



Máster en Biodiversidad

**Variación en los parámetros fisiológicos y valores isotópicos  
en sangre del tiburón demersal *Scyliorhinus canicula*  
(Linnaeus, 1758) en relación a la estación del año, al sexo y al  
estado de madurez**

**Elisenda Valls Mateus**

Directores:

Tutor:

**Dr. Joan Navarro Bernabé**

Departamento de Recursos Marinos  
Renovables  
Institut de Ciències del Mar – CSIC

**Dr. Jaume Fernández-Borràs**

Departamento de Fisiología  
Facultad de Biología  
Universitat de Barcelona

**Claudio Barría Oyarzo**

Departamento de Recursos Marinos  
Renovables  
Institut de Ciències del Mar – CSIC

8 de Septiembre de 2014



Máster en Biodiversidad

**Variación en los parámetros fisiológicos y valores isotópicos en sangre del tiburón demersal *Scyliorhinus canicula* (Linnaeus, 1758) en relación a la estación del año, al sexo y al estado de madurez**

**Elisenda Valls Mateus**

Directores:

Tutor:

**Dr. Joan Navarro Bernabé**

Departamento de Recursos Marinos  
Renovables  
Institut de Ciències del Mar – CSIC

**Dr. Jaume Fernández-Borràs**

Departamento de Fisiología  
Facultad de Biología  
Universitat de Barcelona

**Claudio Barría Oyarzo**

Departamento de Recursos Marinos  
Renovables  
Institut de Ciències del Mar – CSIC

8 de Septiembre de 2014

## **ABSTRACT**

Marine predators such as elasmobranchs exhibit variations in nutritional requirements related to reproductive traits or conditioned by variations in food availability in the marine environment throughout the year.

In this study, the main objective was to examine how certain physiological parameters and stable isotope values in blood of demersal shark *Scyliorhinus canicula* in the wild change in relation to season, sex and maturity stage change. For this purpose, plasma lipid fractions (cholesterol, triglycerides, phospholipids), a ketone body metabolite (3-hydroxybutyrate) and isotopic values of N and C in blood of *Scyliorhinus canicula* individuals captured and released alive in the Western Mediterranean were analyzed.

The results indicated that the isotopic values changed between summer and winter, males and females and mature and immature individuals. In relation to the physiological parameters we found that during summer triglycerides and phospholipids values were lower in mature individuals (especially in females, probably due to breeding season and laying eggs) and higher in immature specimens, indicating a higher physical activity than in winter. Cholesterol showed high values in summer, probably related to the reproduction. In the case of 3-hydroxybutyrate, the observed pattern was different from the other physiological parameters. Mature males showed higher values than other individuals during the winter season, indicating some physical activity, both mature and immature males showed higher values of this parameter in comparison to females during winter. During summer we found no differences by sex or maturity stage in the values of this metabolite.

This study uses an innovative analysis of stable isotopes and plasma lipid fractions in the blood, without causing further damage to the target species. With this methodology new information regarding trophic ecology and physiological state of an abundant elasmobranch is provided.

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 El tiburón demersal <i>Scyliorhinus canicula</i> como modelo experimental.....	3
1.2 Objetivos del presente estudio.....	4
<b>2. Material y métodos.....</b>	<b>5</b>
2.1 Área de estudio.....	5
2.2 Captura de individuos y toma de muestras.....	5
2.3 Análisis de las variables fisiológicas plasmáticas.....	8
2.4 Análisis de los isótopos estables.....	8
2.5 Análisis estadísticos.....	9
<b>3. Resultados.....</b>	<b>10</b>
3.1 Diferencias estacionales, sexuales y de estado de madurez en longitud total, peso e índice de condición.....	10
3.2 Diferencias estacionales, sexuales y de estado de madurez en los valores isotópicos.....	11
3.3 Diferencias estacionales, sexuales y de estado de madurez en las fracciones lipídicas del plasma.....	11
3.4 Relaciones entre variables.....	17
<b>4. Discusión.....</b>	<b>18</b>
4.1 Diferencias isotópicas entre estado de madurez y a lo largo del año.....	18
4.2 Diferencias fisiológicas entre sexos, estado de madurez y período del año.....	19
4.3 Conclusiones.....	21
<b>5. Agradecimientos.....</b>	<b>22</b>
<b>6. Bibliografía.....</b>	<b>23</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

A lo largo del año, los depredadores marinos como los elasmobranquios presentan variaciones en los requerimientos nutricionales relacionados con aspectos reproductivos o condicionados por variaciones en la disponibilidad de alimento en el medio marino (Bizzarro et al., 2005). En el caso del alimento, a lo largo del año la disponibilidad, abundancia y calidad del mismo puede variar (Smale & Compagno, 1997; Bizzarro et al., 2007). Además, estos cambios en los requerimientos nutricionales y de tipo de alimento consumido pueden ser diferentes en relación al estado de madurez sexual y al sexo. (Dale et al., 2011; Marion et al., 2011; Jacobsen & Bennett, 2012; López-García et al., 2012). Por ejemplo, el tipo de recurso explotado, puede variar a lo largo de la vida del animal, ya sea porque los requerimientos nutricionales varían entre los distintos estados de madurez o por cuestiones relacionadas con diferencias morfológicas. Los individuos maduros presentan una serie de requerimientos nutricionales distintos a los de los individuos inmaduros directamente como consecuencia de la formación de productos sexuales o de mayores costes de defender un territorio o luchas de individuos (Carrier et al., 2010). Además, también pueden existir diferencias en estructuras relacionadas con la captura de presas entre individuos maduros e inmaduros que condicionaría el tipo de alimento consumido (Platell et al., 1998; Skjæraasen & Bergstad, 2000). De manera similar, tanto la dieta como los requerimientos nutricionales pueden ser diferentes entre sexos, principalmente relacionados con la reproducción o, en el caso de especies que presentan dimorfismo sexual (Wearmouth & Sims, 2008), relacionados con aspectos morfológicos.

Cómo el sexo, el estado de madurez o la estación del año pueden llegar a influir en la condición fisiológica o el tipo de dieta ha sido muy poco estudiada en elasmobranquios (García-Garrido et al., 1990). El estado fisiológico en tiburones puede ser estudiado mediante la determinación de determinados metabolitos sanguíneos (García-Garrido et al., 1990; Capapé, 2008). La fuente endógena principal de energía la obtienen los elasmobranquios a partir de las grandes reservas lipídicas que almacenan en el hígado (Baldrige, 1971), a diferencia de la mayoría de vertebrados que lo hacen en el tejido adiposo. Además de ser fuente de energía, estos lípidos hepáticos también contribuyen a regular la flotabilidad (Rossou, 1987; Holmgren & Nilsson., 1999). Por lo tanto, determinar en el plasma diferentes metabolitos lipídicos como, por ejemplo, el colesterol, los triglicéridos o los fosfolípidos pueden ser útiles indicadores del uso de

reservas lipídicas y de la condición del animal (García-Garrido et al., 1990; Capapé, 2008).

El metabolismo lipídico en elasmobranquios es muy distinto del de los peces teleósteos y otros vertebrados (Ballantyne, 1997), por dos razones principales: la primera es que usan los fosfolípidos como material para mantener la flotabilidad (Bone & Roberts, 1969; Baldrige, 1972), y la segunda es que los niveles de albúmina que presentan son muy bajos (Fellows et al., 1980; Fellows & Hird, 1981; Ballantyne, 1997), no pudiendo transportar ácidos grasos libres y, por lo tanto, la movilización rápida de las reservas lipídicas hepáticas hacia otros tejidos se lleva a cabo con cuerpos cetónicos (acetoacetato y, principalmente, 3-Hidroxibutirato). De manera normal, los peces elasmobranquios presentan niveles muy bajos de triglicéridos o colesterol en sangre (Crabtree & Newsholme, 1972). Ahora bien, valores altos de estas fracciones lipídicas pueden indicar que el animal se encuentra bien alimentado (transporte del intestino al hígado) o que hay movilización de lípidos como consecuencia de variaciones en los requerimientos nutricionales relacionados, por ejemplo, con la reproducción (García-Garrido et al., 1990). En el caso de los cuerpos cetónicos, y especialmente el 3-Hidroxibutirato, se relacionarían con la actividad física por la movilización rápida de energía del hígado hacia el corazón y músculo (revisiones de Ballantyne, 1997, y de Speers-Roesch & Treberg, 2006b) o bien con el uso de alimento de alto contenido en proteínas o movilización de reservas proteicas durante períodos de inanición (Beis et al., 1980).

