

RESPUESTA NUTRITIVA, METABÓLICA  
Y BALANCE REDOX DEL DENTÓN (*Dentex dentex*)  
BAJO DIFERENTES CONDICIONES NUTRICIONALES

*Amalia Pérez Jiménez*

TESIS DOCTORAL



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Animal  
Granada, 2008



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Departamento de Biología Animal**



**RESPUESTA NUTRITIVA, METABÓLICA  
Y BALANCE REDOX DEL DENTÓN  
(*Dentex dentex*) BAJO DIFERENTES  
CONDICIONES NUTRICIONALES.**

*Nutritive and metabolic response and redox balance of common  
dentex (*Dentex dentex*) under different nutritional conditions.*

**AMALIA PÉREZ JIMÉNEZ**

**TESIS DOCTORAL**

**GRANADA, 2008**





RESPUESTA NUTRITIVA, METABÓLICA Y BALANCE REDOX  
DEL DENTÓN (*Dentex dentex*) BAJO DIFERENTES  
CONDICIONES NUTRICIONALES.

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por la Licenciada en Ciencias Ambientales

*D<sup>a</sup>. Amalia Pérez Jiménez.*

**DIRECTORES DEL TRABAJO**

**Prof. Dr. D. Gabriel  
Cardenete Hernández**

**Prof. Dra. D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> Carmen  
Hidalgo Jiménez**

**Prof. Dra. D<sup>a</sup>. Amalia E.  
Morales Hernández**

**ASPIRANTE**

**Lda. D<sup>a</sup>. Amalia Pérez Jiménez**



Los trabajos de investigación que se recogen en la presente memoria de Tesis Doctoral han sido realizados en la Unidad de Fisiología Animal del Departamento de Biología Animal de la Universidad de Granada, con ayuda de una beca del Plan de Formación de Personal Docente e Investigador de la Junta de Andalucía y otra para la Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, además del apoyo económico de los proyectos de investigación, financiados por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, que se detallan a continuación:

- “Desarrollo de técnicas de cultivo del dentón (*Dentex dentex*). Estudios nutricionales y de factores medio ambientales”. Ref.: ACU00-011-C4-2
- “Nutrición y pautas de alimentación en dentón (*Dentex dentex*). Estudios de factores ambientales en las distintas fases de cultivo”. Ref.: ACU03-009-C4-2.

Algunos de los resultados recogidos en esta memoria han sido presentados en las siguientes reuniones científicas:

- IX Congreso Nacional de Acuicultura, Cádiz, 2003.
- X Congreso Nacional de Acuicultura, Gandía (Valencia), 2005.
- XII Internacional Symposium on Fish Nutrition and Feeding, Biarritz (Francia), 2006.
- XI Congreso Nacional de Acuicultura, Vigo (Pontevedra), 2007.

Asimismo, parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han dado lugar a la siguiente publicación:

- Morales, A.E.; Pérez-Jiménez, A.; Hidalgo, M.C.; Abellán, E. y Cardenete, G. “Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver”. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology & Pharmacology*, Volume 139, Issues 1-3, October 2004, Pages 153-161.





## Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver

Amalia E. Morales<sup>a,\*</sup>, Amalia Pérez-Jiménez<sup>a</sup>, M. Carmen Hidalgo<sup>a</sup>,  
Emilia Abellán<sup>b</sup>, Gabriel Cardenete<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biología Animal y Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avenida Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain

<sup>b</sup>Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Murcia, 30860 Puerto de Mazarrón, Murcia, Spain

Received 24 July 2004; received in revised form 8 October 2004; accepted 12 October 2004

### Abstract

The aim of this work was to evaluate the effects of prolonged starvation and refeeding on antioxidant status and some metabolic-related parameters in common dentex (*Dentex dentex*) liver. Fish deprived of food for 5 weeks showed a significant increase in lipid peroxidation, measured as malondialdehyde (MDA) levels. The activity of the antioxidative enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase, and glutathione peroxidase (GPX) in starved fish significantly increased (by 42%, 22%, and 52%, respectively), whereas glutathione reductase (GR) activity was significantly depressed by 53% compared to controls. No qualitative changes in the SOD isoenzymatic pattern were detected by nondenaturing PAGE analysis, but the isoforms corresponding to CuZn-SOD I and II were enhanced in starved fish. The activity of the enzymes indicative of oxidative metabolism,  $\beta$ -hydroxyacyl CoA dehydrogenase (HOAD) and citrate synthase (CS), significantly increased (by 123% and 28%, respectively), and that of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) was inhibited by 56%. Oxidative damage under these circumstances is reversible since all biomarkers assayed returned to control values after refeeding. Our results show that prolonged starvation leads to a pro-oxidant situation and oxidative stress despite activation of antioxidant defense mechanisms, and that inhibition of G6PDH activity might be responsible for this failure in cellular antioxidant defenses.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Common dentex; Starvation; Refeeding; Liver; Lipid peroxidation; Antioxidative enzymes; SOD isoenzymes; Metabolic status

### 1. Introduction

Unlike mammals, fish may survive long periods of starvation. Under normal feeding situations, fish grow and store energy reserves, while metabolic demands to maintain life processes in starved fish are met by mobilizing such nutrient stores leading to body weight loss (Paul et al., 1995; Collins and Anderson, 1997; Power et al., 2000; Guderley et al., 2003). This shift in energy fuels imposes a metabolic adaptation that involves the up- and down-regulation of the major pathways of intermediary metabolism, particularly in the liver.

Namely, most investigations concerning the influence of prolonged starvation on the metabolic responses in fish reported that the activity of glucose-degrading enzymes and those of lipogenesis was depressed, whereas the fatty acids derived from triglyceride hydrolysis were preferentially used as fuels through the corresponding oxidative pathways (Moon and Johnston, 1980; Moon et al., 1989; Shimeno et al., 1997; Barroso et al., 1998; Sánchez-Muros et al., 1998; Dou et al., 2002; Guderley et al., 2003; Metón et al., 2003).

Oxidative metabolism of cells is a continuous source of reactive oxygen species (ROS), resulting from univalent reduction of O<sub>2</sub>, that can damage most cellular components leading to cell death. To protect from these highly reactive intermediates, living organisms possess a defense system consisting of both enzymatic and non-

\* Corresponding author. Tel.: +34 958 243247; fax: +34 958 243238.

E-mail address: amaenca@ugr.es (A.E. Morales).

enzymatic antioxidants that scavenge them. Nevertheless, under several situations, the rate of generation of ROS exceeds that of their removal and oxidative stress occurs (Sies, 1986; Di Giulio et al., 1995; Halliwell and Gutteridge, 2000; Livingstone, 2001). In this sense, starvation has been reported to have pro-oxidant effects in mammals and being considered responsible for most of the detrimental effects derived from food deprivation, as increased ROS generation is not adequately neutralized by antioxidant systems (Robinson et al., 1997; Domenicali et al., 2001).

It is well established that the most important antioxidant enzymes are superoxide dismutase (SOD), which detoxifies  $O_2^-$ , catalase, which reduces  $H_2O_2$ , glutathione peroxidase (GPX), which reduces both  $H_2O_2$  and organic peroxides by a glutathione-dependent reaction, and glutathione reductase (GR), which catalyzes the NADPH-dependent regeneration of glutathione (GSH) from the oxidized form (GSSG) generated by GPX. Although it has been widely reported that the intracellular levels of some nonenzymatic antioxidants, such as glutathione, influence the activity of the enzymatic antioxidants (Halliwell and Gutteridge, 2000), there is more and more evidence that glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), the rate-limiting enzyme of the pentose phosphate pathway, plays a crucial role in modulating antioxidant defenses both in humans and mammals, as the NADPH generated in the reaction catalyzed by this enzyme is considered to be essential for the activity of the two  $H_2O_2$ -scavenging pathways of cells (Kirkman and Gaetani, 1984; Gaetani et al., 1989; Scott et al., 1991; Pandolfi et al., 1995; Kirkman et al., 1999; Tian et al., 1999; Leopold and Loscalzo, 2000). In fact, G6PDH activity is depressed in mammals subjected to food deprivation (Protsko et al., 1989; Goodridge, 1991; Amir-Ahmady and Salati, 2001), and in fish G6PDH inhibition has been reported to be a clear consequence of starvation (Viganò et al., 1993; Shimeno et al., 1997; Barroso et al., 1998; Caseras et al., 2002; Metón et al., 2003).

Studies regarding the influence of food deprivation on antioxidant defenses in fish are scarce (Sullivan and Somero, 1983; Bastrop et al., 1992; Viganò et al., 1993; Blom et al., 2000; Guderley et al., 2003; Pascual et al., 2003), and a general or similar trend cannot be deduced from available data, which seems to indicate that the antioxidative response to cope with food deprivation might be species-dependent.

As other fish species, the common dentex alternates periods of normal feeding and fasting during the annual cycle, but no studies concerning the biological mechanisms of this species to face these nutritional challenges are available. In addition, the common dentex is a promising sparid fish for aquaculture in the Mediterranean area, and to know well the biology of the species, particularly those aspects related to nutrition, would be

important to attain its intensive culture. Therefore, the aim of this study was to evaluate for the first time the effects of prolonged starvation and refeeding on the antioxidant status and some metabolic-related parameters in the liver of this fish species.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

All biochemicals were obtained from Sigma (St. Louis, MO), Roche Diagnostics (Mannheim, Germany), or Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). All the other chemicals were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and were of analytic grade.

### 2.2. Animals and experimental conditions

Sexually immature common dentex (*Dentex dentex*) were raised at the Marine Culture Experimental Plant of the Spanish Institute of Oceanography in Mazarrón (Murcia, Spain). Fish were randomly selected and distributed into four groups of 16 fish each (324 g mean weight). Each group was maintained, at  $25.5 \pm 2$  °C, in 1000-L tanks continuously supplied with seawater (37‰) at a flow rate of  $30 \text{ l min}^{-1}$ . Oxygen saturation was always higher than 88%. The photoperiod was regulated as a 12:12 dark/light cycle.

Two groups were fed three times a day to apparent satiation throughout the experiment on a commercial diet (48% protein, 22% lipids, and 10% carbohydrates, Dibaq Diproteg, Madrid, Spain) and used as controls. The two remaining groups were starved for 5 weeks and then refed for 3 weeks in the same way described for the control groups. The experiment lasted for 8 weeks.

### 2.3. Sampling

Fish were sampled at the end of both starvation and refeeding periods (5th and 8th weeks). Fish sampled from control tanks at each sampling time were used as controls of starvation ( $C_S$ ) and refeeding ( $C_R$ ), respectively. At each sampling, four fish from each tank (eight per treatment) were taken at random and anaesthetized by immersion in a 1:2000 (v/v) 2-phenoxyethanol solution. Fish were sacrificed with a blow to the head, and livers were dissected, weighed, and immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at  $-80^\circ\text{C}$  until use.

### 2.4. Tissue preparation for analytic procedures

Livers were rapidly thawed and manually homogenized, using a Potter homogenizer with a glass pestle, in 9 volumes of ice-cold 100 mM Tris-HCl buffer containing 0.1 mM EDTA and 0.1% (v/v) Triton X-100, pH 7.8. All procedures

were performed on ice. Homogenates were centrifuged at  $30000\times g$  for 30 min at 4 °C (Centrikon H-401 centrifuge), and the resultant supernatants were aliquoted and stored at –80 °C for later lipid peroxidation determinations and enzyme assays.

### 2.5. Lipid peroxidation assay

The concentration of thiobarbituric acid reacting substances (TBARS), expressed as malondialdehyde (MDA) concentration (nanomole per milliliter of extract), was determined as described by Buege and Aust (1978).

### 2.6. Enzyme activity assays

All enzyme assays were carried out at 25 °C using a PowerWave<sub>x</sub> microplate scanning spectrophotometer (Bio-Tek Instruments, USA) and run in duplicate in 96-well microplates (UVStar<sup>®</sup>, Greiner Bio-One, Germany). This made it necessary to adapt all the enzymatic methods described below to the microplate reader to obtain optimal activities. Adaptation of the methods was done by scaling down the reaction mixtures to a final volume of 200 µL and by adjusting both the total time for which reactions were allowed to proceed and the measurement intervals. In addition, the optimal substrate and protein concentrations for the measurement of maximal activity for each enzyme were established by preliminary assays. The enzymatic reactions were initiated by addition of the tissue extract, except for SOD where xanthine oxidase was used. The millimolar extinction coefficients used for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NADH/NADPH, and DTNB [5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)] were 0.039, 6.22, and 13.6, respectively. The assay conditions were as follows:

**Superoxide dismutase** (SOD; EC 1.15.1.1) activity was measured by the ferricytochrome *c* method using xanthine/xanthine oxidase as the source of superoxide radicals. The reaction mixture consisted of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8), 0.1 mM EDTA, 0.1 mM xanthine, 0.013 mM cytochrome *c*, and 0.024 IU/mL xanthine oxidase. Activity is reported in units of SOD per milligram of protein. One unit of activity was defined as the amount of enzyme necessary to produce a 50% inhibition of the ferri-

cytochrome *c* reduction rate (McCord and Fridovich, 1969).

