-161.

Willey, S., Bengtson, D. A., Harel, M. (2003). Arachidonic acid requirements in larval summer flounder, *Paralichthys dentatus*. *Aquaculture International*, **11**: 131-149.

Wirtz, S., Steinmann, P. (2006). Sperm characteristics in perch *Perca fluvialitis* L. *Journal of Fish Biology*, **68**: 1896-1902.

Yamaguchi, S., Gen, K., Okuzawa, K., Matsuyama, Kagawa, H. (2006). Influence of estradiol-17β, testosterone, and 11-ketostestosterone on testicular development, serum steroid hormone, and gonadotropina secretion in male red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science*, **72**: 835-845.

Zaboukas, N., Miliou, H., Megalofonou, P., Apostolopoulou, M. M. (2006). Biochemical composition of the Atlantic bonito (*Sarda sarda*) from Aegean sea (eastern Mediterrean sea) in different stages of sexual maturity. *Journal of Fish Biology*, **69** (2): 347-362.

ANEXO 1

COMPOSICIÓN BIOQUIMICA DEL ALIMENTO PELETIZADO

ANÁLISIS BROMATOLÓGICOS

Procesamiento general de las muestras de alimento peletizado

Se utilizaron muestras aleatorias (15 g) por triplicado para cada tipo de alimento peletizado (*Azoo*® y *Purina*®) obtenidas de diferentes lotes utilizados a lo largo de la fase experimental, las cuales fueron mantenidas a -20˚C hasta su análisis. Las muestras se molieron finamente, tamizándose y mezclándose para obtener 3 submuestras (5 g) de cada tipo de alimento para determinar el contenido (%) de humedad, proteína cruda (nitrógeno total), grasas (extracto etéreo), cenizas, y extracto libre de nitrógeno de cada tipo de alimento (3 replicas/alimento) mediante el método Weende (Olvera *et al*., 1993; AOAC 2000).

Humedad

Las muestras (3 réplicas/alimento) y los recipientes contenedores fueron pesados (g) y secados a 105 ˚C en un horno durante 12 horas para determinar el peso seco (g) de cada muestra utilizando la siguiente fórmula (7):

Humedad (%) = 100 (((B-A) – (C-A))/(B-A))

Donde:
A= peso del recipiente que contendrá a la muestra, limpio y seco
B= peso del recipiente + muestra húmeda
C= peso del recipiente + muestra seca

Proteína cruda

El contenido de proteína cruda (nitrógeno total) en los alimentos (3 replicas/alimento) se analizó utilizando con el método de Dumas. Se utilizó un auto-analizador de nitrógeno proteína (*LECO*® FP528) utilizando muestras de 1 g para cada tipo de alimento (*Azoo*® y *Purina*®) por triplicado de acuerdo a lo descrito en (AOAC, 2000).

Extracto etéreo

El extracto etéreo de los alimentos peletizados (3 réplicas/alimento) se analizó en un equipo *Soxtec Avanti Tecator*® 2050 (AOAC, 2000) utilizando éter de petróleo como solvente.

Cenizas

El contenido de cenizas (%) de los alimentos peletizados (3 réplicas/alimento) se obtuvo mediante calcinación de la muestra a 550 ºC en un mufla durante 12 horas de acuerdo a lo propuesto por Olvera *et al.* (1993).

Extracto libre de Nitrógeno

El extracto libre de Nitrógeno (ELN) de los alimentos peletizados (3 réplicas/alimento) se calculó de acuerdo a lo descrito por Olvera *et al*. (1993) utilizando la siguiente fórmula (8):

$$ELN=100\% - (\%_{humedad} + \%_{cenizas} + \%_{proteínas} + \%_{extracto\ étereo})$$