De manera similar al estado fisiológico, es posible obtener información de los hábitos tróficos de los elasmobranquios mediante el análisis de isótopos estables de nitrógeno (denominado  $\delta^{15}\text{N}$ ) y carbono (denominado  $\delta^{13}\text{C}$ ) (Shiffman et al., 2012). Esta metodología se basa en el hecho de que los valores isotópicos se transforman de manera predecible desde el alimento hasta los consumidores integrando el alimento consumido durante el periodo de formación del tejido analizado (desde horas-días en el caso del plasma hasta meses-años en el caso de la musculatura (Caut et al., 2013). Los valores isotópicos del nitrógeno informan del nivel trófico del consumidor, ya que muestran un aumento a través de los niveles tróficos (Layman et al., 2011). En cambio, los valores isotópicos del carbono muestran cambios muy pequeños en relación con las transferencias tróficas, pero son un indicador útil del hábitat donde vive el consumidor ya que informan de la fuente primaria de carbono (Layman et al., 2011).

## 1. 1. El tiburón demersal *Scyliorhinus canicula* como modelo experimental

El tiburón demersal comúnmente llamado tiburón gato o pintarroja, *Scyliorhinus canicula*, es una especie de elasmobranquio de mediano tamaño (49-53 cm las tallas de primera madurez para machos y hembras, respectivamente; Ivory et al., 2004).

Desde un punto de vista experimental, su gran resistencia a la manipulación y la facilidad en la captura, mantenimiento y cría en acuarios es y ha sido usada como modelo experimental para testar distintos estudios de comportamiento, ecología, biología y fisiología.

Es una especie presente de manera común entre los 80 y 500 metros de profundidad distribuyéndose en todo el mar Mediterráneo y en zonas concretas del océano Atlántico, como la zona noroeste y desde Marruecos hasta el Golfo de Guinea (Blache et al., 1970; Capapé et al., 2000). Los individuos maduros y los juveniles suelen encontrarse o bien segregados en distintos estratos batimétricos o bien compartiendo los mismos hábitats en el Mediterráneo (D'Onghia et al., 1995, Massoutí & Moranta, 2003).

Similar a muchos elasmobranquios, *S. canicula* es una especie ovípara, depositando los huevos envueltos en una funda protectora, que queda anclada en macroalgas y otras estructuras sólidas (Wheeler, 1978; Ellis, 1997). En cuanto al ciclo reproductor, en hembras maduras se observaron huevos en los oviductos en prácticamente todos los meses del año exceptuando Agosto y Septiembre, siendo el máximo de puesta durante los meses de verano (Capapé 1997; Ellis, 1997; Capapé et al., 2008), presentando una cópula muy llamativa en la que el macho abraza con la cola a la hembra mientras nadan juntos (García, 2012). La condición física parece aumentar con el tamaño corporal en ambos sexos. (Capapé, 2008)

En relación a los hábitos tróficos, *S. canicula* es un depredador oportunista de actividad nocturna (Carrassón et al., 1992), que incluye en la dieta una amplia gama de macrofauna bentónica, principalmente pequeños crustáceos (Valls et al., 2011). Otras presas presentes en la dieta son holoturias, poliquetos y especies de peces demersales (Valls et al., 2011). Parece ser que las preferencias alimentarias varían con la edad; los ejemplares más jóvenes prefieren pequeños crustáceos, y los mayores muestran una inclinación por los cáridos y los cangrejos ermitaños (Capapé, 1974; Valls et al., 2011). Los hábitos alimenticios de *S. canicula* sugieren que esta

especie muestra una dieta cada vez más bentónica con el incremento de la talla (Lyle, 1983; Ellis et al, 1996; Orlov, 1998). También es importante señalar que la intensidad alimentaria es mayor en verano, debido en parte a la mayor disponibilidad de presas (Lyle, 1983).

Los estudios fisiológicos que se han realizado en esta especie abarcan aspectos muy variados. Se han estudiado aspectos tan diversos como el crecimiento, desarrollo y reproducción, hábitos alimenticios y morfología; por ejemplo: adaptaciones de la vista y la respiración, efectos de la hipoxia, respuestas al estrés, estudio de los parámetros sanguíneos, desarrollo de la dentición y del esqueleto dérmico en embriones, propiedades eléctricas de las fibras musculares blancas y rojas, respuestas endocrinas, desarrollo cardíaco o la estructura branquial entre muchos otros.

## **1.2. Objetivos del presente estudio**

Debido al gran desconocimiento que existe, en general, sobre la fisiología y los hábitos alimenticios de los elasmobranquios en estado salvaje, y de *Scyliorhinus canicula* en particular, el objetivo del presente estudio es examinar el efecto de la estación, el sexo y el estado de madurez de este depredador marino sobre el estado fisiológico (bioquímica plasmática) y hábitos tróficos (isotopos estables).

Para ello, se analizaron las fracciones lipídicas del plasma (colesterol total, triglicéridos, fosfolípidos) y un cuerpo cetónico (el 3-Hidroxiacetato) y los valores isotópicos de  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$  en sangre de individuos de *Scyliorhinus canicula* capturados y liberados vivos en el Mediterráneo Occidental en dos momentos del año (invierno y primavera).



## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Área de estudio

Los animales del estudio se capturaron en el noroeste del Mar Mediterráneo, en la zona del Mar Catalán (zona occidental del Mar Balear), concretamente en la plataforma del Delta del Ebro (Figura 1). El Mar Catalán es un área altamente productiva, debido a la combinación de los aportes de materia orgánica en la desembocadura del río Ebro en la zona más amplia de la plataforma continental, y también al efecto de la corriente Liguro-Provezal-Catalana a lo largo de la pendiente del talud continental (Stefanescu et al., 1992). El mar catalán se asemeja a un valle profundo y abierto hacia el noreste, con una profundidad cada vez mayor desde los 800 m en el umbral de Ibiza (80 km) hasta los 2600 m entre Menorca y Cabo San Sebastià (Salat, 1996).

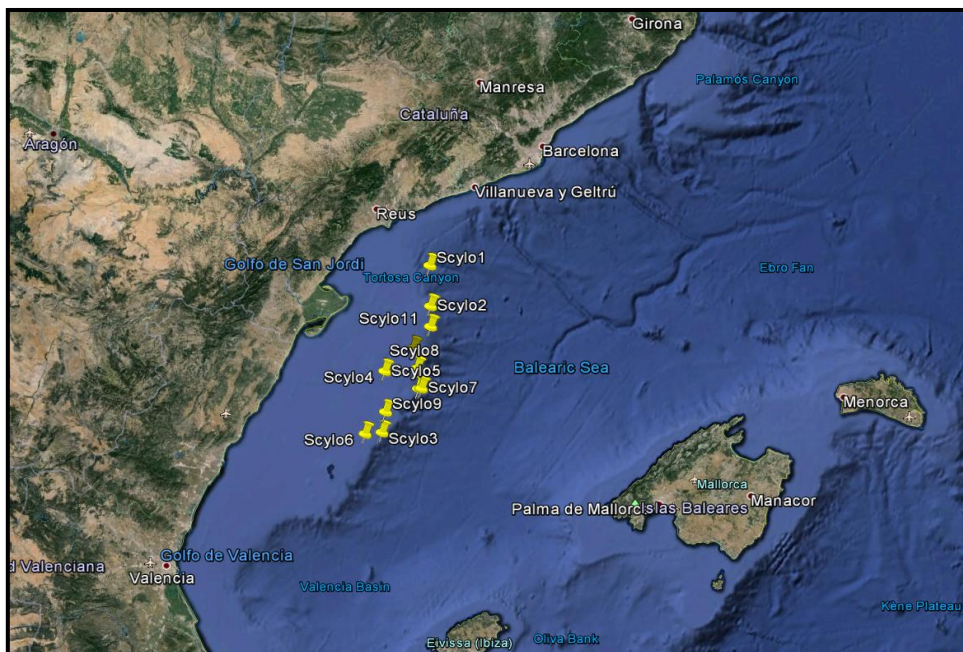


Figura 1. Zona de estudio y posiciones dónde se pescaron los diferentes individuos