**Catalase** (EC 1.11.1.6) activity was determined by measuring the decrease of hydrogen peroxide concentration at 240 nm according to Aebi (1984). The reaction mixture consisted of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7) and 10.6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> freshly added.

**Glutathione peroxidase** (GPX; EC 1.11.1.9) activity was measured following the method of Flohé and Gunzler (1984). The GSSG generated by GPX was reduced by GR, and NADPH oxidation was monitored at 340 nm. The reaction mixture consisted of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.1), 3.6 mM GSH, 3.6 mM sodium azide, 1 IU/mL glutathione reductase, 0.2 mM NADPH, and 1.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Glutathione reductase** (GR; EC 1.6.4.2) activity was assayed as described by Carlberg and Mannervik (1975), with some modifications, by measuring the oxidation of NADPH at 340 nm. The reaction mixture consisted of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.63 mM NADPH, and 0.15 mM GSSG.

**β-Hydroxyacyl CoA dehydrogenase** (HOAD; EC 1.1.1.35) was assayed according to Singer et al. (1990) by measuring the oxidation of NADH at 340 nm. The assay mixture consisted of 50 mM imidazole–HCl buffer (pH 8), 0.1 mM NADH, and 0.1 mM acetoacetyl CoA.

**Citrate synthase** (CS; EC 4.1.3.7) activity was measured according to Singer et al. (1990) by observing the reduction of DTNB at 412 nm. The assay mixture consisted of 50 mM imidazole–HCl buffer (pH 8), 0.1 mM DTNB, 0.2 mM acetyl CoA, and 0.2 mM oxaloacetic acid.

**Glucose-6-phosphate dehydrogenase** (G6PDH; 1.1.1.49) activity was determined by measuring the reduction of NADP<sup>+</sup> at 340 nm as previously described (Morales et al., 1990) with some modifications. The assay mixture consisted of 50 mM imidazole–HCl buffer (pH 7.4), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM NADP<sup>+</sup>, and 1 mM glucose-6-phosphate.

Except for SOD, which units of expression have been already reported, enzyme activity is expressed as units (catalase) or milliunits (GPX, GR, HOAD, CS, G6PDH) per milligram of protein. One unit is defined as the amount of enzyme required to transform 1 mmol of substrate/min under the above assay conditions.

Table 1  
Influence of food deprivation and refeeding on body weight, HSI, and liver protein of dentex (*Dentex dentex*)

	Body weight (g)			HSI (%)		Liver protein (mg/mL crude extract)	
	Initial	After 5 weeks	After 8 weeks	After 5 weeks	After 8 weeks	Alter 5 weeks	After 8 weeks
C <sub>S</sub> –C <sub>R</sub>	326.0±12.1	417.6±14.9	466.8±15.9	0.88±0.09	1.33±0.12	11.2±0.6	12.5±0.7
S–R	321.9±10.8	303.2*±5.5	387.0*±13.8	0.76±0.04	1.20±0.08	10.5±0.5	11.9±0.6

Values for C<sub>S</sub> and S indicated as after 5 weeks. Values for C<sub>R</sub> and R indicated as after 8 weeks. Results are means±S.E. (n=8).

Asterisks indicate significant differences of S and R groups with their respective controls (*P*<0.001).

HSI, hepatosomatic index: (liver weight/body weight)×100.

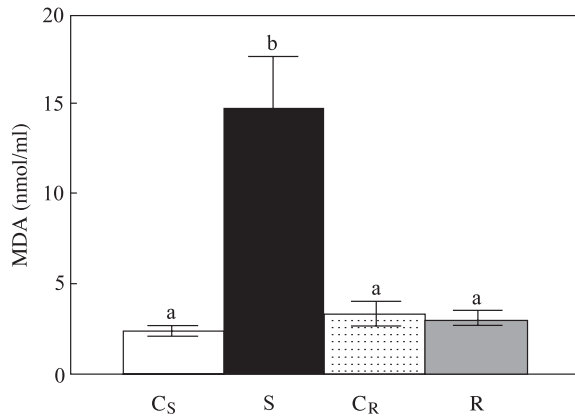


Fig. 1. Effect of starvation and refeeding on levels of malondialdehyde (MDA) in dentex liver. Control-starvation, starved, control-refeeding, and refeed values are represented as C<sub>S</sub>, S, C<sub>R</sub>, and R, respectively. Data are means±S.E. with  $n=8$ . Different letters indicate significant differences among groups ( $P<0.001$ ).

### 2.7. Analysis of SOD isoenzymes

For the separation of SOD isoenzymes, nondenaturing PAGE was performed on 10% acrylamide slab minigels (MiniProtean II, Bio-Rad). SOD isoenzymes were detected in gels by the photochemical NBT (nitroblue tetrazolium) staining method (Beauchamp and Fridovich, 1971). The different types of SOD were differentiated by performing the activity stains in gels previously incubated for 20 min at 25 °C in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.8, containing either 50 mM KCN or 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. CuZn-SODs are inhibited by KCN and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe-SODs are resistant to CN<sup>-</sup> but inactivated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and

Mn-SODs are resistant to both inhibitors (Fridovich, 1986).

### 2.8. Protein measurements

Protein concentration was determined using the method of Bradford (1976), with bovine serum albumin as a standard, and expressed as milligram protein per milliliter homogenate.

### 2.9. Statistical analysis

All results are expressed as means±S.E. The data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), and whenever a significant effect was indicated, the Tukey's HSD test was used to compare treatment means (Tukey, 1949).

## 3. Results

Table 1 summarizes some physical and biochemical parameters for the experimental groups. Food deprivation significantly reduced body weight ( $P<0.001$ ), but no differences in the hepatosomatic index (HSI) between S and C<sub>S</sub> fish were found. Refeeding (R) for 3 weeks induced a gain of body weight, although values were still significantly lower than those of fish continuously fed throughout the experiment (C<sub>R</sub>). HSI did not differ significantly between R and C<sub>R</sub> groups, although values increased with time, with the latter groups showing higher HSI than those of S and C<sub>S</sub> fish. Soluble protein levels of livers were not

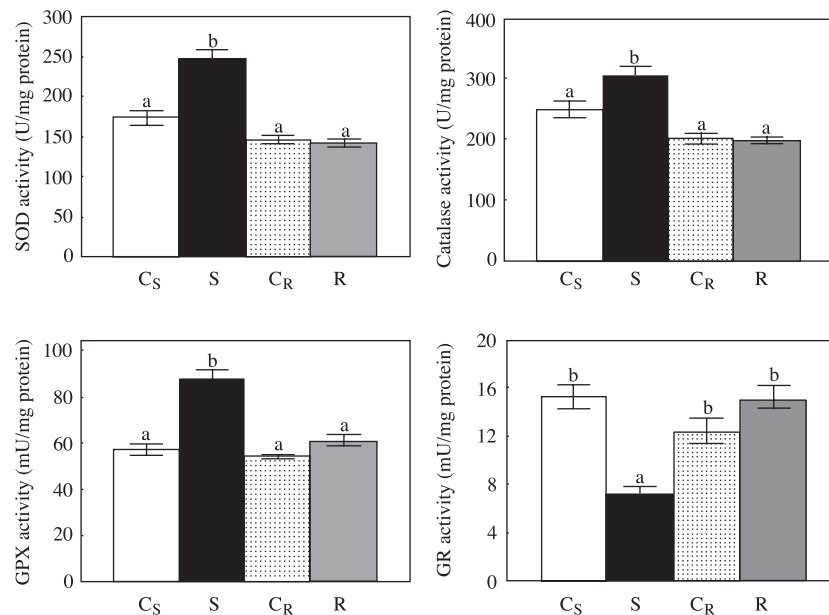


Fig. 2. Effect of starvation and refeeding on superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPX), and glutathione reductase (GR) activities in dentex liver. Control-starvation, starved, control-refeeding, and refeed values are represented as C<sub>S</sub>, S, C<sub>R</sub>, and R, respectively. Data are means±S.E. with  $n=8$ . Different letters indicate significant differences among groups ( $P<0.001$  for SOD, GPX and GR;  $P<0.05$  for catalase).

significantly affected ( $P>0.05$ ) either by nutritional challenges (starvation–refeeding) or time of sampling.

The effects of prolonged starvation and refeeding on lipid peroxidation, measured as MDA levels, in liver of common dentex are shown in Fig. 1. Starvation induced a 6.1-fold increase in MDA levels ( $P<0.001$ ). After 3 weeks of refeeding, the MDA levels in liver of R fish returned to control values.

The specific activity of the antioxidant enzymes is shown in Fig. 2. SOD activity was increased ( $P<0.001$ ) by 41.5% after 5 weeks of starvation with respect to controls. The activity of SOD in liver of refed fish returned to control values. No qualitative changes in liver SOD isoenzyme pattern were found as a consequence of food deprivation, with all groups showing three activity bands (Fig. 3). After incubation with specific inhibitors, it was found that the slower band corresponded to Mn-SOD, whereas the two faster bands were CuZn-SODs, designated as CuZn-SOD I and II according to their respective increasing electrophoretic mobility. Both CuZn-SODs were enhanced in food deprived fish (S), but this effect disappeared after refeeding.

Catalase activity increased ( $P<0.05$ ) by 22% in starved fish with respect to the  $C_S$  group (Fig. 2). After the refeeding period, catalase activity in previously starved fish (R) was similar to that of the  $C_R$  fish. Regarding the enzyme GPX (Fig. 2), its activity was significantly increased ( $P<0.001$ ) by 52% in the liver of starved fish with respect to the  $C_S$  group and returned to control values after refeeding. Starvation significantly affected GR activity (Fig. 2), which was inhibited by 53% in the S group ( $P<0.001$ ). The activity of GR returned to control values after refeeding.

The specific activity of HOAD, CS, and G6PDH is shown in Fig. 4. Prolonged starvation dramatically increased ( $P<0.001$ ) hepatic HOAD activity by 123%. Refeeding reversed this effect, with R fish showing an HOAD activity similar that of the  $C_R$  fish. Regarding the enzyme CS, the activity increased by 30% as a consequence of food deprivation ( $P<0.001$ ) and returned to control

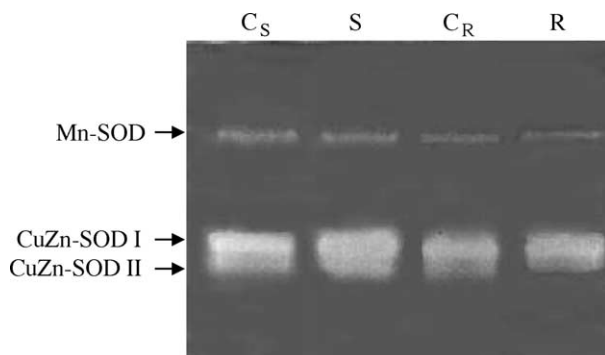


Fig. 3. SOD isoenzymes from dentex liver. Crude extracts (75  $\mu$ g protein) were loaded onto nondenaturing polyacrylamide gels, and staining of gels was performed by the NBT photochemical reduction method. Control-starvation, starved, control-refeeding, and refed values are represented as  $C_S$ , S,  $C_R$ , and R, respectively.

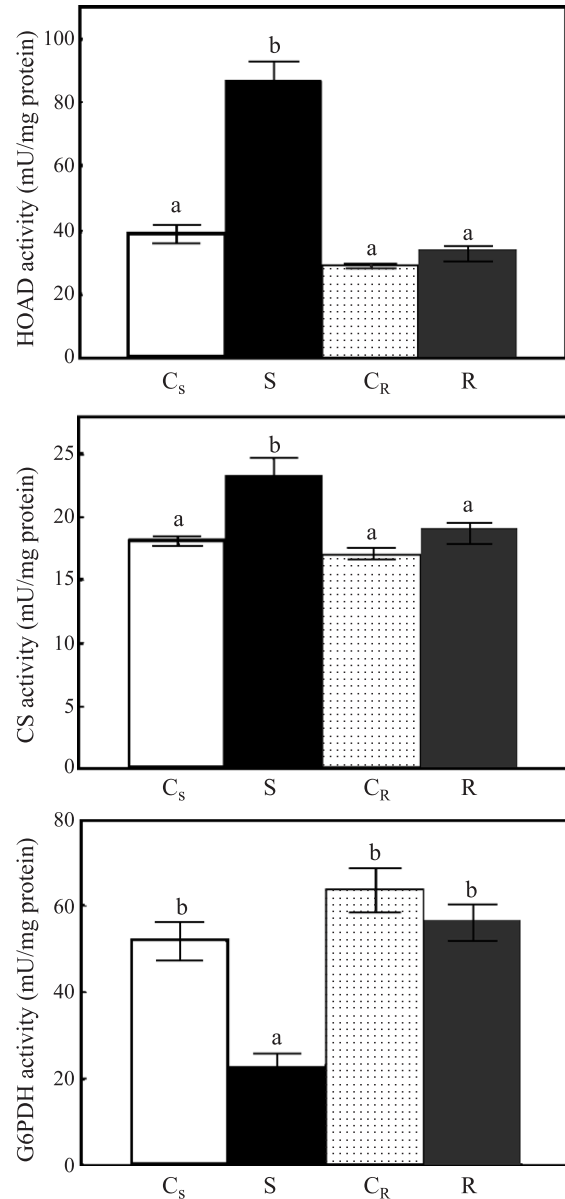


Fig. 4. Effect of starvation and refeeding on  $\beta$ -hydroxyacyl CoA dehydrogenase (HOAD), citrate synthase (CS), and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activities in dentex liver. Control-starvation, starved, control-refeeding, and refed values are represented as  $C_S$ , S,  $C_R$ , and R, respectively. Data are means  $\pm$  S.E. with  $n=8$ . Different letters indicate significant differences among groups ( $P<0.001$ ).

values after refeeding. For the enzyme G6PDH, starvation significantly inhibited the activity of the enzyme by 56% with respect to controls ( $P<0.001$ ). At the end of the refeeding period, this effect disappeared, with the R and  $C_R$  groups showing a similar G6PDH activity.