Composición de ácidos grasos

Las muestras (0.50g±30%) de alimento peletizado (*Azoo*® y *Purina*®) fueron homogenizadas (3 réplicas/alimento) en un mortero a 5˚C y almacenadas en frascos de vidrio (8 ml) adicionando agua destilada (250 µl) hasta obtener una mezcla homogénea con una varilla de vidrio a 5˚C. Posteriormente, se adicionaron 6 ml de solución de Folch (2:1 cloroformo: metanol, v/v), 10 µl de BHT como antioxidante y 10 µl de 23:0 (*Sigma*®) como estándar interno a cada muestra para ser almacenadas a -20˚C. Las muestras se llevaron a temperatura ambiente para evaporarlas a sequedad mediante flujo constante de nitrógeno gaseoso a 30˚C, adicionando 1000 µl de trifloruro de boro al 14% en metanol (BF_3, *Supelco*®) a 85˚C durante 15 min. Posteriormente se agregaron 1000 µl de hexano (*Burdick & Jackson*®) cada muestra, realizando lavados consecutivos con agua destilada (3000 rpm, 5˚C, 5 min.). Finalmente, las muestras fueron diluidas (1:10) para la evaluación de la composición de los ácidos grasos metil-esterificados por cromatografía de gases de acuerdo a los descrito por Arjona y Palacios (2009).

ANEXO 2
ENRIQUECIMIENTO DE ARTEMIA ADULTA (*A. franciscana*) CON ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

OBJETIVO

Evaluar la composición de ácidos grasos de artemia adulta (*A. franciscana*) enriquecida con una emulsión con diferentes niveles de ácido araquidónico (0%,3% y 16%) durante diferentes períodos de enriquecimiento (6, 12, 18 y 24 horas).

MATERIAL Y MÉTODOS

Eclosión y cultivo de artemia (*A. franciscana*)

Quistes (50 g L^{-1}) de artemia (*A. franciscana*) (*Salt Creek*®) fueron hidratados durante una hora con agua 0 psu y aireación constante. Después de la hidratación, los quistes se desencapsularon utilizando una solución de hipoclorito de sodio (13.2 g L^{-1}) y posteriormente una solución de tiosulfato de sodio (10 g L^{-1}). Una vez que los huevos fueron desencapsulados, se almacenaron a -5˚C durante un período no mayor a 5 días. Los huevos (2 g L^{-1}) se incubaron en tanques de 50 L con agua a 30 psu y temperatura de 25 ± 1˚C utilizando termostatos sumergibles (*Azoo*®) con iluminación (60 watts) y aireación constante durante 24 horas. Los nauplios de artemia fueron tamizados (100 µm) y enjuagados con agua (30 psu) antes de ser sembrados en un sistema de cultivo que consistió de 7 tanques de lámina de aluminio (2000 L) con agua 30 ± 5 psu (cada 8 días), fotoperiodo natural (12L:120), temperatura ambiente, aireación constante y recambio de agua de 30% cada 8 días (Fig. 35A). Se les proporcionó microalga (*Chlorella* spp.) diariamente en una cantidad aprox. de 20 L diarios y leche de soya (*Maxilac*®) cada tercer día en una cantidad aprox. de 6-9 g L^{-1}

agua. A partir del día 30 posterior a la eclosión, las artemias fueron utilizadas para el experimento de enriquecimiento con diferentes niveles de ácido araquidónico (0%, 3% y 16%).

Cultivo de microalgas

Se estableció un cultivo de microalgas (*Chlorella* spp.) en un invernadero, en dos tanques cónicos de fibra de vidrio (100 L) con aireación constante, a una temperatura promedio de 25°C, utilizando como medio de cultivo un fertilizante comercial 24N:17P:13K (*Bayfoland*, BAYER®) (Fig. 35B).