### 2.2. Captura de individuos y toma de muestras

Durante el invierno (en el mes de Febrero) y el verano (en Julio) de 2013 se capturaron un total de 129 individuos (67 en invierno y 62 en verano; Tabla 1) de *Scyliorhinus canicula* en la zona de estudio (Figura 1). Los individuos fueron

capturados en dos campañas oceanográficas de pesca experimental mediante pesca de arrastre entre 200-400 metros de profundidad (Campaña ECOTRANS 2013; Instituto de Ciencias del Mar ICM-CSIC). Para reducir el efecto de los ritmos circadianos sobre los resultados fisiológicos, todos los individuos utilizados en el presente estudio se capturaron entre las 10:00 y las 12:00 de la mañana. Una vez capturados, se mantuvieron en cubetas con agua de mar en flujo continuo hasta la toma de muestras y medidas corporales (como máximo 1 hora después de la captura; Figuras 2 y 3). De cada individuo se midió la longitud máxima con ictiómetro ( $\pm 0.1$  cm), el peso en balanza electrónica ( $\pm 0.1$  g) y el sexo de manera visual (órganos reproductores externos). El estado de madurez se anotó en función de la talla de la talla de primera madurez estimada para la especie en la zona de estudio. Cuando la longitud total era superior a 35 cm se consideraron maduros, y cuando era inferior a 30 cm se consideraron inmaduros (de acuerdo con datos aún no publicados del Proyecto ECOTRANS) y también mediante el nivel de dureza del pterigopodio (órgano copulador masculino).



**Figura 2.** Tanque 1 de *S. canicula*



**Figura 3.** Tanque 2 de *S. canicula*

Para determinar los valores fisiológicos y los valores isotópicos, a cada individuo de le extrajo entre 0.3-0.5 ml de sangre en la región caudal mediante el uso de jeringas de insulina de 1 ml (Figura 4). Esta sangre se guardó en viales heparinizados para evitar la coagulación de la sangre. Una vez se finalizó la toma de medidas, cada individuo se volvió a almacenar en el tanque de agua durante 20 minutos y se liberaron en la zona de captura. Todos los individuos fueron liberados vivos y aparentemente en buen estado.

Inmediatamente después de la extracción, la sangre se centrifugó durante 10 minutos a 5500 rpm en una centrífuga convencional con la finalidad de separar las células sanguíneas para analizar su contenido isotópico, y el plasma para determinar los parámetros fisiológicos. Ambas fracciones fueron congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.



**Figura 4.** Extracción de sangre en un ejemplar hembra de *Scyliorhinus canicula*

### **2.3 Análisis de las variables fisiológicas plasmáticas**

Del plasma se determinaron 4 parámetros bioquímicos: triglicéridos, colesterol, fosfolípidos y 3-Hidroxiacetato mediante un espectrofotómetro (TECAN Infinite 200). Para ello se utilizaron kits comerciales (Colesterol, Fosfolípidos y Triglicéridos, SPINREACT S.A Spain; 3-D-Hidroxiacetato, Randox England) modificados para el análisis de estos parámetros en microplacas y a los niveles esperados en tiburones. Los análisis bioquímicos se realizaron en el laboratorio del Departamento de Fisiología Animal de la Universitat de Barcelona (UB).

### **2.4 Análisis de los isótopos estables**

Para determinar el contenido isotópico, la parte celular de la sangre se deshidrató en un horno a 60°C, y se pulverizó utilizando un molinillo de impacto.

De cada muestra se pesaron entre 0.28 - 0.33 miligramos en cápsulas de estaño para determinar los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$ . Los análisis isotópicos se llevaron a cabo en la Estación Biológica de Doñana ([www.ebd.csic.es/lie/index.html](http://www.ebd.csic.es/lie/index.html)), donde se quemaron las muestras a 1020°C usando un sistema de espectrometría de masas con flujo continuo de isótopos (Thermo Electron) por medio de un analizador elemental Flash HT Plus conectado con un espectrómetro de masas Delta V que aplica estándares internacionales cada 9 muestras; LIE-CV y LIE-PA, previamente normalizado con los

estándares internacionales IAEA-CH- 3, IAEA-CH-6, IAEA-N-1 y IAEA-N-2. La relación de los isotopos estables  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$  se ha expresado en la notación estándar (‰). El error de medición (desviación estándar) del laboratorio fue de  $\pm 0.2$  para  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\pm 0.1$  para  $\delta^{13}\text{C}$ .

## 2.5. Análisis estadísticos

Como medida corporal de condición física, se calculó el índice de condición corporal de Fulton a partir de las medidas de longitud total y peso;

$$\text{Índice corporal} = \text{peso} \times 100 / \text{longitud total}^3 \text{ (Bolger y Connolly, 1989).}$$

Para comparar las diferencias en la longitud total del cuerpo, el peso, el índice de condición, los parámetros fisiológicos (colesterol, triglicéridos, fosfolípidos y 3-Hidroxibutirato) y los valores isotópicos entre sexos (macho/hembra), estaciones (invierno/verano) y estado de madurez (inmaduro/maduro), se utilizaron pruebas ANOVA de más de un factor independiente. Los parámetros fisiológicos se normalizaron mediante una transformación logarítmica. Finalmente, las posibles relaciones entre los parámetros bioquímicos, los valores isotópicos y el índice de condición de Fulton, se testaron mediante correlaciones de Pearson. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS-18, y se adoptó el valor de  $p$  de  $<0,05$  como nivel de significación.

### 3. RESULTADOS

De los 129 individuos capturados, 67 (32 machos y 35 hembras) se capturaron en invierno, y 62 individuos (32 machos y 30 hembras) en verano (Tabla 1). De todos ellos se determinó el contenido isotópico en sangre, y de 54 en invierno y 58 en verano se analizaron las fracciones lipídicas del plasma. El menor número de individuos en los que se determinaron estos parámetros fisiológicos se debió a que no se obtuvo suficiente cantidad de plasma de los mismos.

**Tabla 1.** *S. canicula* capturados en invierno y verano en función del sexo y del estado de madurez.

<b>INVIERNO</b>	<b>n</b>	<b>VERANO</b>	<b>n</b>
<b>Machos</b>		<b>Machos</b>	
Inmaduros	17	Inmaduros	17
Maduros	15	Maduros	15
<b>Hembras</b>		<b>Hembras</b>	
Inmaduras	15	Inmaduras	15
Maduras	20	Maduras	15
Total	67	Total	62

#### 3.1. Diferencias estacionales, sexuales y de estado de madurez en longitud total, peso e índice de condición

El peso total no difirió significativamente ni entre estaciones ni entre sexos (Figura 5A, Tablas 2 y 3), pero sí entre estado de madurez, presentando un mayor peso los individuos maduros que los inmaduros (Figura 5A, Tablas 2 y 3). En cuanto a la talla total, encontramos diferencias significativas entre estaciones, entre sexos y entre estado de madurez (Figura 5B, Tablas 2 y 3). Entre sexos, los machos mostraron una talla significativamente mayor que las hembras (Figura 5B, Tablas 2 y 3). Entre estados de madurez, tanto para machos como para hembras, los individuos maduros presentaron una mayor longitud total que los individuos inmaduros (Figura 5B, Tablas 2 y 3). Entre estaciones, en general, los individuos capturados en invierno presentaron una longitud total mayor (Figura 5B, Tablas 2 y 3). En relación al índice de condición corporal, encontramos que durante el período de verano el índice de condición presentó valores significativamente más elevados que en invierno (Figura 5C, Tablas 2 y 3) y los individuos maduros, tanto machos como hembras, presentaron índices de condición más elevados que los individuos inmaduros durante el período de invierno

(Figura 5C, Tablas 2 y 3). Durante el verano, por el contrario, machos y hembras (maduros e inmaduros) presentaron valores similares en el índice de condición (Figura 5C, Tablas 2 y 3).

### **3.2. Diferencias estacionales, sexuales y de estado de madurez en los valores isotópicos**

Tanto los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  como de  $\delta^{13}\text{C}$  mostraron diferencias entre estaciones y estado de madurez (Figura 6A y 6B, Tablas 2 y 3). En particular, durante la estación de invierno los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$  fueron significativamente más elevados que durante la estación de verano (Figura 6A y 6B; Tablas 2 y 3). En relación al estado de madurez, los individuos inmaduros presentaron valores de  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$  significativamente menores que los individuos maduros, independientemente del sexo y de la estación del año (Figura 6A y 6B, Tablas 2 y 3). En el caso del sexo, únicamente encontramos que los machos, independientemente del estado de madurez y de la estación del año, mostraron valores más elevados de  $\delta^{15}\text{N}$  que las hembras (Figura 6A y 6B, Tablas 2 y 3).