#### 4. Discussion

It has been reported that most of the detrimental effects of food deprivation could be mainly attributed to the participation of ROS generated under such situation

(Robinson et al., 1997; Domenicali et al., 2001; Pascual et al., 2003). To evaluate the effects of prolonged starvation on the antioxidant defenses in the *D. dentex* liver, we examined the levels of MDA, a metabolite derived from lipid peroxidation, the activity of some antioxidative enzymes, and the SOD band pattern. All these parameters have been described as valuable biomarkers of pro-oxidant situations in mammals (Robinson et al., 1997; Gomi and Matsuo, 1998; Domenicali et al., 2001) and in fish (Stephensen et al., 2002; Pandey et al., 2003; Pascual et al., 2003). Based on MDA levels, our results clearly showed that prolonged starvation led to oxidative stress, with starved fish showing a 6.1-fold increase in liver MDA with respect to control fish. Available information concerning the influence of food deprivation on the antioxidant defenses in fish is scarce. Only a recent study with sea bream (*Sparus aurata*) evaluated the influence of prolonged starvation on MDA levels, and a significant increase of this metabolite in liver has been reported (Pascual et al., 2003). Partial food deprivation has been also reported to increase MDA levels in liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Hidalgo et al., 2002), and sea bream, *S. aurata* (Pascual et al., 2003).

With respect to antioxidative enzymes, our results showed a significant increase of SOD activity in the liver of starved *D. dentex*, which suggests that a rise in the  $O_2^-$  generation rate might have taken place. In sea bream (*S. aurata*) deprived of food for 46 days, an increase of hepatic SOD activity has also been reported (Pascual et al., 2003). The latter study also showed that starvation induced changes in the SOD band pattern in the liver of sea bream, with starved fish displaying two new Mn-SOD isoenzymes. In this study, deprivation of food did not induce changes in the SOD isoenzyme pattern in the liver of dentex, which reflects that, at least at this level, prolonged starvation influenced in a different way these two sparid fish, with an increase of the constitutive isoenzymes being possibly sufficient to dentex cope against starvation. It is worth to note that incubation of gels in the presence of 50 mM KCN solutions was needed to inhibit CuZn-SODs, even when only 25  $\mu$ g protein was loaded to perform PAGE, whereas 2–5 mM KCN solutions usually inhibit this type of isozymes in fish (Hidalgo et al., 2002). Future studies will be performed to establish whether or not this might be one special feature of this fish species.

The reported increase in SOD activity in starved dentex would result in a higher generation of  $H_2O_2$ . Actually, results of the two  $H_2O_2$ -scavenging enzymes seem to confirm this fact. Starvation induced a 52% increase of GPX activity and a more moderate (22%), although significant, increase in catalase activity. However, GR activity did not show the same trend, with starved fish showing a significantly lower activity than controls. A similar decrease in GR activity was reported in rainbow trout deprived of food (Blom et al., 2000); on the contrary, prolonged starvation induced an enhanced activity of this enzyme in the liver of sea bream (Pascual et al., 2003),

which supports the hypothesis of differences between these two sparid fish in response to prolonged starvation.

Given that MDA is considered a valuable indicator of oxidative damage of cellular components, our results suggest that starvation enhanced reactive oxygen species generation in the liver of *D. dentex* and that antioxidant defenses were not totally able to effectively scavenge them, thus leading to lipid peroxidation. In this sense, inhibition of GR activity could be somehow indicative of a failure in antioxidant defenses.

ROS are derived from normal aerobic metabolism of cells, thus we also aimed to evaluate the activity of two key enzymes of the intermediary metabolism which could help to elucidate to what extent oxidative metabolism is enhanced during prolonged starvation in liver of *D. dentex*. With this purpose, we evaluated the activity of HOAD, an enzyme of  $\beta$ -oxidation and, consequently, indicative of lipolysis, and CS, an enzyme of the citrate cycle and indicative of aerobic metabolism. We found a 123% increase in the activity of liver HOAD in starved fish, which reflects that, after 5 weeks of food deprivation, endogenous fatty acids are being used as an energy source. It has been already reported that, while under normal feeding situations the fatty acids synthesised de novo in fish liver are stored both in the liver and in the adipose tissue (Tocher et al., 1989), during prolonged starvation such fat deposits are mobilized for energy supply (Jobling, 1980; Hogendoorn, 1983; Reinitz, 1983; Cook et al., 2000; Guderley et al., 2003), leading to a metabolic adaptation derived from these changing energy fuels (Barroso et al., 1998; Sánchez-Muros et al., 1998; Dou et al., 2002; Guderley et al., 2003; Metón et al., 2003). With respect to CS, our results showed an increased activity in starved fish, which would indicate that the higher amounts of acetyl-CoA that are generated by the enhanced  $\beta$ -oxidation enter the citrate cycle. These two metabolic pathways generate NADH and  $FADH_2$ , which must enter the mitochondrial respiratory chain to be oxidized and to generate ATP. Respiratory chain has been reported to be a main intracellular source of ROS (Ramassarma, 1982; Lenaz, 1998), since under physiological conditions 1–4% of oxygen reacting in the respiratory chain is incompletely reduced to superoxide radical (Ramassarma, 1982; Tiidus and Houston, 1994; Storey, 1996; Lee et al., 1997). Therefore, under a situation that enhances oxidative metabolism, it may be expected that an increase in both ROS generation and ROS-scavenging mechanisms occurs. Our results indicate that this might be the situation that starved *D. dentex* is subjected to. This positive correlation between oxidative metabolism and antioxidant defenses has been already reported in Atlantic cod (*Gadus morhua*) subjected to prolonged starvation (Guderley et al., 2003). However, we have previously suggested that GR inhibition might reflect a possible antioxidant defense failure responsible for the reported increase in lipid peroxidation. GR catalyzes a NADPH-

dependent reaction, and NADPH is generated by several enzymatic reactions of the intermediary metabolism that can be strongly influenced by the nutritional status. In this study, a 56% inhibition of G6PDH activity in the liver of starved fish was found. In agreement with our results, a significant depression of the G6PDH activity as a consequence of food deprivation has been found in other fish species, such as rainbow trout (Viganò et al., 1993; Barroso et al., 1998), common carp (Shimeno et al., 1997), and sea bream (Caseras et al., 2002; Metón et al., 2003). In higher vertebrates, it has also been reported a great capacity to adapt dehydrogenases of the pentose phosphate pathway in response to different nutritional situations, such as starvation (Protsko et al., 1989; Goodridge, 1991; Amir-Ahmady and Salati, 2001).

It has been proposed that the pentose phosphate pathway is the predominant NADPH source required to defend against oxidative stress (Pandolfi et al., 1995; Tian et al., 1999; Leopold and Loscalzo, 2000), and it might be expected that any situation that inhibits G6PDH activity makes cells more vulnerable to oxidative attack. The crucial role of G6PDH in modulating the cellular response to oxidative stress and in maintaining intracellular GSH levels has been confirmed in mammals (Gaetani et al., 1989; Vulliamy et al., 1992; Pandolfi et al., 1995; Tian et al., 1998, 1999; Salvemini et al., 1999; Leopold and Loscalzo, 2000). On the other hand, it has been demonstrated that NADPH protects catalase from inactivation (Gaetani et al., 1994; Kirkman et al., 1999), because each of the four monomers of catalase contains an NADPH-binding site necessary for enzymatic activity (Kirkman and Gaetani, 1984; Kirkman et al., 1999). In this sense, it has been found that decreased NADPH levels were correlated with a loss of catalase activity in human erythrocytes (Gaetani et al., 1989), and that the enhanced oxidant sensitivity of G6PDH-deficient cells is most likely due to the absence of NADPH rather than to a reduced GSH level (Scott et al., 1991). Our results indicate that also in fish G6PDH might play such a crucial role in maintaining the redox state of the cell and in modulating the antioxidant defenses through the control of NADPH generation. The lower availability of NADPH would render a reduced GR activity, which would impair GSH regeneration from GSSG. This reduction in the recycling rate of reduced glutathione, along with the depletion of endogenous GSH pool that has been reported to occur under a situation of food deprivation (Benuck et al., 1995; Papadopoulos et al., 1997; Robinson et al., 1997; Vendemiale et al., 2001; Pascual et al., 2003), would result in an impairment of the GSH-recycling system. On the other hand, although a moderate increase in catalase activity has been found in starved dentex, it may not be ruled out that the lower NADPH availability derived from G6PDH inhibition prevents catalase from playing its optimal enzymatic role as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenger. Previous studies reported that food restriction did not

induce changes in catalase activity in liver of rainbow trout (Hidalgo et al., 2002), and, again, a different response than that found in this study has been reported for sea bream, with either partial food restriction and starvation inducing a significant reduction in catalase activity in the liver of this fish (Pascual et al., 2003).

Our results indicate that prolonged starvation leads to enhanced oxidation and oxidative stress in the liver of *D. dentex* despite activation of some antioxidant defense mechanisms. As reported in mammals, inhibition of G6PDH activity may be responsible for this failure in cellular antioxidant defense. Changes in the antioxidant defense system are used as biomarkers of a variety of prooxidant situations in fish, including nutritional deficiencies (Blom et al., 2000; Hidalgo et al., 2002; Pascual et al., 2003) and exposure to xenobiotics (Winston and di Giulio, 1991; Pedrajas et al., 1996), which can negatively affect growth, disease resistance, and behaviour. Common dentex is a Mediterranean sparid fish that have been reported as highly suitable for intensive aquaculture; nevertheless, because of the ignorance of its basic nutritional needs, as well as the absence of information about how biotic and abiotic factors may influence its physiology and metabolism, there are still a number of problems to solve before attaining its intensive culture. In considering a new species for aquaculture, due to the scarcity of available data, it is often assumed that this species responds to any situation in the same way than other closely related species do. However, this study shows that this assumption does not always hold true, being necessary to establish the particular response of each species.

Finally, due to the great ability of fish to survive to long periods of starvation, we also aim to evaluate whether or not the possible alterations induced by starvation reversed after refeeding. The results obtained in refeed dentex are consistent with those reported for other fish species subjected to similar nutritional situations in the sense that fish recovered weight, lipid peroxidation levels indicated that oxidative stress disappeared, and all the enzymatic activities of both antioxidant defenses and intermediary metabolism returned to control values (Soengas et al., 1996; Collins and Anderson, 1997; Barroso et al., 1998; Metón et al., 2003; Pascual et al., 2003).

## Acknowledgments

The authors are grateful to Professor J.M. Palma (Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, Spain) for his helpful scientific support and critical reading of an earlier version of this manuscript.

This study has been supported by grant ACU00-011-C4-2 from the INIA (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain).

APJ was recipient of a predoctoral fellowship from the Spanish Government.