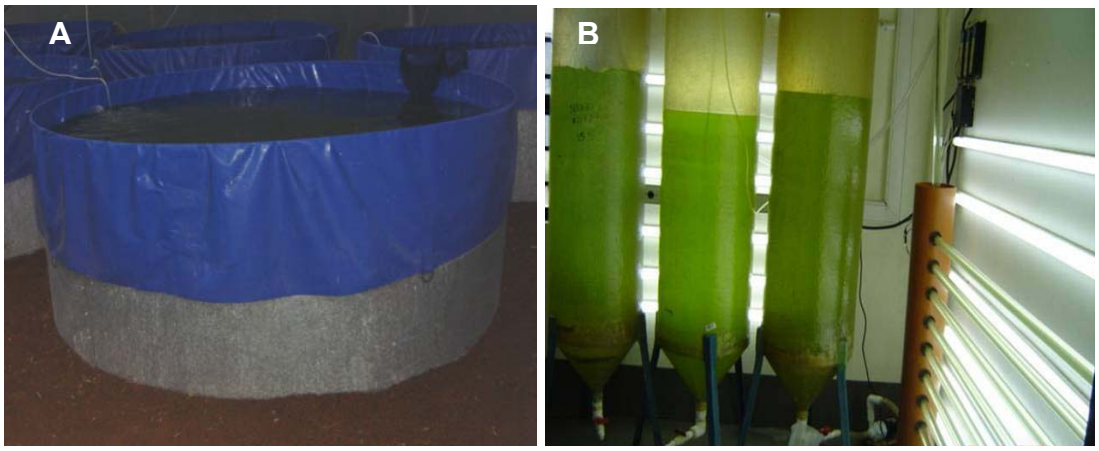

FIGURA 35. A. Cultivo de artemia adulta (*A. franciscana*). **B.** Cultivo de microalga (*Chlorella* spp.).

Preparación de las emulsiones experimentales

Emulsión de aceite de girasol

Las emulsiones experimentales fueron preparadas utilizando como base una emulsión de aceite comercial de girasol (*Cristal*®). La emulsión de aceite de girasol se preparo en la proporción detallada en la Tabla XVI.

Tabla XVI. Composición (g) general de la emulsión aceite de girasol.

Ingrediente	Proporción (%)	Cantidad (g)
Aceite de girasol	60.0	60.0
Tween 80*	10.0	10.0
Vitamina E**	0.10	0.10
BHT	0.02	0.02
Agua 30 psu	29.8	29.8
Total	**100**	**100**

**Sigma ** DMS Nutritionist Products*.

Cada ingrediente fue pesado e incorporado en las proporciones descritas en la Tabla XVII, usando un vaso de precipitado (50mL) en baño con hielo y un homogenizador (Power Gen 700, *Fisher Scientific*®) por un período máximo de mezcla de 1 minuto. Las emulsiones se almacenaron a –5˚C en total oscuridad hasta su utilización (máximo 24 horas).

Emulsiones ricas en ARA

Las emulsiones experimentales ricas en ARA (3 y 16%) se prepararon mezclando la emulsión ARA-ICES (ICES, 1997) con la emulsión de aceite de girasol (0% ARA) en las proporciones descritas en la Tabla XVII.

Tabla XVII. Proporción (%) de las emulsiones experimentales 0, 3y 16% ARA.

Ingrediente (mg)	Emulsión (ARA	Emulsión 3%ARA	Emulsió 16% ARA
Emulsión Aceite de girasol	50	5	30
ARA -ICES	0	45	20
Total	**50**	**50**	**50**

Para la composición de ácidos grasos (%) del aceite de girasol y la emulsión ARA-ICES así como de las emulsiones experimentales (0%, 3% y 16% ARA) se tomaron muestras de 25mg±30% por triplicado, las cuales se almacenaron en viales de vidrio de 8 ml para adicionales 6 ml de solución de Folch (cloroformo: metanol, 2:1 v/v) para

la extracción de lípidos, usando 10 µl de BHT (ICN *Biomedicals*®) como antioxidante y 10 µl de C23:0 (*Sigma*®) como estándar interno. Finalmente, las muestras se almacenaron en la oscuridad a -20˚C hasta el análisis de la composición de ácidos grasos, como se describe en el anexo 1 y la composición se detalla en las Tablas XVIII, XIX respectivamente.

Tabla XVIII. Proporción de ácidos grasos (%) del aceite de girasol y la emulsión ARA (ICES, 1997).

Ácido graso	Aceite girasol	ARA (ICES, 1997
14:0	0.18±0.10	1.05±0.08
16:0	6.06±0.09	15.67±0.10
18:0	2.04±0.20	7.62±0.29
20:0	0.24±0.04	0.43±0.91
22:0	0.26±0.09	0.57±0.22
24:0	0.07±0.02	0.53±0.15
18:1n-9	43.83±1.23	20.84±0.55
18:1n-7	2.03±0.08	0.96±0.05
20:1n-7	0.10±0.05	0.14±0.04
24:1n-9	0.06±0.02	0.06±0.01
18:2n-6	37.82±1.60	17.49±0.47
18:3n-6	0.17±0.03	2.97±0.22
18:4n-6	0.26±0.08	0.25±0.28
20:2n-6	0.03±0.005	0.34±0.04
18:3n-3	5.31±0.31	1.43±0.12
20:4n-6	0.00±0.00	25.96±0.90
20:5n-3	0.09±0.04	0.20±0.14
22:4n-6	0.05±0.004	0.03±0.01
22:6n-3	0.00±0.00	0.08±0.02
Σ SAT.	9.07±0.45	27.49±0.36
Σ MUFA	47.20±1.45	23.77±0.73
Σ PUFA	43.73±1.51	48.77±0.39
n-3/n-6	0.14±0.01	0.04±0.003
22:6/20:5	0.00±0.00	1.01±0.57
20:4/20:5	0.00±0.00	311.0±129.0