### **3.3. Diferencias estacionales, sexuales y de estado de madurez en las fracciones lipídicas del plasma**

En el caso del colesterol total en plasma no encontramos diferencias significativas ni entre sexos ni entre estados de madurez, aunque sí entre estaciones y en la interacción sexo y madurez (Figura 6C, Tablas 2 y 3). En concreto, durante la estación de verano los valores de colesterol fueron mayores que en invierno (Figura 6C, Tablas 2 y 3). En relación a la interacción estación y madurez, se observó que durante la estación de invierno las hembras maduras presentaron valores significativamente más bajos de colesterol que las hembras inmaduras (Figura 6C, Tabla 2). Estas diferencias estacionales también se apreciaron en el caso de los triglicéridos y los fosfolípidos, mostrando valores más elevados de estos 2 parámetros fisiológicos durante la estación de verano (Figura 6D y 6E, Tablas 2 y 3), especialmente en los ejemplares inmaduros, como muestra el hecho de que la interacción madurez y estación fue significativa (Figura 6D y 6E, Tablas 2 y 3).

En el caso del 3-Hidroxitirato, el patrón observado fue muy distinto a los tres parámetros fisiológicos anteriores. Los machos maduros presentan valores claramente más elevados que los machos inmaduros y las hembras en 3-Hidroxitirato durante la

estación de invierno, y tanto machos maduros como inmaduros presentan mayores valores de este parámetro en relación a las hembras durante invierno. Durante el verano no encontramos diferencias ni entre sexos ni entre estado de madurez (Figura 6F, Tablas 2 y 3).

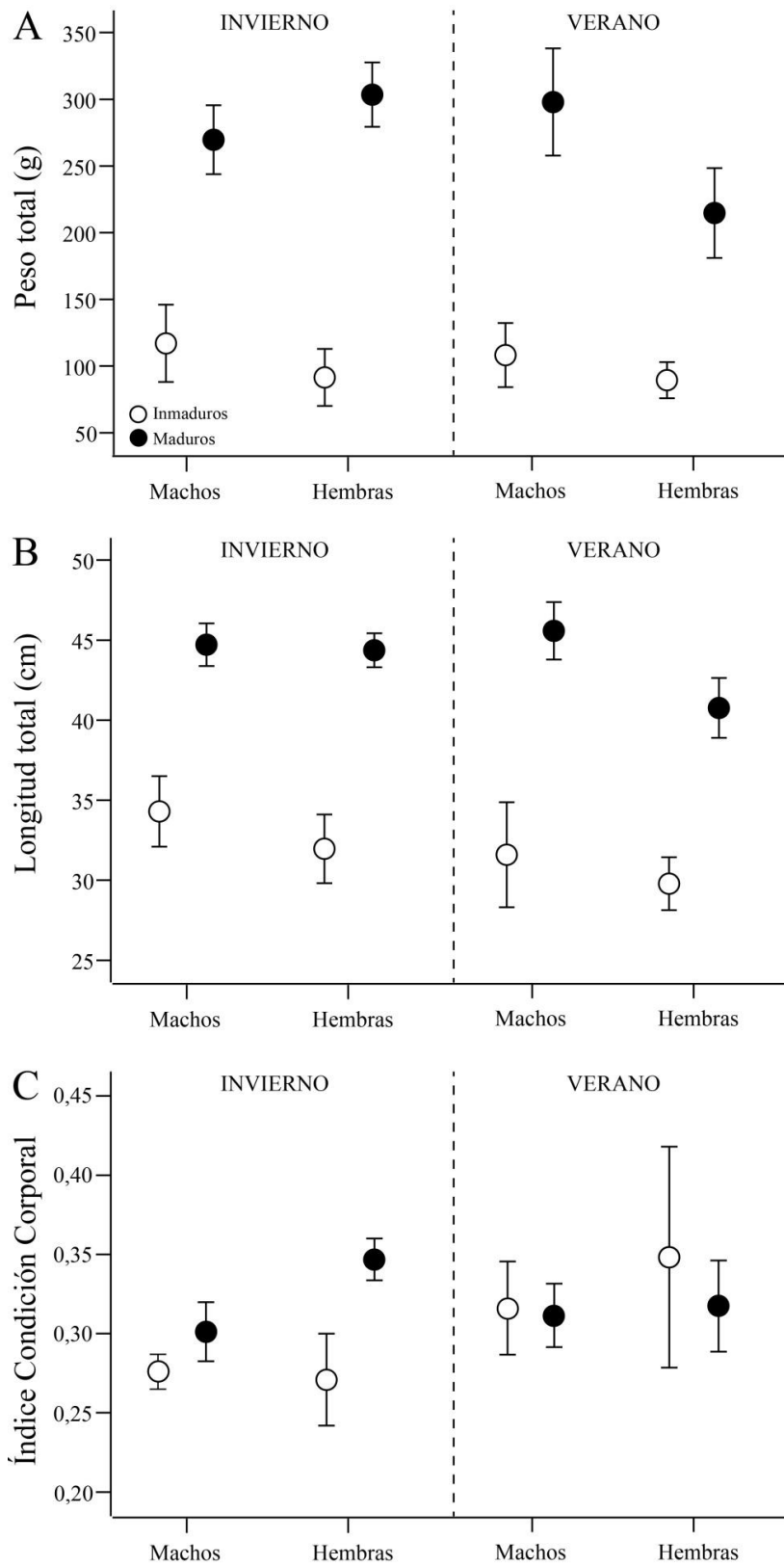


**Tabla 2.** Valores medios y desviación estándar del peso, longitud, índice de condición corporal, valores isotópicos y parámetros fisiológicos de *Scyliorhinus canicula* capturados en la zona norte de la plataforma continental del Delta del Ebro (Mediterráneo noroccidental) en función del sexo y del estado de madurez para las estaciones de invierno y verano.