## References

- Aebi, H., 1984. Catalase 'in vitro'. *Methods Enzymol.* 105, 121–127.
- Amir-Ahmady, B., Salati, L.M., 2001. Regulation of the processing of glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA by nutritional status. *J. Biol. Chem.* 276, 10514–10523.
- Barroso, J.B., Peragón, J., Contreras-Jurado, C., García-Salguero, L., Corpas, F.J., Esteban, F.J., Peinado, M.A., de la Higuera, M., Lupiáñez, J.A., 1998. Impact of starvation–re-feeding on kinetics and protein expression of trout liver NADPH-production systems. *Am. J. Physiol.* 274, R1578–R1587.
- Bastrop, R., Jürss, K., Wacke, R., 1992. Biochemical parameters as a measure of food availability and growth in immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* 102A, 151–161.
- Beauchamp, C.O., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 276–287.
- Benuck, M., Banay-Schwartz, M., DeGuzman, T., Lajtha, A., 1995. Effect of food deprivation on glutathione and amino acid levels in brain and liver of young and aged rats. *Brain Res.* 678, 259–264.
- Blom, S., Andersson, T.B., Förlin, L., 2000. Effects of food deprivation and handling stress on head kidney 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone 21-hydroxylase activity, plasma cortisol and the activities of liver detoxification enzymes in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 48, 265–274.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavo enzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475–5480.
- Caseras, A., Metón, I., Vives, C., Egea, M., Fernández, F., Baanante, I.V., 2002. Nutritional regulation of glucose-6-phosphate gene expression in liver of *Sparus aurata*. *Br. J. Nutr.* 88, 607–614.
- Collins, A.L., Anderson, T.A., 1997. The influence of changes in food availability on the activities of key degradative and metabolic enzymes in the liver and epaxial muscle of the golden perch. *J. Fish Biol.* 50, 1158–1165.
- Cook, J.T., Sutterlin, A.M., McNiven, M.A., 2000. Effect of food deprivation on oxygen consumption and body composition of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 188, 47–63.
- Di Giulio, R.T., Benson, W.H., Sanders, B.M., Van Veld, P.A., 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: Rand, G. (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. Taylor and Francis, London.
- Domenicali, M., Caraceni, P., Vendemiale, G., Grattagliano, I., Nardo, B., Dall'Agata, M., Santoni, B., Trevisani, F., Cavallari, A., Altomare, E., Bernardi, M., 2001. Food deprivation exacerbates mitochondrial oxidative stress in rat liver exposed to ischemia–reperfusion injury. *J. Nutr.* 131, 105–110.
- Dou, S., Masuda, R., Tanaka, M., Tsukamoto, K., 2002. Feeding resumption, morphological changes and mortality during starvation in Japanese flounder larvae. *J. Fish Biol.* 60, 1363–1380.
- Flohé, L., Gunzler, W.A., 1984. Assay of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105, 115–121.
- Fridovich, I., 1986. Superoxide dismutases. In: Meister, A. (Ed.), *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, vol. 58. John Wiley and Sons, New York, pp. 61–97.
- Gaetani, G.F., Galiano, S., Canepa, L., Ferraris, A.M., Kirkman, H.N., 1989. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood* 73, 334–339.
- Gaetani, G.F., Kirkman, H.N., Mangerini, R., Ferraris, A.M., 1994. Importance of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood* 84, 325–330.
- Gomi, F., Matsuo, M., 1998. Effects of starving and food restriction on the antioxidant enzymes activity of rat livers. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 53, 1361–1367.
- Goodridge, A.G., 1991. Fatty acids synthesis in eucaryotes. In: Vance, D.E., Vance, J. (Eds.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Elsevier, Amsterdam.
- Guderley, H., Lapointe, D., Bédard, M., Dutil, J.-D., 2003. Metabolic priorities during starvation: enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 135A, 347–356.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2000. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. Oxford University Press, Oxford.
- Hidalgo, M.C., Expósito, A., Palma, J.M., de la Higuera, M., 2002. Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 183–193.
- Hogendoorn, H., 1983. Growth and production of the African catfish, *Clarias lazera* (C. and V.): III. Bioenergetic relations of body weight and feeding level. *Aquaculture* 35, 1–17.
- Jobling, M., 1980. Effects of starvation on proximate chemical composition and energy utilization in plaice, *Pleuronectes platessa* L. *J. Fish Biol.* 17, 325–334.
- Kirkman, H.N., Gaetani, G.F., 1984. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 4343–4347.
- Kirkman, H.N., Rolfo, M., Ferraris, A.M., Gaetani, G.F., 1999. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J. Biol. Chem.* 274, 13908–13914.
- Lee, C.M., Weindruch, R., Aiken, J.M., 1997. Age-associated alterations of the mitochondrial genome. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 1259–1269.
- Lenaz, G., 1998. Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 53–67.
- Leopold, J.A., Loscalzo, J., 2000. Cyclic strain modulates resistance to oxidant stress by increasing G6PDH expression in smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 279, H2477–H2485.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656–666.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055.
- Metón, I., Fernández, F., Baanante, I.V., 2003. Short- and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 225, 99–107.
- Moon, T.W., Johnston, I.A., 1980. Starvation and the activities of glycolytic and gluconeogenic enzymes in skeletal muscles and liver of the plaice, *Pleuronectes platessa*. *J. Comp. Physiol.* 36B, 31–38.
- Moon, T.W., Foster, G.D., Plisetskaya, E.M., 1989. Changes in peptide hormones and liver enzymes in the rainbow trout deprived of food for 6 weeks. *Can. J. Zool.* 67, 2189–2193.
- Morales, A.E., García Rejón, L., de la Higuera, M., 1990. Influence of handling and/or anaesthesia on stress response in rainbow trout. Effects on liver primary metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 95A, 87–93.
- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., Raisuddin, S., 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. and Schn.). *Sci. Total Environ.* 309, 105–115.
- Pandolfi, P., Sonati, F., Rivi, R., Mason, P., Grosveld, F., Luzzatto, J., 1995. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *EMBO J.* 14, 5209–5215.
- Papadopoulos, M.C., Koumenis, I.L., Dugan, L.L., Giffard, R.G., 1997. Vulnerability to glucose deprivation injury correlates with glutathione levels in astrocytes. *Brain Res.* 748, 151–156.
- Pascual, P., Pedrajas, J.R., Toribio, F., López-Barea, J., Peinado, J., 2003. Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chem. Biol. Interact.* 145, 191–199.

- Paul, A.J., Paul, J.M., Smith, R.L., 1995. Compensatory growth in Alaska yellowfin sole, *Pleuronectes asper*, following food deprivation. *J. Fish Biol.* 46, 442–448.
- Pedrajas, J.R., Peinado, J., López-Barea, J., 1996. Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu,Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chem. Biol. Interact.* 98, 267–282.
- Power, D.M., Melo, J., Santos, C.R.A., 2000. The effect of food deprivation and refeeding on the liver, thyroid hormones and transthyretin in sea bream. *J. Fish Biol.* 56, 374–387.
- Protsko, C.R., Fritz, R.S., Kletzien, R., 1989. Nutritional regulation of hepatic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochem. J.* 258, 295–299.
- Ramasarma, T., 1982. Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in biomembranes. *Biochim. Biophys. Acta* 694, 69–93.
- Reinitz, G., 1983. Relative effect of age, diet, and feeding rate on the body composition of young rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 35, 19–27.
- Robinson, M.K., Rustum, R.R., Chambers, E.A., Rounds, J.D., Wilmore, D.W., Jacobs, D.O., 1997. Starvation enhances hepatic free radical release following endotoxemia. *J. Surg. Res.* 69, 325–330.
- Salvemini, F., Franzè, A., Iervolino, A., Filosa, S., Salzano, S., Ursini, M.V., 1999. Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression. *J. Biol. Chem.* 274, 2750–2757.
- Sánchez-Muros, M.J., García-Rejón, L., García-Salguero, L., de la Higuera, M., Lupiáñez, J.A., 1998. Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout. Adaptative response to starvation and a high-protein, carbohydrate-free diet on glutamate dehydrogenase and alanine aminotransferase kinetics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 55–63.
- Scott, M., Zuo, L., Lubin, B.H., Chiu, D.T.-Y., 1991. NADPH, not glutathione, status modulates oxidant sensitivity in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes. *Blood* 77, 2059–2064.
- Shimeno, S., Shikata, T., Hosokawa, H., Masumoto, T., Kheyali, D., 1997. Metabolic response to feeding rates in common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* 151, 371–377.
- Sies, H., 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem., Int. Ed.* 25, 1058–1071.
- Singer, T.D., Mahadevappa, V.G., Ballantyne, J.S., 1990. Aspects of the energy metabolism of lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, with special emphasis on lipid and ketone body metabolism. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 873–881.
- Soengas, J.L., Strong, E.F., Fuentes, J., Veira, J.A.R., Andrés, M.D., 1996. Food deprivation and refeeding in Atlantic salmon, *Salmo salar*: effects on brain and liver carbohydrate and ketone bodies metabolism. *Fish Physiol. Biochem.* 15, 491–511.
- Stephensen, E., Sturve, J., Forlin, L., 2002. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comp. Biochem. Physiol.* 133C, 435–442.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 1715–1733.
- Sullivan, K.M., Somero, G.N., 1983. Size- and diet-related variations in enzymic activity and tissue composition in the sable fish, *Anoploma fimbria*. *Biol. Bull.* 164, 315–326.
- Tian, W.-N., Braunstein, L.D., Pang, J., Stuhlmeier, K.M., Xi, Q.-C., Tian, X., Stanton, R.C., 1998. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *J. Biol. Chem.* 273, 10609–10617.
- Tian, W.-N., Braunstein, L.D., Apse, K., Pang, J., Rose, M., Tian, X., Stanton, R.C., 1999. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *Am. J. Physiol.* 276, C1121–C1131.
- Tiitus, P.M., Houston, M.E., 1994. Antioxidant and oxidative enzyme adaptations to vitamin E deprivation and training. *Med. Sci. Sports Exerc.* 26, 354–359.
- Tocher, D.R., Carr, J., Sargent, J.R., 1989. Polyunsaturated fatty acid metabolism in fish cells: differential metabolism of (n-3) and (n-6) series acids by cultured cells originating from a freshwater teleost fish and from a marine teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 94B, 367–374.
- Tukey, J.W., 1949. Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics* 5, 99.
- Vendemiale, G., Grattagliano, I., Caraceni, P., Caraccio, G., Domenicalli, M., Dall'Agata, M., Trevisani, F., Guerrieri, F., Bernardi, M., Altomare, E., 2001. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology* 33, 808–815.
- Viganò, L., Arillo, A., Bagnasco, M., Bennicelli, C., Melodia, F., 1993. Xenobiotic metabolizing enzymes in uninduced and induced rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects of diets and food deprivation. *Comp. Biochem. Physiol.* 104C, 51–55.
- Vulliamy, T., Mason, P., Luzzatto, L., 1992. The molecular basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Trends Genet.* 4, 138–143.
- Winston, G.W., di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137–161.



*Cuando comencé el doctorado pensé que lo más importante eran los conocimientos que poseía y aquellos que llegaría a adquirir. Sin embargo, ahora que esta etapa de mi vida está a punto de finalizar, me doy cuenta de que aquello que jamás hubiera imaginado se ha convertido en lo realmente esencial para poder encontrarme en el punto en el que estoy. Es por ello, por lo que desde que mis dedos comenzaron a teclear las primeras letras de esta memoria, la única idea que rondaba mi mente, una y otra vez, era el momento en el que podría llegar a plasmar palabras de agradecimiento a todas aquellas personas que formaron parte de esta aventura. A las que recuerdo en estas palabras y aquellas que por mi habitual amnesia olvidé mencionar, gracias.*

*En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis, los Dres. Gabriel Cardenete, M<sup>ca</sup> Carmen Hidalgo y Amalia E. Morales, la oportunidad ofrecida para llevar a cabo mis estudios de doctorado, así como su importante labor en la realización de la presente tesis. Gracias Gabriel por brindarme la posibilidad de trabajar a tu lado desde el instante en el que aceptaste dirigir el proyecto de investigación de mi licenciatura, a partir del cual considero que inicié mi carrera investigadora en el "mundillo piscícola". Gracias también por esa magnífica fotografía que ha dado origen a la genial portada que da comienzo a esta memoria. A M<sup>ca</sup> Carmen, gracias por tu serenidad y ternura, por tu paciencia y tu comprensión, por la dulzura que has derrochado en cada momento de este largo camino, sin la cual habría sido mucho más difícil llegar a la meta. A Nani, por conocerme y entenderme, por estar a mi lado, apoyarme, dialogar y superar aquellos momentos en los que parecíamos no ponernos de acuerdo, ya que como en todas las familias lo único válido es el cariño y no podía ser de otra manera. A los tres, gracias por vuestra confianza y amistad.*

*A las Dras. Emilia Abellán, Alicia García y Marta Arizcun del IEO en Murcia, por formar parte de este proyecto y por su paciencia en el cuidado de los peces, sin cuya colaboración este trabajo no hubiera sido posible.*

*Al Dr. José M. Palma, por su inestimable ayuda en la interpretación de las imágenes electroforéticas, pero sobre todo gracias por tu amabilidad y paciencia.*

*A los Dres. Manuel de la Higuera, Manuel García, Laura García, Félix Hidalgo, Eugenio Martín y Ana Sanz, por su compañía y amistad a lo largo de todos estos años.*

*Al Dr. Aires Oliva-Teles, por ofrecerme la posibilidad de adquirir nuevos y fundamentales conocimientos sobre acuicultura y fisiología animal. Gracias por permitirme trabajar tres maravillosos meses de mi vida bajo su tutela, agraciándome con el fantástico regalo de descubrir un país lleno de dulzura y ternura, con gente tan encantadora como los Dres. Antonio Paulo, Natividad, Gouveia y tantos otros, dispuestos siempre a tenderte una mano amiga.*

*A los Dres. Stavros Chatzifotis, Nikos Papandroulakis y Dida Kokari, por ayudarme a descubrir mi capacidad de superación en las situaciones más difíciles y por dejarme crecer como persona en una isla casi desierta.*

*A José Antonio, nuestro por siempre secretario. Gracias por tu fundamental apoyo logístico, pero sobre todo anímico y personal, siempre dispuesto a regalar tanto un boli como una sonrisa.*

*A Manolo Martín, por no limitarse a ser un simple técnico de laboratorio. Gracias por tu curiosidad, por tu afán de aprender y ayudar, pero fundamentalmente, gracias por esa alegría, por tu ánimo, tu apoyo y tu cariño, por tener siempre un abrazo listo para ser regalado en los malos momentos, tesinianos y personales. Por todo ello y tantas cosas más, gracias por tu amistad.*

*A mis compañeros de departamento Ali, Rosa, Fernandito, Laura, José Ignacio, Ana, Caroline, Cristinilla, Francisco, Ángel, Eva y Sergio, que me han acompañado durante las distintas etapas de esta aventura.*