Tabla XIX. Proporción de ácidos grasos (%) de las emulsiones experimentales (0%, 3% y 16% ARA)

Ácido graso	0% ARA	3% ARA	16% ARA	P<0.05
14:0	**0.27±0.11[a]**	**0.42±0.03[ab]**	**0.74±0.01[b]**	**0.02**
16:0	**5.84±0.31[a]**	**7.09±0.12[b]**	**11.73±0.18[c]**	**0.00**
18:0	**1.98±0.23[a]**	**2.69±0.18[a]**	**5.36±0.19[b]**	**0.00**
20:0	0.24±0.04	0.41±0.11	0.40±0.03	0.17
22:0	0.20±0.05	0.27±0.04	0.33±0.16	0.88
24:0	**0.08±0.01[a]**	**0.10±0.04[a]**	**0.34±0.08[b]**	**0.02**
18:1n-9	**45.65±2.19**	**43.03±0.50[b]**	**31.41±0.62[a]**	**0.00**
18:1n-7	**2.09±0.11[b]**	**1.99±0.06[b]**	**1.45±0.06[a]**	**0.00**
20:1n-7	**0.06±0.02[a]**	**0.18±0.03[b]**	**0.04±0.02[a]**	**0.02**
24:1n-9	0.05±0.01	0.06±0.02	0.06±0.01	0.84
18:2n-6	**36.01±2.13**	**32.66±0.48[b]**	**24.73±0.04[a]**	**0.00**
18:3n-6	**0.16±0.12[a]**	**0.40±0.03[a]**	**1.83±0.05[b]**	**0.00**
18:4n-6	0.30±0.14	0.39±0.06	0.31±0.03	0.68
20:2n-6	**0.07±0.03[a]**	**0.07±0.01[a]**	**0.23±0.03[b]**	**0.01**
18:3n-3	**5.18±0.54[b]**	**4.62±0.21[b]**	**2.93±0.09[a]**	**0.00**
20:4n-6	**0.00±0.00[a]**	**2.99±0.21[b]**	**15.68±0.81[c]**	**0.00**
20:5n-3	0.04±0.01	0.11±0.08	0.08±0.04	0.69
22:4n-6	0.06±0.02	0.17±0.08	0.04±0.02	0.14
22:6n-3	**0.00±0.00[a]**	**0.07±0.01[c]**	**0.02±0.003[b]**	**0.00**
Σ SAT.	**8.79±0.59[a]**	**11.29±0.279[b]**	**19.55±0.107[c]**	**0.00**
Σ MUFA	**49.38±2.66**	**47.2±0.794[b]**	**34.6±0.812[a]**	**0.00**
Σ PUFA	41.83±2.41	41.5±0.641	45.85±0.845	0.16
n-3/n-6	**0.14±0.01[b]**	**0.13±0.005[b]**	**0.07±0.001[a]**	**0.00**
22:6/20:5	**0.0±0.0[a]**	**1.32±0.532[b]**	**0.29±0.120[ab]**	**0.01**
20:4/20:5	**0.0±0.0[a]**	**66.19±34.16[a]**	**262.62±86.137**	**0.01**

Enriquecimiento de artemia adulta (*A. franciscana*).