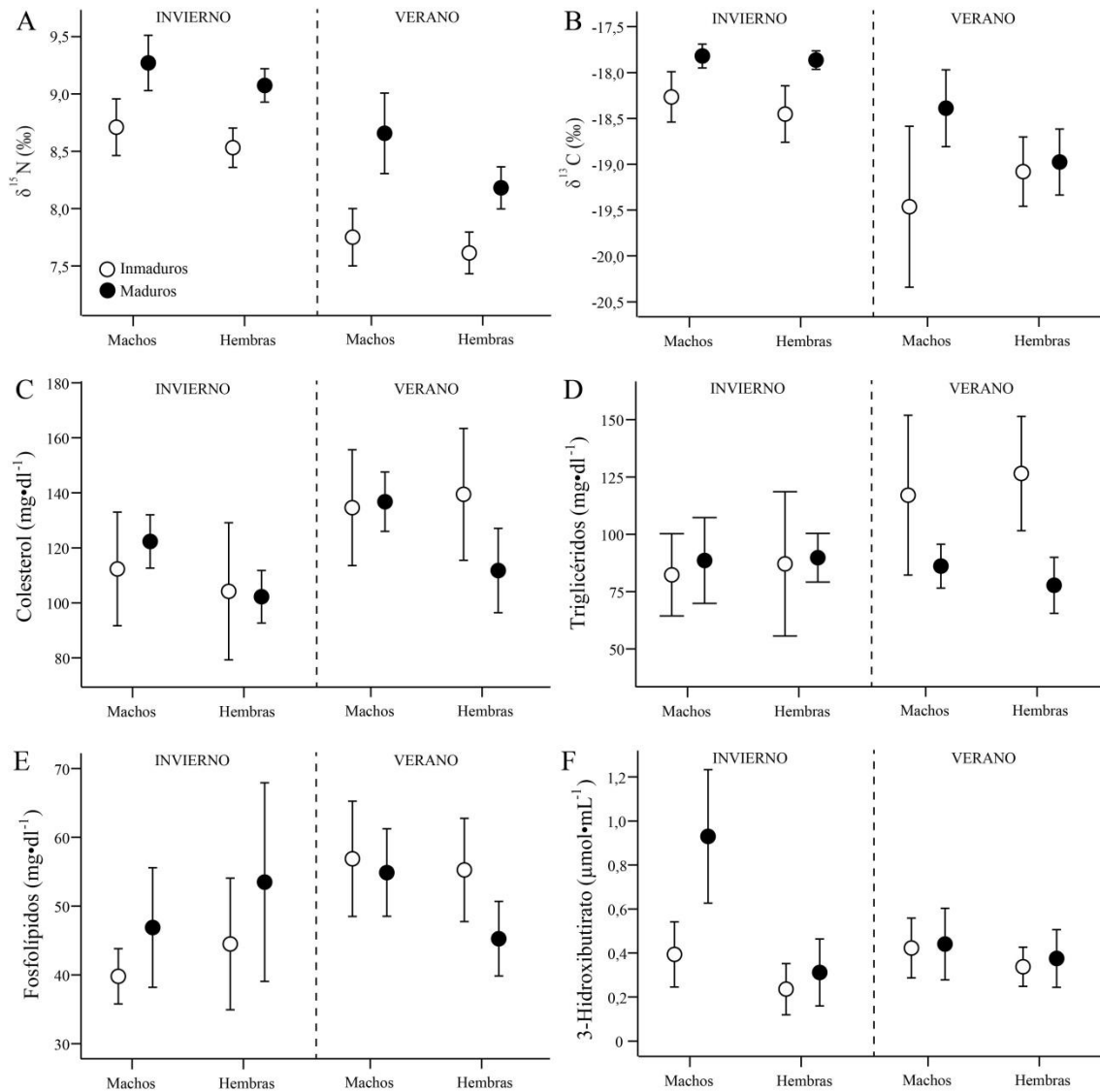
	INVIERNO				VERANO			
	MACHOS		HEMBRAS		MACHOS		HEMBRAS	
	Inmaduros	Maduros	Inmaduras	Maduras	Inmaduros	Maduros	Inmaduras	Maduras
<b>Peso total (g)</b>	117±56,34	269,7±46,56	91,4±38,55	303,45±51,56	109±46,81	298,73±72,64	90,2±24,51	215,6±60,81
<b>Longitud total (cm)</b>	34,3±4,29	44,71±2,42	31,96±3,87	44,36±2,27	31,54±6,38	45,53±3,24	29,73±2,98	40,71±3,38
<b>Índice de Condición</b>	0,27±0,02	0,30±0,03	0,27±0,05	0,35±0,03	0,315±0,06	0,31±0,04	0,35±0,13	0,32±0,05
<b>δ<sup>13</sup>C (‰)</b>	-18,26±0,54	-17,82±0,24	-18,45±0,55	-17,86±0,21	-19,47±1,71	-18,40±0,76	-19,09±0,68	-18,99±0,65
<b>δ<sup>15</sup>N (‰)</b>	8,71±0,48	9,27±0,44	8,53±0,31	9,07±0,31	7,74±0,49	8,65±0,63	8,65±0,63	8,17±0,33
<b>Colesterol (mg·dl<sup>-1</sup>)</b>	112,33±37,31	122,35±16,79	104,21±41,29	102,23±16,58	133,93±34,88	136,09±18,70	138,77±35,66	111,07±26,54
<b>Triglicéridos (mg·dl<sup>-1</sup>)</b>	82,31±32,39	88,57±32,36	87,09±52,07	89,77±19,17	116,96±57,71	86,03±16,55	126,42±37,09	77,65±21,13
<b>Fosfolípidos (mg·dl<sup>-1</sup>)</b>	39,78±7,25	46,88±15,04	44,49±15,83	53,50±25,03	56,85±13,87	54,84±11,02	55,23±11,16	45,23±9,39
<b>3-Hidroxibutirato (μmol·mL<sup>-1</sup>)</b>	0,39±0,27	0,93±0,53	0,24±0,19	0,31±0,26	0,42±0,22	0,44±0,28	0,34±0,12	0,37±0,21

**Tabla 3.** Resultados de los modelos estadísticos ANOVA comparando el efecto de la estación (invierno, verano) madurez (inmaduro, maduro) y del sexo (macho, hembra) en el peso, longitud total, valores isotópicos y parámetros fisiológicos de *Scyliorhinus canicula* capturados en la zona norte de la plataforma continental del Delta del Ebro (Mediterráneo noroccidental). Únicamente se indican las interacciones que resultaron significativas entre factores independientes (estaciónxsexo; estaciónxmadurez; sexoxmadurez; sexoxmadurez; estaciónxsexoxmadurez).

Parámetro	Factor	F [gl]	p
<b>Peso (g)</b>	Estación	2,39 [1 x127]	0,13
	Sexo	3,43 [1 x127]	0,07
	Madurez	228,64 [1 x127]	<b>&lt;0,001</b>
<b>Longitud total (cm)</b>	Estación	8,02 [1 x127]	<b>0,005</b>
	Sexo	7,23 [1 x127]	<b>0,008</b>
	Madurez	232,90 [1 x127]	<b>&lt;0,001</b>
<b><math>\delta^{15}\text{N}</math> (‰)</b>	Estación	127,87 [1 x127]	<b>&lt;0,001</b>
	Sexo	10,70 [1 x127]	<b>0,001</b>
	Madurez	72,94 [1 x127]	<b>&lt;0,001</b>
<b><math>\delta^{13}\text{C}</math> (‰)</b>	Estación	39,38 [1 x127]	<b>&lt;0,001</b>
	Sexo	0,59 [1 x127]	0,44
	Madurez	15,23 [1 x127]	<b>&lt;0,001</b>
<b>Índice de Condición</b>	Estación	5,86 [1 x127]	<b>0,02</b>
	Sexo	3,59 [1 x127]	0,06
	Madurez	2,49 [1 x127]	0,12
	Estación x madurez	10,95 [1 x127]	<b>0,001</b>
<b>Colesterol (mg·dl<sup>-1</sup>)</b>	Estación	5,70 [1 x106]	<b>0,02</b>
	Sexo	1,35 [1 x106]	0,23
	Madurez	2,12 [1 x106]	0,15
	Sexo x madurez	0,19 [1 x106]	<b>0,02</b>
<b>Triglicéridos (mg·dl<sup>-1</sup>)</b>	Estación	4,82 [1 x107]	<b>0,03</b>
	Sexo	0,03 [1 x107]	0,87
	Madurez	2,42 [1 x107]	0,13
	Estación x madurez	11,18 [1 x107]	<b>0,001</b>
<b>Fosfolípidos (mg·dl<sup>-1</sup>)</b>	Estación	9,83 [1 x106]	<b>0,002</b>
	Sexo	0,05 [1 x106]	0,82
	Madurez	0,06 [1 x106]	0,81
	Estación x madurez	5,73 [1 x106]	<b>0,02</b>
<b>3-Hidroxiacetato (<math>\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}</math>)</b>	Estación	1,67 [1 x102]	0,20
	Sexo	16,12 [1 x102]	<b>&lt;0,001</b>
	Madurez	8,35 [1 x102]	<b>0,005</b>
	Estación x madurez	5,8 [1 x102]	<b>0,02</b>
	Estación x sexo	7,34 [1 x102]	<b>0,01</b>