*A Ramón, por tantos desayunos juntos en la cafetería más "dicharachera" de Granada y por esas maravillosas fotografías de fantásticos ejemplares de dentones que adornan gran parte del capítulo introductorio de esta tesis.*

*A Manolillo Byte, por tu apoyo informático, pero sobre todo gracias por tu nobleza y constante disponibilidad para ayudarme siempre que lo he necesitado.*

*A Cristina, por ser un modelo a seguir, tanto académico como personal. Gracias por estar ahí y por ser como eres, por enseñarme tantas cosas, por ayudarme y escucharme siempre que lo he necesitado. Gracias por compartir divertidos momentos dentro del laboratorio y fuera de él, por ser compañera y amiga. Y por supuesto, no se me pueden olvidar las gracias por la original idea para la portada, si es que eres un genio!!!.*

*A Miriam, por su gran tirón en todos los sentidos. Nadie como tú para mostrarme lo realmente importante de la vida, por tu fortaleza, tu optimismo, tu transparencia y confianza. Gracias por animarme cuando estoy triste, por inyectarme alegría de vivir, por cantar conmigo aunque truene al día siguiente si con ello espantamos todos los males. Gracias por ser compañera de piso, de departamento, de fiestas y de vida.*

*A Estefanía, por sus constantes mensajes de cariño. Gracias por no abandonarme en los instantes más críticos y por hacerme sentir siempre acompañada, aunque me tendré que comprar un diccionario de lenguaje sms, q cd uz s ms empled utudrt.*

*A Sibilla, Nadia y Nuria, por formar parte de mis andanzas en estos últimos meses de redacción de la tesis.*

*A mis amigos en la distancia Dina, Gabriel, John, Maria, Marone, Miguel, Nonó, Paula, Rita y Simone, por mostrarme cuan acogedoras pueden ser las personas. Gracias por hacerme sentir como en casa a cientos de kilómetros de distancia.*

*A Zeza, por no dejarme sola ni un instante, por protegerme y mimarme en una situación en la que no todo el mundo sabe responder. Gracias por tan buenos momentos que pasamos juntas, por tus sanas locuras, por hacerme partícipe de tu vida, no lo olvido, juntas formamos una familia ibérica.*

*A Rui, Mizé y Filipe, por cuidarme desde el primer hasta el último día de mi estancia en Oporto. Gracias por estar en todo momento y sobre todo cuando más lo necesitaba. Jamás olvidaré vuestros tiernos cuidados, vuestros abrazos y toda la dulzura que desprendéis. Sois adorables.*

*A Tania y Catarina, por ser compañeras de viaje en mi aventura helénica. Una vez más, portuguesas al rescate!!. Sin vosotras la supervivencia en la isla habría sido casi imposible. Mil gracias de todo corazón.*

*A mis amigos navegantes Antonio Jesús, Fernando, Giovanna, Jesús, José Luis, Jou y Oscar, por compartir tantas horas solitarias en un mar de sueños.*

*A Toni (mi lechugueta verde) y Cely, por su apoyo desde los comienzos de mi doctorado. Gracias por ser tan bellísimas personas.*

*A Juancho, por la portada alternativa y por ayudarme con esos problemillas informáticos de última hora, estás hecho un crack.*

*A Xavi, por sus enseñanzas del lenguaje gallego, sin duda el mejor profesor particular que se puede tener. Gracias por tus ánimos, tu ternura y tu cariño. Always me too.*

*A Rafa, por ser un amigo incondicional, por tu confianza y apoyo, por creer siempre en mí. Siempre seguirás siendo mi lucecita.*

*A los Zingaros, José Miguel, Iván, Marco, Moisés, Carmen, Paquillo, JL, Juanito y Emilio por dejarme disfrutar de vuestra compañía, por haber sido parte de esta aventura, por vuestra paciencia, cariño y alegría. Gracias por compartir tantos años de buenos momentos que quedarán plasmados para siempre en mi memoria.*

*A mis amigas de siempre Aurora, Isa y Yolanda, por su constante empeño en convencerme que era capaz de llegar donde estoy. Gracias por vuestra alegría y confianza. Gracias Yolanda por esos recorridos "chinescos" en los que nos perdíamos durante horas hablando y riendo, olvidando nuestras preocupaciones y problemas. Mil gracias a mi Isis, por su aliento, por estar dispuesta siempre a tenderme su mano amiga, por ser cómplice de mis locuras, por conocerme, por estar siempre a mi lado, por no dejarme caer y conducirme por estos caminos de la vida, literalmente también :), eres una segunda hermana para mí. Gracias a las tres por vuestra amistad.*

*A mi Burundi particular, por descubrirme tantos parajes desconocidos, tanta belleza escondida. Gracias Juan Carlos por tu dulzura, tus abrazos en los momentos justos, tu caminar a mi lado desde el momento en que nos cruzamos y tu "temerura galega".*

*A José Luis (cocoaguagua), mi cuñaillo favorito, y no es porque no tenga otro, es que es verdad jajaja. Gracias por tu amistad, por tu infinita paciencia cada domingo a la hora de comer, por tu comprensión y apoyo constante durante esta etapa de mi vida.*

*A mi hermana Eli, a la que quiero con locura, gracias por ser parte de mi vida, por estar pendiente de tu hermanilla chica, por preocuparte, protegerme y cuidarme siempre. Te deseo todo lo mejor y nunca olvides que tú eres lo más importante.*

*Por último y porque son la esencia de este trabajo, a mi madre y mi padre, porque no sólo me dieron la vida, sino porque son mi vida, porque sin ellos nada tendría sentido y nada sería como es. Lo que soy es porque vosotros lo habéis hecho posible. Simplemente gracias.*

*Probablemente la palabra más frecuente en este trabajo no será la palabra dentón, sino la repetidamente utilizada palabra gracias, una y mil veces, gracias a todos.*





*A mis padres*

*A mi hermana*



# ÍNDICE

---

<b>I- OBJETO / OBJECTIVES</b> .....	1
1. OBJETO .....	3
2. OBJECTIVES .....	7
<b>II- INTRODUCCIÓN</b> .....	11
1. BIOLOGÍA DEL DENTÓN .....	13
1.1. Generalidades .....	13
1.2. Situación actual y perspectivas de futuro .....	17
1.3. Estudios en cautividad .....	18
2. ASPECTOS GENERALES DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO EN PECES	21
2.1. Metabolismo de los hidratos de carbono .....	23
2.2. Metabolismo proteico .....	26
2.3. Metabolismo lipídico .....	27
3. ASPECTOS GENERALES DEL METABOLISMO DE AGENTES OXIDANTES EN PECES .....	30
3.1. Radicales libres y especies reactivas .....	30
3.2. Mecanismos de defensa .....	33
3.2.1. <i>Defensas antioxidantes primarias</i> .....	34
3.2.2. <i>Defensas antioxidantes secundarias</i> .....	38
3.3. Efectos de los radicales libres y las especies reactivas .....	39
3.3.1. <i>Estado redox y estrés oxidativo</i> .....	39
3.3.2. <i>Daño oxidativo a las principales biomoléculas</i> .....	40

<b>III- MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	45
1. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	47
1.1. Dietas experimentales .....	47
1.1.1. <i>Formulación</i> .....	47
1.1.2. <i>Elaboración</i> .....	49
1.2. Procedimiento experimental .....	50
1.2.1. <i>Control de peso e ingesta</i> .....	50
1.2.2. <i>Toma y procesamiento de muestras</i> .....	50
2. ÍNDICES BIOLÓGICOS .....	53
2.1. Crecimiento y eficacia del alimento .....	53
2.2. Utilización digestiva .....	54
2.3. Utilización de la proteína y los lípidos .....	54
2.4. Índices biométricos .....	56
2.5. Índices hematológicos .....	56
3. MÉTODOS ANALÍTICOS .....	57
3.1. Análisis de composición y determinación del contenido en cromo .....	57
3.2. Parámetros e índices hematológicos .....	57
3.3. Determinación de metabolitos plasmáticos .....	57
3.4. Contenido en proteínas solubles .....	57
3.5. Determinación de glucógeno y lípidos tisulares .....	58
3.6. Determinación de la actividad de enzimas del metabolismo intermediario .....	58
3.7. Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes .....	58
3.8. Indicadores de daño oxidativo .....	60
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	60

<b>IV- BLOQUES EXPERIMENTALES .....</b>	<b>61</b>
1. BLOQUE EXPERIMENTAL IV-1. Empleo de niveles crecientes de vitamina C en dietas para dentón: efectos sobre el crecimiento, utilización nutritiva, metabolismo y estado redox .....	63
1.1. Revisión bibliográfica .....	63
1.2. Diseño experimental .....	71
1.2.1. <i>Dietas experimentales y alimentación</i> .....	71
1.2.2. <i>Animales y mantenimiento</i> .....	71
1.2.3. <i>Toma de muestras, parámetros calculados y análisis realizados</i> .....	73
1.3. Resultados .....	74
1.3.1. <i>Crecimiento e índices biométricos</i> .....	74
1.3.2. <i>Ingesta, utilización nutritiva del alimento y supervivencia</i> .....	75
1.3.3. <i>Composición corporal</i> .....	76
1.3.4. <i>Metabolismo intermediario</i> .....	77
1.3.5. <i>Estado redox</i> .....	79
1.3.6. <i>Patrón isoenzimático de la SOD</i> .....	80
1.4. Discusión .....	81
1.5. Conclusiones .....	100
1.6. Conclusions .....	101

2. BLOQUE EXPERIMENTAL IV-2. Inclusión de distintos tipos y niveles de hidratos de carbono en dietas para dentón: influencia sobre el crecimiento, utilización nutritiva, metabolismo y estado redox .....	103
2.1. Revisión bibliográfica .....	103
2.2. Diseño experimental .....	112
2.2.1. <i>Dietas experimentales y alimentación</i> .....	112
2.2.2. <i>Animales y mantenimiento</i> .....	112
2.2.3. <i>Toma de muestras, parámetros calculados y análisis realizados</i> .....	114
2.3. Resultados .....	116
2.3.1. <i>Crecimiento e índices biométricos</i> .....	116
2.3.2. <i>Ingesta, utilización nutritiva del alimento y supervivencia</i> .....	117
2.3.3. <i>Coeficientes de digestibilidad aparente</i> .....	118
2.3.4. <i>Composición corporal</i> .....	119
2.3.5. <i>Contenido en glucógeno y lípidos en hígado y músculo blanco</i> .....	120
2.3.6. <i>Metabolitos plasmáticos</i> .....	121
2.3.7. <i>Metabolismo intermediario</i> .....	122
2.3.8. <i>Estado redox</i> .....	129
2.3.9. <i>Patrón isoenzimático de la SOD</i> .....	132
2.4. Discusión .....	133
2.5. Conclusiones .....	146
2.6. Conclusions .....	147

3. BLOQUE EXPERIMENTAL IV-3. Formulación dietaria con distintas combinaciones de macronutrientes para dentón: consecuencias sobre el crecimiento, utilización nutritiva, metabolismo y estado redox .....	149
3.1. Revisión bibliográfica .....	149
3.2. Diseño experimental .....	157
3.2.1. <i>Dietas experimentales y alimentación</i> .....	157
3.2.2. <i>Animales y mantenimiento</i> .....	157
3.2.3. <i>Toma de muestras, parámetros calculados y análisis realizados</i> .....	159
3.3. Resultados .....	161
3.3.1. <i>Crecimiento e índices biométricos</i> .....	162
3.3.2. <i>Ingesta, utilización nutritiva del alimento y supervivencia</i> .....	163
3.3.3. <i>Coeficientes de digestibilidad aparente</i> .....	164
3.3.4. <i>Composición corporal</i> .....	164
3.3.5. <i>Contenido en glucógeno y lípidos en hígado y músculo blanco</i> .....	165
3.3.6. <i>Constantes eritrocitarias</i> .....	166
3.3.7. <i>Metabolitos plasmáticos</i> .....	168
3.3.8. <i>Metabolismo intermediario</i> .....	173
3.3.9. <i>Estado redox</i> .....	177
3.3.10. <i>Patrón isoenzimático de la SOD</i> .....	179
3.4. Discusión .....	194
3.5. Conclusiones .....	195
3.6. Conclusions .....	194



4. BLOQUE EXPERIMENTAL IV-4. Respuesta metabólica en dentones sometidos a ayuno prolongado y posterior realimentación .....	197
4.1. Revisión bibliográfica .....	197
4.2. Diseño experimental .....	204
4.2.1. <i>Dietas experimentales y alimentación</i> .....	204
4.2.2. <i>Animales y mantenimiento</i> .....	204
4.2.3. <i>Toma de muestras, parámetros calculados y análisis realizados</i> .....	205
4.3. Resultados .....	207
4.3.1. <i>Ingesta, eficacia del alimento, crecimiento y supervivencia</i> .....	207
4.3.2. <i>Índices biométricos</i> .....	207
4.3.3. <i>Constantes eritrocitarias</i> .....	208
4.3.4. <i>Metabolitos plasmáticos</i> .....	209
4.3.5. <i>Contenido en proteína, glucógeno y lípidos en hígado y músculo blanco</i> .....	209
4.3.6. <i>Metabolismo intermediario</i> .....	211
4.3.7. <i>Estado redox</i> .....	216
4.3.8. <i>Patrón isoenzimático de la SOD</i> .....	220
4.4. Discusión .....	221
4.4.1. <i>Ayuno</i> .....	221
4.4.2. <i>Realimentación</i> .....	239
4.5. Conclusiones .....	248
4.6. Conclusions .....	249

<b>V- RESUMEN Y CONCLUSIÓN FINAL / SUMMARY AND FINAL CONCLUSION .....</b>	<b>251</b>
1. Resumen .....	253
2. Summary .....	259
3. Conclusión final .....	263
4. Final conclusions .....	263
<b>VI- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>265</b>
<b>VII- ANEXOS .....</b>	<b>303</b>
1. Anexo I: Métodos analíticos .....	305
2. Anexo II: Índice de abreviaturas .....	349



I- OBJETO  
I- OBJECTIVES





## **1. OBJETO**

No es nuevo el hecho de la necesidad del desarrollo de la acuicultura, a tenor de la demanda, cada vez mayor, de productos acuícolas y el consecuente agotamiento de las especies objeto de pesca en los últimos años. Esta no es una situación que nos quede lejos, ya que Europa es el principal consumidor mundial de pescado, siendo el abastecimiento pesquero insuficiente y acudiéndose, cada vez más, a los productos propios de la acuicultura, recurriendo, en muchos casos, a la importación. Por otra parte, el mercado muestra signos de saturación en cuanto a las especies piscícolas clásicas de la acuicultura marina (dorada y lubina), demandándose, por parte del consumidor, una mayor variedad de productos que satisfagan todos los gustos.