Se utilizaron artemias adultas (*A. franciscana*) ayunadas (12 h) en agua a 30 psu, 25 ± 1˚C, aireación constante y fotoperiodo L12:12O. El diseño experimental consistió de 3 réplicas (12.5$g_{artemia}$: 1$g_{emulsiónARA}$: 1L agua 30 psu) por tratamiento (0%, 3% y 16% ARA) con cuatro tiempos de enriquecimiento (6, 12, 18 y 24 horas), donde la emulsión se ofreció a las artemias solo al inicio del período de enriquecimiento. Al término del tiempo de enriquecimiento, las artemias fueron enjuagadas con agua 0 psu utilizando una malla (400 µm). Se obtuvieron muestras de artemia adulta (50mg±30%) por

triplicado de cada tratamiento (0%, 3% y 16% ARA) para cada tiempo de enriquecimiento (6, 12, 18 y 24 horas), las cuales se colocaron en 6 ml de solución de Folch (cloroformo: metanol, 2:1 v/v) para la extracción de lípidos, usando 10 µl de BHT (ICN *Biomedicals*®) como antioxidante y 10 µl de C23:0 (*Sigma*®) como estándar interno. Finalmente, las muestras se almacenaron en la oscuridad a -20˚C hasta el análisis de la composición de ácidos grasos, como se detalla anteriormente.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados para su normalidad con una prueba de Anderson-Darling y para su homocedasticidad con una prueba de Levene. Se utilizó una prueba de varianza bifactorial considerando como primer variable independiente el período de enriquecimiento (6, 12, 18 y 24 horas) y como segunda variable independiente el nivel de ARA (0%, 3% y 16%) suministrado a las artemias. El análisis de la comparación entre las medias de los diferentes tratamientos se realizó mediante una prueba de Tukey ($P<0.05$). Los datos se expresaron como la media ± error estándar de la media, utilizándose el software *Statistica* versión 5.5.

RESULTADOS

La proporción (%) de ácidos grasos de la artemia adulta (*A. franciscana*) enriquecida con diferentes niveles de ARA (0%, 3% y 16%) durante diferentes períodos de tiempo (6, 12, 18 y 24 horas) se muestra en la Tabla XX. Se observó efecto significativo por efecto de dieta para los ácidos grasos 16:0, 18:0, 20:0, 21:0, 24:0, 18:1n-9, 18:3n-6, 20:2n-6, 18:3n-3 y 20:4n-6. En particular el 20:4n-6 fue afectado por la dieta, con valores promedio de 2.97±0.08, 4.20±0.16 y 8.11±0.60 para la dieta de 0%, 3% y

16%, respectivamente (Fig. 36). Solamente se observó efecto significativo por efecto de tiempo para el 16:0 y solamente se observó interacción significativa para el 18:2n-6, con mayores niveles de en las artemias enriquecidas con 0 y 3% ARA durante 6 y 18 horas. Finalmente, el contenido de DHA y EPA permanecieron constantes para todos los tratamientos durante los diferentes períodos de enriquecimiento. Debido a una variación significativa de 20:4n-6 y 18:2-6, la proporción de n-3:n-6 fue modificada, siendo que la proporción de ARA/EPA aumentó significativamente en las artemias adultas (*A. franciscana*) enriquecidas con 16% ARA.

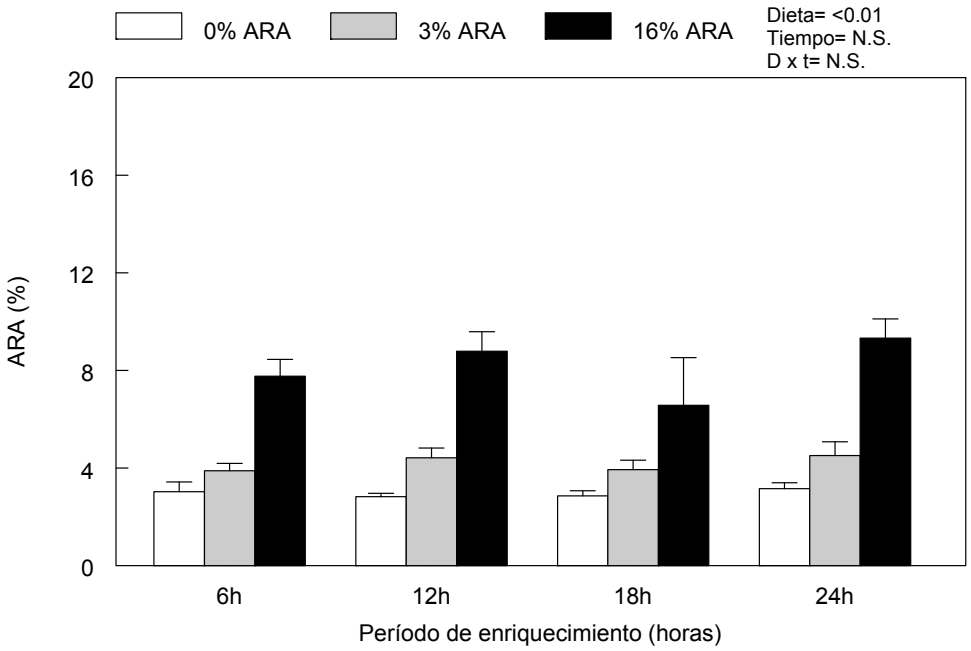

FIGURA 36. Proporción de ARA (%) en la artemia adulta (*A. franciscana*) enriquecida con diferentes niveles de ARA durante diferentes períodos de tiempo.