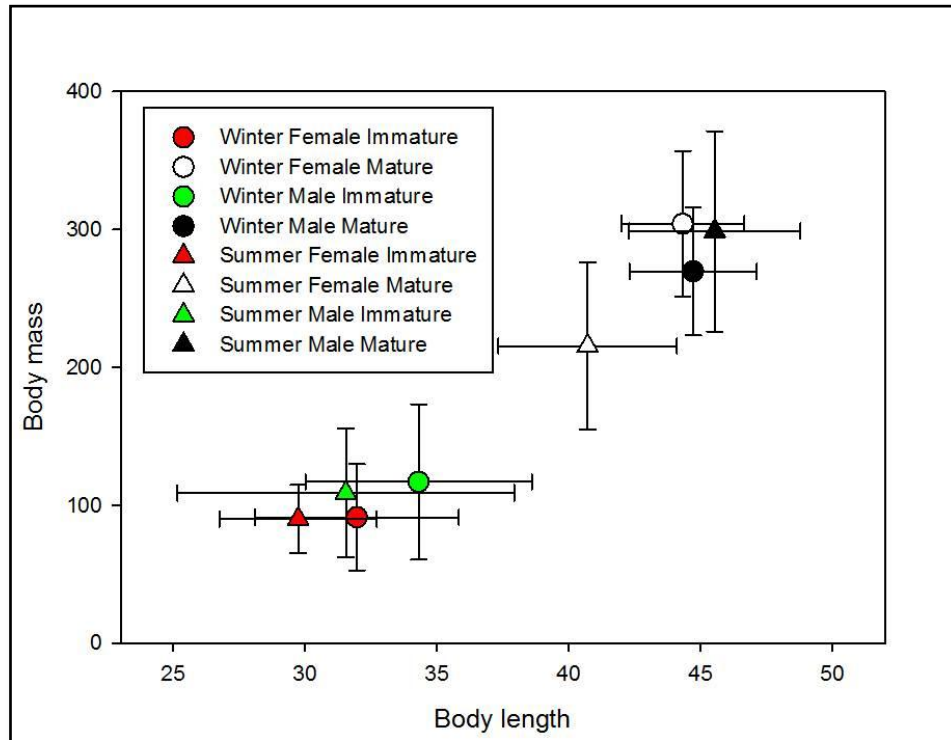
**Figura 5.** Media e intervalo de confianza al 95% del (A) peso, (B) longitud máxima e (C) índice de condición corporal de *Scyliorhinus canicula* en función de la estación del año, el sexo y el estado de madurez.



**Figura 6.** Media e intervalo de confianza al 95% de (A)  $\delta^{15}\text{N}$  ‰, (B)  $\delta^{13}\text{C}$  ‰, (C) colesterol, (D) triglicéridos, (E) fosfolípidos y (F) 3-Hidroxiacetato de *Scyliorhinus canicula* en función de la estación del año, el sexo y el estado de madurez.

### 3.4. Relaciones entre variables

El peso corporal presentó una fuerte correlación con la longitud total.



**Figura 7.** Correlación peso y talla de los ejemplares de *S.canicula*

Los análisis de correlación indicaron que fosfolípidos, triglicéridos y colesterol se correlacionaron positivamente ( $p < 0,0001$ ; Figura 7).

Aunque con un valor de correlación menor, los valores de 3-Hidroxiacetato se correlacionaron positivamente con los valores isotópicos de nitrógeno de manera significativa, pero no con ninguno de los parámetros fisiológicos restantes. En cuanto al índice de Fulton, aunque la correlación fue baja, presentó una correlación significativa con los valores de triglicéridos en sangre.

#### 4. DISCUSIÓN

En primer lugar cabe mencionar que las diferencias observadas en longitud y peso entre *S. canicula* maduros e inmaduros son esperables ya que la selección de los individuos en estos grupos se realizó a partir de los valores de unas tallas concretas pre-establecidas. No es de extrañar que si los ejemplares inmaduros de *S. canicula* eran los que presentaban valores más pequeños en longitud, el peso fuese inferior en comparación con el de los ejemplares maduros. También hay que mencionar las diferencias entre estaciones de la talla en el mismo estado de madurez, ya que teniendo en cuenta que la mayoría de los nacimientos ocurren en verano, los individuos inmaduros representantes de esta estación serían más jóvenes que los individuos inmaduros de invierno. El hecho de que los machos maduros presenten tallas significativamente mayores que las hembras podría estar relacionado con diferencias endocrinas y de desarrollo, o también podría implicar diferencias en la alimentación.

##### 4.1. Diferencias isotópicas entre estado de madurez y a lo largo del año

Durante la estación de invierno los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$  en *S. canicula* fueron significativamente más elevados que durante la estación de verano. Esta diferencia entre los valores entre estaciones podría estar relacionada con una variación en la dieta de *S. canicula*, ya que la disponibilidad de presas en verano es mayor (Lyle, 1983) y por lo tanto podrían estar alimentándose de presas diferentes.

En relación al estado de madurez, los individuos inmaduros presentaron valores de  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$  menores que los individuos maduros, independientemente del sexo y de la estación del año, lo cual es lógico desde el punto de vista morfológico ya que como se observa en los resultados obtenidos, los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  mantienen una correlación con la talla, es decir, los individuos más grandes presentan valores más altos. La presencia de diferencias en la dieta relacionadas con el estado de madurez es un patrón común observado en tiburones como consecuencia de las diferentes habilidades predatorias entre individuos maduros e inmaduros, debido a diferencias en el tamaño del cuerpo y también de la estructura de la boca (Platell et al., 1998; Skjæraasen & Bergstad, 2000). Esto bien se puede deber a que los ejemplares maduros se alimentan de presas con valores tróficos más elevados o también a que las presas sean de mayor tamaño (en ambos casos presentarían valores de  $\delta^{15}\text{N}$  mayores), correspondiente al tamaño de la boca del depredador (Platell et al., 1998; Skjæraasen & Bergstad, 2000).

En cuanto al sexo, encontramos que los machos presentaron valores más elevados que las hembras en los valores de  $\delta^{15}\text{N}$ . Esta diferencia puede deberse a varios factores; aunque presenten una dieta similar, tal vez los machos coman una proporción distinta dentro de la variedad de presas; o tal vez los requerimientos nutricionales para los dos sexos sean distintos en determinadas épocas del año y adapten su dieta a esas necesidades (Gravino et al., 2010; Šantić et al., 2012 ).

#### **4.2. Diferencias fisiológicas entre sexos, estado de madurez y período del año**

Los parámetros bioquímicos analizados los podemos interpretar en dos subgrupos: colesterol, triglicéridos y fosfolípidos, los tres correlacionados entre sí, por un lado, y 3-Hidroxi-butirato por el otro; ya que los tres primeros indican acerca de la reserva de lípidos de los individuos, y el cuarto se relaciona con el catabolismo de los lípidos del hígado y su movilización como cuerpos cetónicos a tejidos extrahepáticos.

En relación a los parámetros relacionados con las reservas lipídicas encontramos diferencias entre invierno y verano, entre machos y hembras y entre maduros e inmaduros. Entre estaciones, los ejemplares inmaduros presentan un comportamiento similar; ambos sexos aumentan significativamente los valores en la estación verano en comparación con la de invierno, lo que podría indicar un cambio en la dieta con respecto a la ingerida en invierno. En concreto relacionado con requerimientos nutricionales más elevados para su crecimiento, o sencillamente que el número de presas disponibles es mayor en la estación de verano y, por lo tanto, ingieren más cantidad que en invierno (Morato et al., 2003; Rinewalt et al., 2007; Abrantes & Barnett, 2011). Varios autores plantean que las variaciones estacionales presentes en la dieta de los elasmobranchios reflejan el carácter migratorio o la segregación espacial las presas (Morato et al., 2003; Rinewalt et al., 2007; Abrantes & Barnett, 2011), lo cual podría explicar el aumento del índice de condición en verano.

En el caso de los ejemplares maduros, las hembras son las que presentaron los niveles de metabolitos relacionados con las reservas lipídicas más elevados en invierno, mientras que en verano son las que los presentan más bajos. Por lo tanto, en los tres casos (colesterol, triglicéridos y fosfolípidos) parece que las hembras maduras presentan valores bajos de indicadores de reservas de lípidos. Esta diferencia entre hembras maduras e inmaduras podría deberse tanto al tamaño, la edad, como a los requerimientos relacionados con la reproducción: gametogénesis, vitelogénesis y

producción de huevos (García-Garrido et al., 1990). Además, se ha observado que los ejemplares de tiburón hembra con huevos en su interior no se alimentan tanto, sobreviviendo de las reservas de grasa presentes en el hígado (Springer, 1967); este hecho podría estar relacionado con el decrecimiento presente de los valores de los tres parámetros que indican las reservas de grasa del animal durante la época de verano en las hembras maduras.

Los patrones observados con el colesterol son algo distintos de los otros metabolitos relacionados con las reservas lipídicas, todos los individuos presentan valores más elevados en verano. En el caso de los ejemplares inmaduros probablemente se deba a que están ingiriendo una cantidad de alimento superior a la que ingirieron en verano, y están transportando reservas al hígado. En el caso de los ejemplares maduros, estos valores elevados podrían estar indicando un transporte de reservas a tejidos que las demandan, como por ejemplo las gónadas.