El dentón es una de las especies que podría cubrir, en parte, la necesidad de diversificación de la piscicultura. Es un espárido con una tasa de crecimiento comparable a la de la dorada, y cuya carne es muy apreciada en las zonas donde se pesca. Es una especie que se reproduce bien en cautividad, habiéndose completado su ciclo, de manera que parece viable su cultivo intensivo. Ahora bien, no hay que olvidar que para que un cultivo acuícola sea exitoso hay que conocer bien las necesidades nutricionales y la fisiología de la especie en cuestión y, a partir de este conocimiento, conseguir formular piensos lo más equilibrados posible, tanto para minimizar las pérdidas al ambiente, como para abaratar la alimentación, ya que ésta supone uno de los gastos más importantes de este tipo de cultivos. El conocimiento de las necesidades nutricionales de una especie debe abarcar tanto micro como macronutrientes, su cantidad y/o calidad, las relaciones entre ellos, así como las repercusiones metabólicas de estos escenarios nutritivos.

Estos planteamientos han justificado la realización de estudios anteriores de aproximación al conocimiento de las necesidades nutritivas de esta especie, muchos de ellos realizados en el ámbito de nuestro grupo de investigación. Estos estudios han sentado las bases nutricionales que permiten abordar aspectos más particulares relacionados con la correcta alimentación y mantenimiento de estos animales.

Uno de los micronutrientes necesarios en un pienso formulado para dentón es la vitamina C, ya que la mayoría de los peces son incapaces de sintetizarla. Se han realizado numerosos trabajos sobre necesidades de vitamina C en otras especies, estableciéndose así la cantidad adecuada que se debe añadir a la dieta para un máximo crecimiento y un desarrollo adecuado del pez. No obstante, las necesidades establecidas para una determinada especie no deben ser extrapoladas al resto, ya que, entre otros factores, el interespecífico va a condicionar las necesidades de vitamina C de un animal. Por ello, en este trabajo planteamos conocer una aproximación a la cantidad de vitamina C adecuada para obtener un buen crecimiento y desarrollo del pez, así como para evitar repercusiones negativas en el metabolismo intermediario del dentón. No hay que olvidar, además, que la vitamina C es un importante antioxidante y, por tanto, su carencia o baja disponibilidad podría alterar el equilibrio redox del animal. Habría que considerar además, que una ingesta excesiva de esta vitamina podría actuar como un agente prooxidante.

Por lo que respecta a los macronutrientes de un pienso para peces, la proteína es el componente más caro, por su elevado precio y su abundancia, especialmente en el caso de las especies carnívoras. Esto ha motivado que desde hace tiempo se venga investigando la posibilidad de sustituir parcialmente la proteína por otros macronutrientes, ya sean lípidos o hidratos de carbono. El balance adecuado de los macronutrientes optimiza la utilización del alimento. Así, se evitaría que la proteína se use con fines energéticos.

En este trabajo se ensayan distintas combinaciones de los tres macronutrientes en dietas isoenergéticas. Se efectúa una evaluación global que incluye no sólo el crecimiento y la utilización nutritiva del alimento, sino también su utilización metabólica. Además, puesto que cualquier desequilibrio nutricional puede llevar a una situación metabólica prooxidante, se estudia la respuesta de las enzimas antioxidantes y se valoran los posibles daños oxidativos generados.

Por otra parte, se suele considerar que los peces carnívoros utilizan mal los hidratos de carbono, si bien es necesario determinar a qué niveles comienzan a hacer mal uso de este macronutriente y cómo el tipo de carbohidrato afecta su utilización, y por ende, el rendimiento del alimento. Ésta es la razón por la que en esta memoria se aborda el estudio de la utilización de tres carbohidratos distintos, a tres niveles de inclusión, profundizando así en las repercusiones de su uso en el metabolismo intermediario y en el estado redox del dentón.

El cultivo intensivo de una especie lleva consigo el empleo de una serie de maniobras propias del mismo. Una de ellas es el ayuno de los peces, durante un tiempo más o menos prolongado, en relación con cambios ambientales, clasificación, transporte, etc., e incluso como estrategia para mejorar la calidad del producto que llega al mercado. Es por ello que en esta memoria se estudian las repercusiones metabólicas y sobre el balance redox de dentones sometidos a un proceso de ayuno y posterior realimentación.

El conjunto de ensayos que componen esta memoria suponen una profundización en el conocimiento de distintos aspectos nutricionales y metabólicos del dentón y aportan información sobre parcelas esenciales que podrían repercutir en una mejora de su cultivo.





## **2. OBJECTIVES**

The necessity of expanding aquaculture is not a new fact, given the increasing demand of aquatic products, and the consequent exhaustion of the fishing resources in the last years. This is an important challenge for us, since Europe is the main world-wide fish consumer, being the fishing provision insufficient, resorting, more and more, to the own products of the aquaculture, and even to the importation. On the other hand, market shows signs of saturation as for the classical species of the marine aquaculture (sea bream and sea bass), being demanded a greater variety of products by the consumer.

Common dentex is one of the species that would be able to cover, in part, these diversification needs of fish farming. It is a sparid with a comparable growth rate to that observed in sea bream, and whose meat is highly appreciated in places where it is fished. It is reproduced well in captivity, and its life cycle is completed, so that its intensive production seems viable. However, for a successful aquatic production we need to know the nutritional requirements and the physiology of the species; from this knowledge, it would be possible to formulate balanced feeds, as to minimize the losses to the environment, as to reduce the feeding cost, since this supposes one of the most important expenses of this type of productions. The knowledge about nutritional requirements of a species must include both micro and macronutrients, its quantity and/or quality, the relations among them, as well as the metabolic repercussions of these nutritive scenes.

These approaches have justified the accomplishment of previous studies on the nutritional requirements of this species; many of them carried out in the scope of our research group. These studies have established the nutritional bases that allow us to approach to more particular aspects related to the right feeding and maintenance of these animals.

Vitamin C is among the needed micronutrients in a formulated diet for common dentex, since most fish are not able to synthesize it. Numerous studies on vitamin C requirements have been carried out in other fish species, being established the adequate quantity to be added to the diet for a maximum growth and a suitable development of

fish. Nevertheless, the established requirements for a specific species should not be extrapolated to the rest since, among others factors, the interspecific particularities determine the vitamin C needs of an animal.

For that reason, in this study we consider the possibility to know an approach of the vitamin C quantity adequate to obtain a right growth performance and fish development, as well as to avoid negative repercussions in the intermediary metabolism of common dentex. In addition, it must be take account that vitamin C is an important antioxidant and, therefore, its deficiency or low availability could alter the animal equilibrium redox. It would be necessary to consider in addition, that an excessive ingestion of this vitamin could act as a prooxidat agent.

Regarding the macronutrients of a fish diet, the protein is the most expensive component, due to its high price and inclusion level, especially in diets for carnivorous species. For this reason, the possibility of replacing partially the protein by other macronutrients, lipids or carbohydrates, have been investigating for a long time. The suitable macronutrients balance optimizes the use of the food, avoiding protein use as energy source.

In this study, isoenergetics diets with different combinations of the three macronutrientes are tested. A global evaluation is performed, including not only growth performance and nutritional food utilization, but also its metabolic use. Besides, since any nutritional imbalance can produce a prooxidant metabolic situation, the antioxidant enzymes response and the possible oxidative damage are valued.

On the other hand, it is usually considered that carnivorous fish do not use properly the dietary carbohydrates, though it is necessary to determine the upper limit of inclusion of this macronutrient and how carbohydrate source can affect its utilization, and therefore, food efficiency. This is why in the present memory the use of three different carbohydrates, at three dietary inclusion levels is evaluated, deepening thus in the possible repercussions on intermediary metabolism and redox state of common dentex.

As in the wild, cultured fish may experience periods of food deprivation due to environmental changes. In addition, routine aquaculture procedures may involve fasting of fish for classification, transport, etc. and even as a strategy to improve the product quality. It is for that reason that in this memory the metabolic profile repercussions and redox balance of common dentex subjected to prolonged starvation process and subsequent refeeding are evaluated.

The trials that compose this memory suppose a deepening in the knowledge of different metabolic and nutritional aspects of common dentex and contribute to obtain information on essential areas that would result in an improvement of its culture.



## II- INTRODUCCIÓN





# 1. BIOLOGÍA DEL DENTÓN

## 1.1. GENERALIDADES

El dentón común es un teleósteo perteneciente a la familia de los espáridos, dentro del orden perciformes. Aunque, originalmente, recibió distintos nombres científicos, oficialmente en la actualidad es el de *Dentex dentex* (Linnaeus, 1758). Su código taxonómico es 1703906006 y entre sus nombres comunes encontramos una gran diversidad, dependiendo de la zona en la que nos encontremos. En España, puede nombrarse como dentón, dentol, lama o sama de ley.

Las principales características morfológicas del dentón, según Lozano-Rey (1930) y Bauchot y Hureau (1986), son las siguientes: cuerpo robusto, oval, alto y comprimido lateralmente. Posee una cabeza maciza, con un perfil dorsal ligeramente redondeado en los adultos, pero casi rectilíneo en los individuos jóvenes. Los machos adultos poseen un notable abultamiento cefálico. Sus mejillas son escamosas (escamas pectinadas), al igual que su preopérculo, excepto en su margen posterior. Sus ojos son pequeños en relación a su corpulencia, característica que nos permite distinguirlo de otras especies del género *Dentex*. El espacio suborbital es ancho y su iris amarillo.



La boca está situada en posición basal, siendo ligeramente oblicua y con labios gruesos.



Sus mandíbulas poseen varias filas de dientes caniformes bien desarrollados, los más externos y visibles (entre 4 y 6 piezas) son largos y afilados, encontrando tras de ellos otros más pequeños pero de características similares. Estos dientes cumplen una misión muy concreta, capturar y retener a las presas de las que se alimenta, en muchos casos ágiles pececillos que escaparían de una boca roma y masticadora como la de la dorada.



Posee una única aleta dorsal con 11 radios duros y de 11 a 12 radios blandos. Los primeros radios son de tamaño progresivamente mayor hasta el 4º-5º, tras los cuales la longitud va decreciendo. Las aletas pectorales son largas y afiladas. Las aletas pelvianas tienen un radio duro y varios radios blandos. La aleta anal posee 3 radios duros anteriores y de 7 a 9 radios blandos posteriores. La aleta caudal está bifurcada en dos lóbulos agudos con forma de media luna. Sus escamas ctenoideas son fuertes y bien visibles. Posee una línea lateral fuertemente arqueada que sigue el perfil de la dorsal, compuesta por entre 62 y 68 escamas.



La coloración del cuerpo es gris plateada iridiscente en los individuos jóvenes, con manchas oscuras en el dorso, sobre todo por encima de la línea lateral. Su coloración se vuelve rosada con la madurez sexual, tornando a azul grisácea iridiscente en los individuos adultos, momento en el que las manchas oscuras del dorso se vuelven más o menos difusas, llegando incluso a desaparecer con la edad. Los especímenes más viejos y grandes, de alrededor de un metro, tienden a adquirir una coloración rojizo pálido uniformemente distribuida. Algunos individuos presentan una mancha de color rojo vino debajo de los últimos radios dorsales y una mancha amarillenta por detrás de la boca y en el opérculo. Posee una mancha azul oscura en la axila de cada aleta pectoral. Las aletas dorsal y caudal son pardo rosadas, las ventrales y anal amarillentas, y las pectorales rosadas.