Tabla XX. Proporción de ácidos grasos (%) de la artemia adulta (*A. franciscana*) enriquecida con diferentes niveles de ARA durante diferentes períodos de tiempo.

Ácido graso	**0% ARA**				**3% ARA**				**16% ARA**				**Dieta**	**Tiempo**	**D x t**
	6 h	12 h	18 h	24 h	6 h	12 h	18 h	24 h	6 h	12 h	18 h	24 h			
14:0	0.98±0.15	0.89±0.10	0.76±0.07	0.79±0.10	0.69±0.02	0.75±0.07	0.86±0.08	0.78±0.07	0.96±0.13	0.87±0.11	0.99±0.15	0.86±0.16	N.S.	N.S.	N.S.
16:0	11.21±0.66	10.50±0.48	9.34±0.23	9.32±0.48	9.63±0.19	9.86±0.20	10.06±0.25	9.47±0.42	11.49±0.48	11.19±0.20	10.27±0.87	10.66±0.40	**<0.01**	**<0.05**	N.S.
17:0	2.04±0.12	1.85±0.12	1.57±0.02	1.79±0.07	1.69±0.12	1.76±0.08	1.85±0.09	1.85±0.11	2.04±0.17	1.61±0.20	1.84±0.18	1.88±0.14	N.S.	N.S.	N.S.
18:0	6.11±0.20	6.09±0.25	5.92±0.23	5.96±0.26	6.06±0.26	6.06±0.36	6.14±0.24	6.03±0.36	6.86±0.14	7.04±0.17	6.44±0.51	7.27±0.07	**<0.01**	N.S.	N.S.
20:0	0.14±0.01	0.17±0.01	0.17±0.03	0.14±0.02	0.20±0.01	0.18±0.02	0.14±0.009	0.15±0.009	0.23±0.03	0.19±0.03	0.16±0.02	0.21±0.01	**<0.01**	N.S.	N.S.
22:0	1.06±0.89	0.19±0.02	0.20±0.04	0.17±0.02	0.24±0.01	0.22±0.03	0.18±0.01	0.19±0.02	0.32±0.04	0.29±0.04	0.20±0.03	0.3±0.03	N.S.	N.S.	N.S.
16:1n-9	4.35±0.25	4.75±0.81	3.37±0.21	3.52±0.16	2.79±0.85	4.06±0.17	3.72±0.20	3.35±1.08	4.16±0.10	3.64±0.28	4.05±0.54	4.16±0.97	N.S.	N.S.	N.S.
16:1n-7	1.47±0.14	0.92±0.32	1.31±0.05	1.35±0.07	1.72±0.61	1.10±0.03	1.26±0.07	2.05±0.78	1.22±0.15	1.17±0.08	1.20±0.08	0.86±0.29	N.S.	N.S.	N.S.
17:1n-8	1.94±0.14	1.60±0.09	1.34±0.07	1.45±0.10	1.43±0.02	1.49±0.13	1.53±0.05	1.42±0.07	1.70±0.14	1.54±0.22	1.67±0.13	1.40±0.11	N.S.	N.S.	N.S.
18:1n-9	28.38±0.43	30.15±0.77	32.39±0.52	31.85±0.93	31.38±1.63	30.74±0.90	30.72±0.86	31.14±1.02	26.31±0.08	26.83±0.69	28.63±1.96	26.94±0.54	**<0.01**	N.S.	N.S.
18:1n-7	8.88±0.29	8.54±0.50	8.19±0.07	8.50±0.26	7.96±0.35	8.52±0.45	8.52±0.31	8.84±0.46	8.41±0.07	7.90±0.23	8.10±0.19	8.37±0.24	N.S.	N.S.	N.S.
20:1n-11	0.23±0.02	0.28±0.02	0.28±0.05	0.27±0.05	0.23±0.07	0.30±0.03	0.23±0.03	0.30±0.01	0.26±0.03	0.24±0.02	0.31±0.04	0.28±0.02	N.S.	N.S.	N.S.