Como en el caso del colesterol, los ejemplares inmaduros mostraron valores de triglicéridos más elevados en verano probablemente relacionado con el tipo de alimentación. En el caso de los individuos maduros, a pesar de que probablemente también se estén alimentando mejor que en invierno, muestran valores más bajos debido a que pueden estar sintetizando una cantidad importante de las reservas en la reproducción.

En general, los valores de fosfolípidos son bajos en los individuos analizados (se observan valores más bajos que en el colesterol y los triglicéridos). En conjunto, parece que todos se alimentan más en verano y muestran mayor actividad, ya que los valores son más elevados que en invierno. Las hembras maduras, como en los casos anteriores, tienen valores más bajos que los machos. Esto (en todos los casos) podría estar relacionado con el gran tamaño de la gónada, provocando que no se alimente (Springer, 1967). También podría indicar que las hembras maduras se encuentran en un estado inmediatamente posterior a la posta, y los valores salen bajos debido a la cantidad de reservas que ha gastado durante el proceso.

Hay que tener en cuenta que el tamaño del hígado en las hembras de *S. canicula*, y por tanto su acumulación de lípidos, es mayor que en el de los machos (García-Garrido et al., 1990), así que pueden depender de esas reservas durante más tiempo que los machos.



En cuanto a los resultados obtenidos de 3-Hidroxibutirato, los valores no variaron semejantes entre estaciones, sexo y estado de madurez. Estos valores bajos podrían indicar que no hay carencia energética, hay suficiente alimento y por lo tanto no es necesaria la movilización de reservas lipídicas. Sólo los machos maduros en invierno presentan unos valores más elevados de este metabolito que el resto, lo que estaría indicando una intensa actividad física. Variaciones estacionales de cuerpos cetónicos en plasma (3-Hidroxibutirato y acetoacetato) se han demostrado en *S. canicula* (Gutierrez et al, 1988). El hecho que los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  presenten una relación con los valores de 3-Hidroxibutirato tiene sentido, ya que este metabolito se relaciona con el uso de reservas proteicas del animal, y  $\delta^{15}\text{N}$  nos informa del nivel trófico (contenido en proteínas) de las presas consumidas.

El índice de condición corporal aparentemente no varió mucho en machos entre estaciones, pero en hembras maduras parece que el valor decrece durante el período de verano, lo que estaría apoyando los otros resultados; si los parámetros fisiológicos decrecen, es lógico pensar que el valor de condición corporal también sea más bajo. Los individuos maduros sin embargo presentan un valor de condición corporal mejor en verano que en invierno, lo que se corrobora con el hecho de que los valores de los parámetros fisiológicos analizados (exceptuando el 3-Hidroxibutirato) son mayores en dicha estación. El índice corporal de Fulton se encuentra relacionado con los valores de triglicéridos, esto puede explicarse porque el índice de Fulton o el Índice de Condición Corporal, se calcula a partir de los valores de talla y peso. Los valores de triglicéridos indican reservas lipídicas, así que cuanto mejor es el índice de condición corporal, más altos deberían ser los valores de triglicéridos.

### 4.3. Conclusiones

En resumen, en este estudio se ha tratado de plasmar y describir cómo varía la fisiología y los hábitos alimenticios con la estación, el sexo y el estado de madurez del depredador marino *Scyliorhinus canicula*. Los resultados obtenidos tanto de bioquímica plasmática como de isótopos estables mostraron como varían la alimentación y las reservas lipídicas en esta especie durante las estaciones de invierno y verano y según su estado de madurez, y cómo se ven afectadas por procesos como la reproducción.

Hasta el día de hoy sigue habiendo mucho desconocimiento entorno a este grupo de animales, y serán necesarios más estudios para poder llegar a comprenderlos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo no habría sido posible sin la ayuda de Joan Navarro y de Claudio Barría, ambos del departamento de Recursos Marinos Renovables del Instituto de Ciències del Mar de Barcelona (ICM-CSIC), que me dedicaron atención personalizada y ayuda en el trabajo de laboratorio, apoyo, orientación académica y consejos y sugerencias para la mejora de este trabajo. También quisiera agradecer la ayuda de Jaume Fernández-Borràs del departamento de Fisiología animal de la UB, por facilitarme los análisis necesarios en el laboratorio, y la ayuda y la orientación prestadas para la realización de este trabajo. También agradezco a Isabel Palomera y a toda la tripulación de las campañas experimentales por facilitar la ayuda con el trabajo con los tiburones. Este trabajo de fin de máster es una contribución dentro del proyecto ECOTRANS (CTM2011-26333, Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno Español). Todo el trabajo experimental se llevó a cabo siguiendo la normativa española y catalana vigente en la actualidad sobre el trabajo con animales salvajes.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abrantes, K.G. and A. Barnett. (2011). Intrapopulation variations in diet and habitat use in a marine apex predator, the broadnose sevengill shark *Notorynchus cepedianus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 442: 133-148.
- Ballantyne, J.S., (1997). Jaws: the inside story. The metabolism of elasmobranch fishes. *Comp. Biochem. Physiol. B* 118: 703–742.
- Beis, A., Zammit, V. A. and Newsholme, E. A. (1980). Activities of 3-Hydroxybutyrate Dehydrogenase, 3-Oxoacid CoA-Transferase and Acetoacetyl-CoA Thiolase in Relation to Ketone-Body Utilisation in Muscles from Vertebrates and Invertebrates. *Eur. J. Biochem.* 104: 209-215
- Bizzarro J.J. (2005). Fishery biology and feeding ecology of rays in Bahía Almejas, Mexico. MSc thesis, California State University, San Francisco; Moss Landing Marine Laboratories, 468 pp.
- Bizzarro J.J., Robinson H.J., Rinewalt C.S. and Ebert D.A.. (2007). Comparative feeding ecology of four sympatric skate species off central California. *Environ. Biol. Fish* 80:197–220.
- Bolger, T., and Connolly, P. L. (1989). The selection of suitable indices for the measurement and analysis of fish condition. *J. Fish Biol.* 34: 171-182.
- Bone, Q., and Roberts, B.L. (1969). The density of elasmobranchs. *J. Mar. Biol. Assoc.* 49: 913–937.
- Capapé, C., Reynaud, C., Vergne, Y., and Quignard, J.P. (2008). Biological observations on the smallspotted catshark *Scyliorhinus canicula* (Chondrichthyes: Scyliorhinidae) off the Languedocian coast (southern France, northern Mediterranean). *Pan-American J. Aquatic Sciences.* 3: 282-289.
- Capapé, C. (1977). Contribution à la biologie des Scyliorhinidae des côtes tunisiennes I. *Scyliorhinus canicula* (Linné, 1758): Répartition géographique et bathymétrie, sexualité, reproduction, fécondité. *Bulletin de l'Office National des Pêches de Tunisie* 1, 83–101.
- Capapé, C. (1978). Contribution à la biologie des Scyliorhinidae des côtes tunisiennes VI. *Scyliorhinus canicula* (Linné, 1758): Etude complémentaire de la fécondité. Relations taille-poids du corps, taille-poids du foie, taille-poids des gonades, poids du corps-poids du foie, poids du corps-poids des gonades, poids du foie-poids des gonades, coefficients de condition. *Rapports hépato et gonosomatique. Bulletin de l'Office National des Pêches de Tunisie* 2, 109–140.
- Capapé, C. and Quignard J.P. (1974). Dimorphisme sexuel et observations biologiques sur *Myliobatis aquila* (L. 1758). Contribution à l'étude systématique du genre *Myliobatis*, Cuvier, 1817. *Ann. Mus. Civ. St. Nat. Genova*, 80: 1-27.
- Capapé, C., Mnasri-Sioudi, N., El Kamel-Moutalibi, O., Boumaïza, M., Amor, M. B., & Reynaud, C. (2014). Production, maturity, reproductive cycle and fecundity of small-spotted catshark, *Scyliorhinus canicula* (Chondrichthyes: Scyliorhinidae) from the northern coast of Tunisia (Central Mediterranean). *J. Ichthyology*, 54: 111-126.