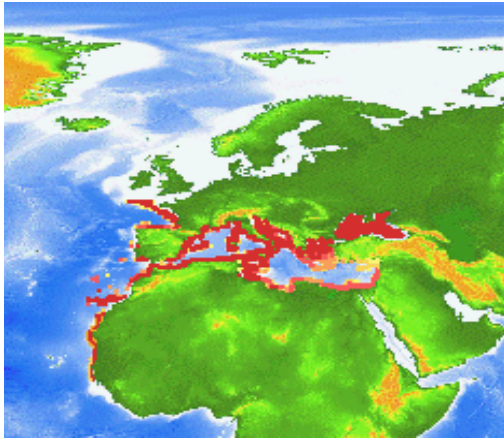


Figura II-1. Distribución geográfica del dentón.

Geográficamente, el dentón se puede localizar entre las latitudes  $60^{\circ}\text{N}$  y  $15^{\circ}\text{N}$ , aunque esta situación varía en los primeros estadios de su desarrollo, localizándose preferentemente entre los  $49^{\circ}\text{N}$  y  $11^{\circ}\text{N}$  (Figura II-1). Comúnmente, según indican Bauchot y Hureau (1986) y Ramos-Esplá y Bayle-Sempere (1991), se encuentra en el mar Mediterráneo, fundamentalmente en España y el Norte de África (al sur del

paralelo  $40^{\circ}\text{N}$ ), donde las poblaciones son numerosas y estables. Raramente se encuentra en el mar Negro. También se localiza en el Atlántico, en el área comprendida desde el Golfo de Vizcaya hasta Cabo Blanco, incluyendo las Islas Canarias y Madeira. En escasas ocasiones aparece alrededor de las Islas Británicas, al sur de Mauritania y excepcionalmente en Senegal.

En cuanto a su hábitat, el dentón se caracteriza por ser demersal. Los adultos son solitarios y viven en la proximidad de la costa, preferiblemente sobre fondos rocosos y escarpados, sobre todo en invierno, aunque también pueden encontrarse sobre fondos más superficiales, arenosos, fangosos y praderas de *Posidonia oceánica*, durante la primavera y el verano. Los dentones en estado juvenil prefieren estos últimos sustratos, pero su carácter, al contrario que el de los adultos, es gregario. Las profundidades habituales en las que los podemos encontrar son entre los 15 y los 50 metros, sin embargo, el dentón puede habitar cotas superiores (menos de 10 m) y muy inferiores (200 m) cuando las condiciones del mar lo permiten.

El dentón es un predador voraz, aunque su patrón de alimentación varía a lo largo del año y de su ciclo de vida. Así, según Abdelkader y Ktari (1985), la tasa de alimentación se incrementa en los meses de Abril y Mayo, coincidiendo con el período reproductivo, mientras que se reduce entre Septiembre y Febrero. Durante la fase juvenil se alimenta principalmente de peces (60-65%) y crustáceos (25-30%), constituyendo los cefalópodos y las plantas marinas (*Posidonia oceánica*) una parte minoritaria de su dieta. Sin embargo, esta preferencia alimenticia de crustáceos sobre cefalópodos cambia en los individuos adultos (Tortonese, 1975; Abdelkader y Ktari, 1985; Ramos-Esplá y

Bayle-Sempere, 1991; Morales-Nin y Moranta, 1997). Las presas de los dentones incluyen una amplia variedad de especies, probablemente dependiendo de su disponibilidad en el medio (Morales-Nin y Moranta, 1997).

El peso máximo registrado es de 14.3 kg y la longitud máxima de 100 cm (LT), aunque los principales tamaños de captura oscilan entre 35 y 40 cm de longitud (Soljan y Ribe, 1965; Bauchot y Hureau, 1986; Ramos-Esplá y Bayle-Sempere, 1991). La edad máxima que puede alcanzar parece ser de aproximadamente 20 años (Morales-Nin y Moranta, 1997). En general, el crecimiento de los individuos es rápido durante los dos primeros años, llegando a alcanzar 24 cm en el primer año de vida (Lo Bianco, 1909; Morales-Nin y Moranta, 1997).

En lo que respecta al conocimiento de la biología reproductiva del dentón, es limitado y controvertido. Así, esta especie fue considerada inicialmente como gonocórica (D'Ancona, 1950), y aunque este hecho fue discutido por otros autores (Tortonese, 1975; Bauchot y Hureau, 1986; Glamuzina et al., 1989; Méndez et al., 1995), que indicaron el posible hermafroditismo proterándrico de la especie, estudios más recientes (Riera et al., 1995; Morales-Nin y Moranta, 1997; Abellán, 2000; Loir et al., 2001) confirmaron la primera hipótesis.

La relación sexual de la especie parece ser 1:1 (Morales-Nin y Moranta, 1997). La madurez sexual de los individuos tiene lugar entre los dos y cuatro años de edad, de forma que los primeros machos y hembras sexualmente maduros pesan una media de 692 g y 443 g, respectivamente, mientras que el 50% de los machos y las hembras llegan a ser sexualmente maduros cuando pesan 1,960 g y 563 g, respectivamente (D'Ancona, 1950; Morales-Nin y Moranta, 1997).

El período reproductivo del dentón en estado salvaje tiene lugar durante el segundo cuatrimestre del año, entre marzo y julio (Lo Bianco, 1909; Bini, 1968; Bauchot y Hureau, 1986; Morales-Nin y Moranta, 1997). Las observaciones realizadas en cautividad confirman este hecho (Glamuzina et al., 1989; Riera et al., 1993; Abellán et al., 1997). No hay datos disponibles en cuanto a tasas de fertilidad y desarrollo de huevos y larvas en el estado salvaje, ya que estos parámetros sólo han sido estudiados bajo condiciones experimentales.

## 1.2. SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

Desde el punto de vista comercial, el dentón es una especie muy valorada por los consumidores, debido a la excelente textura y sabor de su carne. Los datos de captura a nivel mundial han oscilado a lo largo de los años (Figura II-2). En la última década, según datos proporcionados por la FAO (2007), las capturas de dentón han descendido considerablemente.

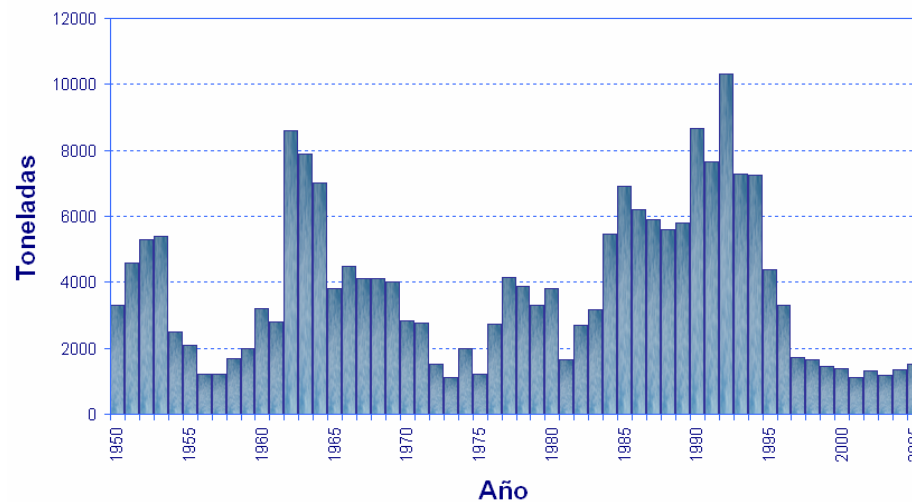


Figura II-2. Evolución temporal en la captura mundial del dentón.

El dentón es uno de los espáridos más apreciados y menos abundantes en los mercados, además de tener una presencia en éstos, estacionalmente inestable. Junto a este hecho, adicionalmente se encuentra la necesidad de diversificación de las especies cultivadas en el Mediterráneo, especialmente a través de especies autóctonas valiosas cuyos ciclos biológicos sean adaptables a las técnicas de cultivo ya existentes (Stephanis y Divanach, 1993). Por todo ello, desde los primeros informes el dentón se presenta como uno de los candidatos más apropiados para llevar a cabo dicha diversificación. No en vano, desde que se inició su cultivo ha alcanzado un considerable nivel de desarrollo en ciertos países mediterráneos (Basurco y Abellán, 1999). Sin embargo, para que su cultivo a gran escala pueda llegar a ser rentable, aún existen diversos obstáculos que deben ser superados, fundamentalmente a nivel nutricional en larvas y juveniles, por lo que se hace necesario diseñar una alimentación específica para la especie en cada una de las fases de su ciclo vital.

### 1.3. ESTUDIOS EN CAUTIVIDAD

Cuando se plantea la introducción de una nueva especie para su cultivo, es necesario conocer las posibilidades de mantener un stock de individuos en cautividad que no sólo sean capaces de sobrevivir, sino también de crecer mediante una alimentación artificial, así como de llegar a reproducirse en esas condiciones, lo que permitiría cerrar el ciclo de vida de la especie.

Los datos de los estudios referentes a la biología reproductiva del dentón muestran que, en cautividad, la diferenciación sexual tiene lugar entre el quinto y duodécimo mes de vida ( $\approx 70$  g), aunque la primera puesta no ocurre hasta los dos años de edad ( $\approx 923$  g) (Riera et al., 1993; Abellán et al., 1997; Abellán, 2000; Pavlidis et al., 2000a,b; Grau et al., 2001; Loir et al., 2001). La fase de maduración de los oocitos tiene lugar entre febrero y marzo y el período de puesta entre marzo y finales de junio (Abellán et al., 1997; Abellán, 2000; Pavlidis et al., 2000b; Loir et al., 2001) bajo condiciones de temperatura que varían entre 15 y 25 °C (Méndez et al., 1995; Pastor et al., 1995; Abellán et al., 1997). Los datos de fecundidad y viabilidad de los huevos son muy variables dependiendo de los autores (Glamuzina et al., 1989; Abellán et al., 1997; Loir et al., 2001; Pavlidis et al., 2004). Los huevos de dentón son pelágicos, flotantes y transparentes. Su diámetro oscila entre 938 y 1.089  $\mu\text{m}$ , pudiendo ser recogidos, cuando se encuentran fecundados, mediante el empleo de colectores provistos de una malla de 500  $\mu\text{m}$ , ubicados en el rebosadero de los estanques (Abellán, 2000; Rueda y Martínez, 2001). Los huevos no fecundados se hunden. El tiempo de incubación oscila entre 56 y 81 h, para una temperatura óptima que parece estar entre los 16 y 18 °C (Abellán, 2000; Saka et al., 2004).

En cuanto al desarrollo larvario, ha sido extensamente estudiado por muchos autores (Glamuzina et al., 1989; Franicevic, 1991; Pastor et al., 1995; Abellán et al., 1997; Crespo et al., 2001; Santamaría et al., 2001; Arizcun, 2003; Firat et al., 2003). Las larvas recién eclosionadas son planctónicas y transparentes, con un tamaño que oscila entre los 2.17 mm y 2.61 mm a 17-18 °C (Abellán, 2000). Las fases de su desarrollo se pueden concretar en las cuatro etapas descritas en la Figura II-3. Un factor crítico durante las primeras etapas del desarrollo larvario se encuentra relacionado con el adecuado suministro de ácidos grasos esenciales requeridos para suplir las necesidades

producidas por la alta tasa de crecimiento de esta especie (Tulli y Tibaldi, 1997; Mourente et al., 1999a,b). Entre las principales consecuencias de una inadecuada alimentación en esta fase se pueden encontrar bajas tasas de supervivencia, defectos en el sistema digestivo, lordosis, vejiga natatoria no funcional, atrofia de la aleta caudal, granulomatosis sistémica, etc. (Sweetman, 1992; Bibiloni et al., 1993; Riera et al., 1993; Pastor et al., 1995; Abellán et al., 1997; Koumoundouros et al., 1999, 2001; Crespo et al., 2001).

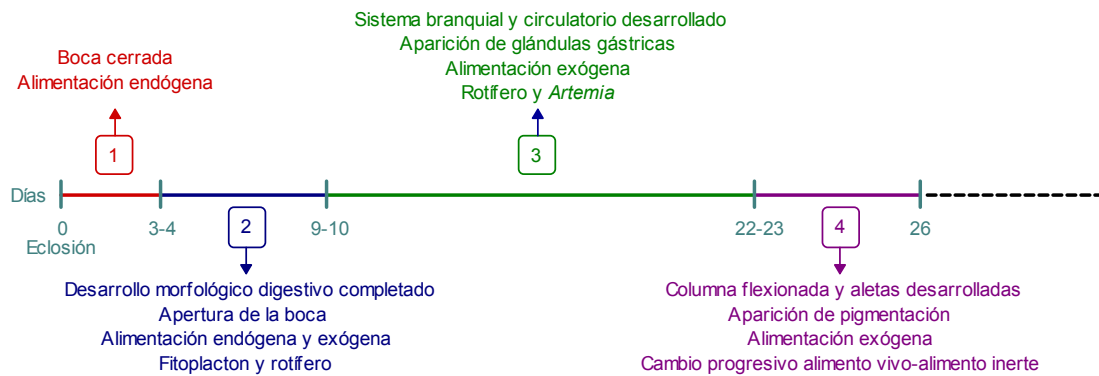


Figura II-3. Fases de desarrollo de larvas de dentón.