22:1n-9	0.23±0.15	0.13±0.08	0.13±0.03	0.35±0.11	0.44±0.08	0.24±0.10	0.20±0.04	0.16±0.02	0.37±0.05	0.22±0.07	0.11±0.03	0.14±0.03	N.S.	N.S.	N.S.
18:2n-6	**13.42±0.63^{ab}**	**16.43±0.45^{abc}**	**18.09±0.21^{c}**	**17.11±0.95^{bc}**	**17.53±0.78^{c}**	**16.56±0.87^{abc}**	**15.88±0.29^{abc}**	**16.66±1.54^{abc}**	**13.22±0.30^{a}**	**13.25±0.19^{a}**	**15.25±1.29^{abc}**	**13.45±0.28^{ab}**	**<0.01**	**N.S.**	**<0.01**
18:3n-3	10.75±0.51	8.82±0.59	8.43±0.44	8.50±0.37	8.35±0.35	8.30±0.29	8.98±0.89	7.66±0.48	8.26±0.26	8.54±0.45	8.34±0.49	7.87±0.26	**<0.05**	N.S.	N.S.
18:4n-6	0.70±0.02	0.52±0.05	0.49±0.05	0.50±0.07	0.52±0.09	0.53±0.05	0.55±0.04	0.49±0.01	0.53±0.02	0.57±0.09	0.52±0.03	0.53±0.03	N.S.	N.S.	N.S.
20:4n-6	3.03±0.40	2.83±0.14	2.86±0.21	3.16±0.24	3.89±0.30	4.42±0.40	3.93±0.39	4.51±0.57	7.77±0.68	8.79±0.80	6.57±1.96	9.33±0.78	**<0.01**	N.S.	N.S.
20:5n-3	2.52±1.02	2.89±0.22	2.64±0.17	2.91±0.22	2.72±0.40	2.93±0.35	2.86±0.31	2.85±0.40	2.79±0.23	2.96±0.23	2.67±0.24	2.66±0.18	N.S.	N.S.	N.S.
22:4n-6	0.19±0.03	0.25±0.06	0.42±0.13	0.16±0.06	0.26±0.10	0.13±0.03	0.20±0.04	0.14±0.03	0.27±0.13	0.19±0.05	0.26±0.16	0.20±0.10	N.S.	N.S.	N.S.
22:6n-3	0.09±0.04	0.06±0.01	0.06±0.01	0.08±0.04	0.10±0.03	0.07±0.02	0.06±0.01	0.08±0.02	0.06±0.004	0.05±0.006	0.07±0.02	0.10±0.02	N.S.	N.S.	N.S.
Σ SAT.	22.65±2.08	20.70±0.97	18.88±0.63	19.09±0.10	19.32±0.58	19.63±0.37	20.18±0.15	19.46±0.94	23.09±0.69	22.55±0.25	20.98±1.83	22.21±0.75	**<0.01**	N.S.	N.S.
Σ MUFA	46.18±0.41	47.06±0.27	47.72±0.21	48.07±0.48	46.81±0.93	46.89±0.74	46.87±0.65	47.61±0.25	43.12±0.25	42.16±0.87	44.63±1.57	42.72±0.59	**<0.01**	N.S.	N.S.
Σ PUFA	31.17±1.87	32.23±1.02	33.39±0.75	32.84±0.63	33.87±0.37	33.48±0.69	32.95±0.77	32.93±0.92	33.79±0.87	35.3±1.08	34.39±1.02	35.07±1.33	**<0.05**	N.S.	N.S.
(n-3)/(n-6)	**0.75±0.03^{b}**	**0.57±0.03^{ab}**	**0.50±0.03^{a}**	**0.54±0.04^{ab}**	**0.49±0.03^{a}**	**0.51±0.04^{a}**	**0.57±0.05^{ab}**	**0.48±0.07^{a}**	**0.49±0.02^{a}**	**0.49±0.03^{a}**	**0.48±0.04^{a}**	**0.43±0.01^{a}**	**<0.01**	**N.S.**	**0.03**