- Carrassón, M., Stefanescu, C. and Cartes, J. (1992). Diets and bathymetric distributions of two bathyal sharks of the Catalan deep sea (western Mediterranean). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 82: 21–30.
- Carrier, Jeffrey C., John A. Musick, and Michael R. Heithaus, (2010). *Sharks and their relatives II: biodiversity, adaptive physiology, and conservation*. CRC Press.
- Caut S, Jowers MJ, Michel L, Lepoint G, Fisk AT. (2013). Diet and tissue-specific incorporation of isotopes in the shark *Scyliorhinus stellaris*, a North Sea mesopredator. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 492: 185-198.
- Crabtree, B., Higgins, S.J., Newsholme, E.A. (1972). The activities of pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxylase and fructose diphosphatase in muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem. J.* 130: 391–396.
- D'Onghia, G., Matarrese, A., Tursi, A. and Sion, L. (1995). Observations on the depth distribution pattern of the small-spotted catshark in the North Aegean Sea. *J. Fish. Biol.* 47: 421–426.
- Dale, J.J., N.J. Wallsgrove, B.N. Popp and K. Holland. (2011). Nursery habitat use and foraging ecology of the brown stingray *Dasyatis lata* determined from stomach contents, bulk and amino acid stable isotopes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 433: 221-236.
- Ebert, D.A. & J.J. Bizarro. (2007). Standardized diet compositions and trophic levels of skates (Chondrichthyes: Rajiformes: Rajoidei). *Environ. Biol. Fish.*, 80: 221-237.
- Ellis, J. R. and Shackley, S. E. (1997). The reproductive biology of *Scyliorhinus canicula* in the Bristol Channel, U.K. *Journal of Fish Biology*, 51: 361–372.
- Fellows, F.C.I., Hird, F.J.R., McLean, R.M., Walker, T.I. (1980). A survey of the non-esterified fatty acids and binding proteins in the plasma of selected animals. *Comp. Biochem. Physiol. B* 67, 593–597.
- Fellows, F.C.I., Hird, F.J.R. (1981). Fatty acid binding proteins in the serum of various animals. *Comp. Biochem. Physiol. B* 68, 83–87.
- Filiz and Taşkavak, (2006). Sexual dimorphism in the head, mouth, and body morphology of the smallspotted catshark, *Scyliorhinus canicula* (Linnaeus, 1758) (Chondrichthyes: Scyliorhinidae) from Turkey. *Acta Adriat*, 47: 37-47
- García Peña, H. (2012). Peces del litoral malageño, Número 15, Málaga. Mayo-Junio de 2012. ISSN: 2174-9868.
- García-Garrido, L., Muñoz-Chapuli, R. and De Andres A. V. (1990). Serum cholesterol and triglyceride levels in *Scyliorhinus canicula* (L.) during sexual maturation. *Journal of Fish Biology*, 36: 499-509.
- Gravino, Francesca, Mark Dimech, and Patrick J. Schembri. (2010). Feeding habits of the small-spotted catshark *Scyliorhinus canicula* (L., 1758) in the central Mediterranean. *Rapport Commission Internationale de la Mer Mediterranee* 39:538.
- Gutiérrez, J., J. Fernandez, and J. Planas. (1988). Seasonal variations of insulin and some metabolites in dogfish plasma, *Scyliorhinus canicula*, L. *General and comparative endocrinology* 70.1: 1-8.

- Hussey, N. E., MacNeil, M. A., and Fisk, A. T. (2010). The requirement for accurate diet-tissue discrimination factors for interpreting stable isotopes in sharks. *Hydrobiologia*, 654: 1-5.
- Jacobsen, I.P. and Bennett. M.P. (2012). Feeding ecology and dietary comparisons among three sympatric *Neotrygon* (*Myliobatoidei: Dasyatidae*) species. *J. Fish. Biol.*, 80: 1580–1594.
- Layman C, Araujo MS, Boucek R, Hammerschlag-Peyer CM, Harrison E, Jud ZR, Matich P, Rosenblatt AE, Vaudo JJ, Yeager LA, Post DM, Bearhop S. (2012). Applying stable isotopes to examine food-web structure: an overview of analytical tools. *Biol Rev* 87:545-562.
- López-García, J., A.F. Navia., P.A. Mejía-Falla., E.A. Rubio. (2012). Feeding habits of *Dasyatis longa* (Elasmobranchii: Myliobatiformes): sexual, temporal and ontogenetic effects. *Journal of Fish Biology* 80, 1563-1579.
- Lyle, J. M. (1983). Food and feeding habits of the lesser spotted dogfish, *Scyliorhinus canicula*, in Isle of Man waters. *J. Fish. Biol.*, 23: 725-737.
- Marion, C., T. Vaske-Junior, O.B.F. Gadig & I.A. Martins. (2011). Feeding habits of the shortnose guitarfish, *Zapteryx brevirostris* (Müller and Henle, 1841) (Elasmobranchii, Rhinobatidae) in southeastern Brazil. *Braz. J. Biol.*, 71: 83-89.
- Morato, T., M. Encarnacion-Solà and G. Menezes. (2003). Diets of thornback ray (*Raja clavata*) and tope shark (*Galeorhinus galeus*) in the bottom longline fishery of the Azores, northeastern Atlantic. *Fish. Bull.*, 101: 590–602.
- Navarro J, López L, Coll M, Barría C, Sáez-Liante R. 2014. Short-and long-term importance of small sharks in the diet of the rare deep-sea shark *Dalatias licha*. *Marine Biology*, 1-11.
- Orlov, A.M. (1998). The diet and feeding habits of some deep-water benthic skates (Rajidae) in the Pacific waters off the Northern Kuril Islands southeastern Kamchatka. *Alaska Fish. Res. Bull.*, 5(1): 1-17.
- Parnell AC, Inger R, Bearhop S, Jackson AL. (2010). Source Partitioning Using Stable Isotopes: Coping with Too Much Variation. *PLoS ONE* 5(3): e9672.
- Platell ME, Potter IC, Clarke RR. (1998). Resource partitioning by 4 species of elasmobranchs (Batoidae: Urolophidae) in coastal waters of temperate Australia. *Mar Biol* 131:719–734.
- Rinewalt, C.S., D.A. Ebert & G. Cailliet. (2007). Food habits of the sandpaper skate, *Bathyraja kincaidii* (Garman, 1908) off central California: seasonal variation in diet linked to oceanographic conditions. *Environ. Biol. Fish.*, 80: 147-163.
- Salat J. (1996). Review of hydrographic environmental factors that may influence anchovy habitats in northwestern Mediterranean. *Scientia marina*, 60: 21-32.
- Šantić, Mate, Biljana Rađa, and Armin Pallaoro. (2012). Feeding habits of small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula* Linnaeus, 1758) from the eastern central Adriatic Sea. *Marine Biology Research* 8.10:1003-1011.
- Shiffman, D. S., Gallagher, A. J., Boyle, M. D., Hammerschlag-Peyer, C. M., & Hammerschlag, N. (2012). Stable isotope analysis as a tool for elasmobranch conservation research: a primer for non-specialists. *Marine and Freshwater Research*, 63: 635-643.

- Skjæraasen, J.E. and O.A. Bergstad, (2000). Distribution and feeding ecology of *Raja radiata* in the northeastern North Sea and Skagerrak (Norwegian Deep). *ICES J. Mar. Sci.* 57(4):1249-1260.
- Smale M and L Compagno. (1997). Life history and diet of two southern African smoothhound sharks, *Mustelus mustelus* (Linnaeus, 1758) and *Mustelus palumbes* Smith, 1957 (Pisces: Triakidae). *South African Journal of Marine Science* 18: 229-248.
- Stefanescu, C., Lloris, D., & Rucabado, J. (1993). Deep-sea fish assemblages in the Catalan Sea (western Mediterranean) below a depth of 1000 m. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 40: 695-707.
- Treberg, J.R., Speers-Roesch, B., Piermarini, P.M., Ip, Y.K., Ballantyne, J.S., Driedzic, W.R. (2006b). The accumulation of methylamine counteracting solutes in elasmobranchs with differing levels of urea: a comparison of marine and freshwater species. *J. Exp. Biol.* 209: 860–870.
- Valls, M., Quetglas, A., Ordines, F., & Moranta, J. (2011). Feeding ecology of demersal elasmobranchs from the shelf and slope off the Balearic Sea (western Mediterranean). *Scientia Marina*, 75: 633-639.
- Wearmouth V.J, Sims D.W. (2008). Sexual segregation in marine fish, reptiles, birds and mammals behaviour patterns, mechanisms and conservation implications. *Adv. Mar. Biol.* 54:107–70.
- Wheeler, A. (1978). Key to the Fishes of Northern Europe. London: Frederick Warne.