La fase de pre-engorde dura desde el día 50 hasta el 90 aproximadamente, momento en el que los individuos alcanzan aproximadamente 6 g (Abellán, 2000), comenzando la fase de engorde, que puede realizarse tanto en tanques como en jaulas. Las tasas de crecimiento del dentón en cautividad son superiores a las que encontramos en el medio natural. Se han logrado engordar dentones hasta 830 g en 20 meses de cultivo en jaulas, mientras que en la naturaleza un dentón en ese periodo alcanzaría unos 320 g (Riera et al., 1993). Además, la tasa de crecimiento de esta especie es superior a la de otras especies marinas cultivadas como pueden ser la dorada y la lubina, mantenidas bajo las mismas condiciones de dietas experimentales y temperatura. Sin embargo, las experiencias industriales realizadas a pequeña escala ponen de manifiesto que aún hay que desarrollar técnicas apropiadas para su cultivo, ya que los conocimientos acerca de las condiciones óptimas de cultivo de la especie durante el pre-engorde y engorde son todavía insuficientes, fundamentalmente en lo que se refiere a los requerimientos nutricionales específicos en estas etapas. Por esta razón, la mayor parte del esfuerzo en la investigación de esta especie se centra en la resolución de ese problema, de forma que una vez superado, el principal objetivo será la perfección de las técnicas de engorde (Ruiz-Carrera, 2004).

En los experimentos de crecimiento realizados inicialmente durante las fases de pre-engorde y engorde, los dentones se alimentaron con piensos húmedos y semi-húmedos (restos de pescado y calamares complementados con aceite y harina de pescado) obteniendo resultados de tasas de crecimiento muy buenas (Riera et al., 1993). Posteriormente se emplearon piensos comerciales para otras especies (secos y granulados), realizando ensayos comparativos con piensos húmedos y semi-húmedos. Los resultados fueron variables, aunque muy alentadores. Las tasas de crecimiento fueron buenas en el caso de los piensos comerciales, aunque mayores para los piensos húmedos y semi-húmedos. Los índices de conversión del alimento obtenidos en todos los estudios fueron mejores para los piensos comerciales (alimento seco), aunque con elevadas tasas de mortalidad (30-40%) (Efthimiou et al., 1994; Riera et al., 1995; Cardenete et al., 1997a).

De cualquier modo, la progresión lógica en la consecución de alimentación de una nueva especie en acuicultura pasa por establecer una alimentación específica para suplir todas las necesidades nutricionales de la especie. Por este motivo, los estudios posteriores que podemos encontrar utilizan dietas muy diversas para la alimentación del dentón, combinando distintos niveles de proteína, lípidos y niveles energéticos (Tibaldi et al., 1996; Cardenete et al., 1997b; Company et al., 1999a; Jover et al., 1999; Espinós et al., 2003; Skalli et al., 2004). En estos estudios se consiguió reducir la tasa de mortalidad hasta valores del 5-10%, y, además, se demostró que en juveniles de dentón un aumento del contenido lipídico promueve un efecto de ahorro proteico con fines plásticos en lugar de energéticos, con lo que los niveles de proteína incluidos en la dieta podrían reducirse hasta un 45% (12% lípidos y 22 g MJ<sup>-1</sup> P/E) sin que se vean afectados los parámetros de crecimiento o utilización del alimento (Tibaldi et al., 1996; Company et al., 1999a; Skalli et al., 2004). Otra alternativa, quizás más económica y sostenible, para la consecución de este mismo fin, sería el empleo de hidratos de carbono como fuente complementaria de energía. Esta posibilidad apenas ha sido investigada, aunque, como datos preliminares, en general se obtuvieron buenos resultados mediante el empleo de dextrina en dietas para juveniles de dentón (Skalli, 2001). Así, un incremento gradual del contenido en dextrina, de 10% hasta 22% (53% proteína y 20 kJ g<sup>-1</sup> de energía), produjo un ligero decremento en la digestibilidad de la materia orgánica y en la energía, pero no se produjeron cambios en la tasa de crecimiento y en el uso de la dieta.

Por último, destacar que las tasas de mortalidad observadas en la fase juvenil, no sólo pueden deberse a una formulación inadecuada de los piensos, sino también, a procesos infecciosos (Company et al., 1999b). Por ello, se han realizado ensayos para fortalecer el sistema inmune de los juveniles de dentón, mediante el uso de inmunoestimulantes como  $\beta$ -1,3/1,6 glucanos (Efthimiou, 1996) y agentes probióticos como *Bacillus toyoi* y *Bacillus cereus* (Hidalgo et al., 2006), suministrados en el alimento.

## **2. ASPECTOS GENERALES DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO EN PECES**

Desde un punto de vista general, la maquinaria metabólica de los peces es similar a la de los animales terrestres (Hochachka y Mommsen, 1995; Hochachka y Somero, 2002). Sin embargo, existen algunas diferencias importantes entre ambos grupos, basadas fundamentalmente en la forma en la que regulan su metabolismo intermediario, en la sensibilidad a los factores bióticos y abióticos y en el papel concreto de los distintos tejidos (Dabrowski y Guderley, 2002). Así, por ejemplo, los peces son animales poiquilotermos, por lo que su tasa metabólica está gobernada por la temperatura del agua, siendo éste uno de los factores abióticos más importantes que condicionan su metabolismo intermediario. Además, los peces tienen la ventaja de vivir en un excelente medio para excretar sus desechos nitrogenados, eliminando la mayor parte de éstos como amonio a través de las branquias, simplificando así su metabolismo intermediario. Otra particularidad del metabolismo de peces teleósteos es, sin duda, el hecho de que estos utilizan preferentemente las proteínas, anteponiendo éstas a los hidratos de carbono y las grasas como fuentes de energía para su mantenimiento. Este hecho es especialmente acusado en peces carnívoros (Cowey y Sargent, 1979; Cowey, 1980; Cho y Kaushik, 1983). A ello contribuye, sin duda, la ventaja, anteriormente comentada, de excretar los productos nitrogenados en forma de ión amonio.

Debido a la gran complejidad que supone el análisis del metabolismo intermediario de cualquier organismo, en el siguiente apartado se exponen muy resumidamente, y siempre desde un punto de vista enfocado al contenido de la presente tesis, las principales características de las vías del metabolismo intermediario de peces. La Figura II-4 ilustra de forma esquemática y simplificada este objetivo.



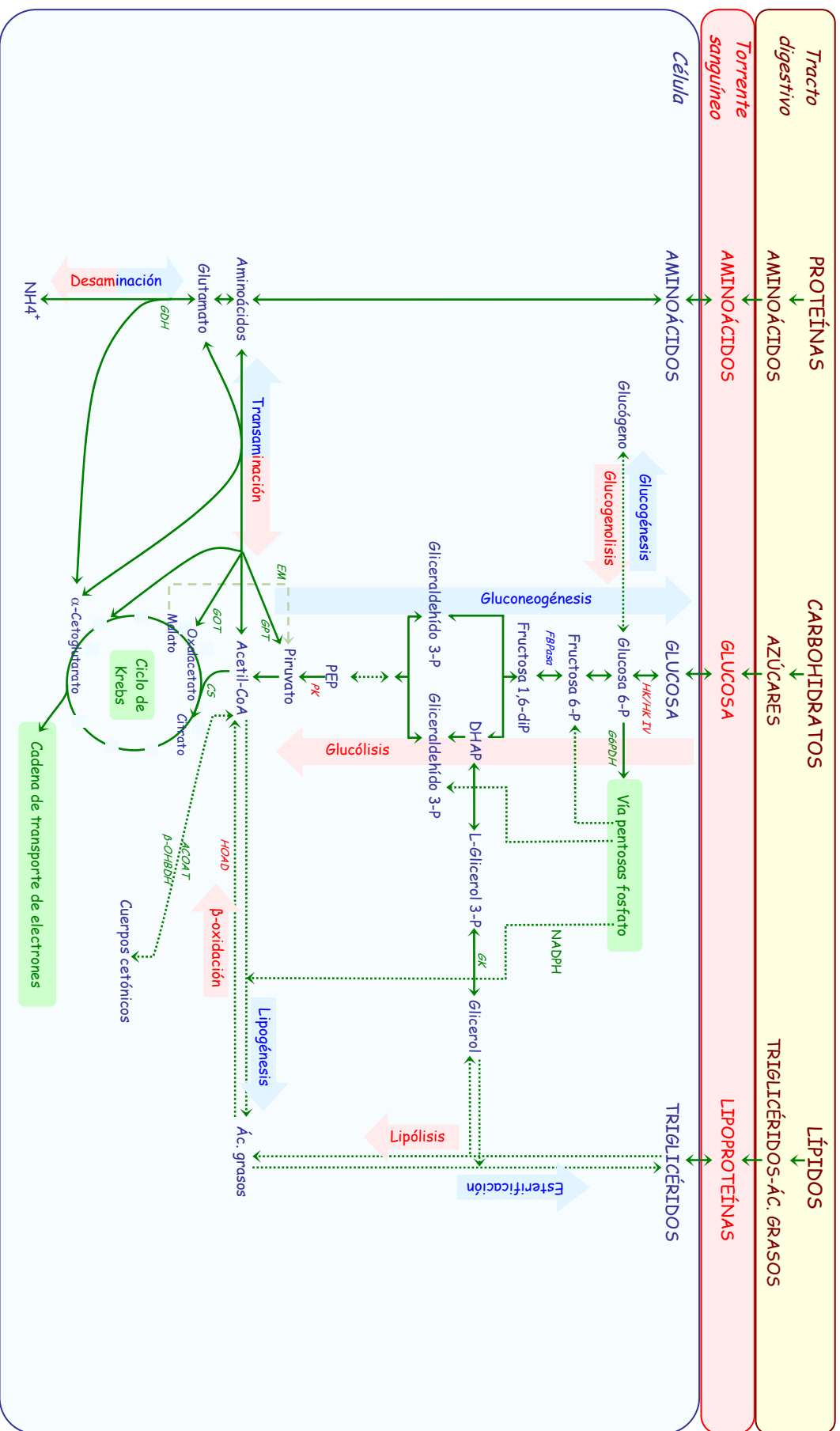


Figura II-4. Visión general de las principales rutas metabólicas.

## 2.1 METABOLISMO DE LOS HIDRATOS DE CARBONO

La importancia de la glucosa en los peces ha sido estudiada por numerosos investigadores (Shiau, 1997; Hemre et al., 2002; Krogdahl et al., 2005). No obstante, los peces han sido considerados tradicionalmente como animales “naturalmente diabéticos”, ya que existen estudios que muestran que la utilización metabólica de la glucosa absorbida puede ser escasa, encontrando altos niveles de glucemia postprandial en la mayor parte de los teleósteos, con ligeras diferencias entre las especies (Bergot, 1979). Esta glucemia prolongada tras la administración de glucosa o tras una comida rica en glúcidos digeribles, sugiere un deficiente control de la glucemia, fenómeno que, en principio, se atribuyó erróneamente a la ausencia de secreción de insulina. Sin embargo, el desarrollo de métodos específicos ha permitido demostrar que la secreción de insulina no es limitante en la mayoría de los peces. Los papeles respectivos de insulina, glucagón o aloxano parecen ser los mismos tanto en peces como en animales terrestres. La hiperglucemia descrita parece estar más relacionada con la limitación de la

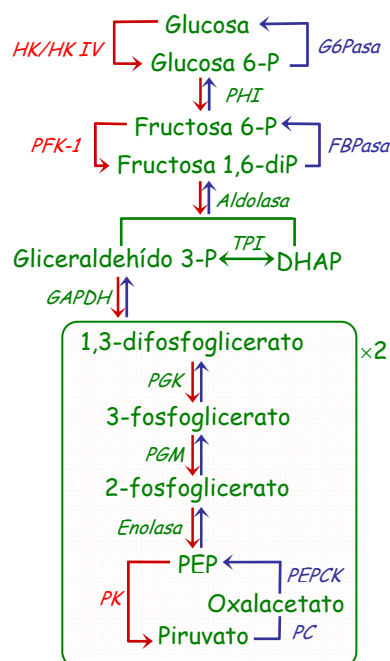


Figura II-5. Rutas glucolítica (rojo) y gluconeogénica (azul).

fosforilación de la glucosa debido a la capacidad reducida de las enzimas encargadas de realizar este proceso, o bien, como ha sido demostrado, a la diferente receptividad tisular a la glucosa (Nagayama y Oshima, 1974). En cualquier caso, tras la digestión y absorción de los carbohidratos dietarios, la glucosa liberada posee diferentes destinos metabólicos (Moon y Foster, 1995; Dabrowski y Guderley, 2002). Así, la glucosa puede ser metabolizada a dos moléculas de piruvato a través de la glucólisis (Figura II-5). Las actividades glucolíticas más elevadas se encuentran en el músculo cardíaco y esquelético, mientras que son más reducidas en el hígado de los peces (Knox et al., 1980).

El piruvato obtenido durante la catálisis de la glucosa puede seguir distintas vías dependiendo de diferentes factores, como la disponibilidad de oxígeno (Moon y Foster, 1995; Dabrowski y Guderley, 2002). En situaciones de anaerobiosis, como en el músculo blanco de los peces, el piruvato es transformado en lactato en una reacción catalizada por el enzima lactato deshidrogenasa en presencia de NADH que es oxidado a  $\text{NAD}^+$ , molécula cuya disponibilidad es fundamental para mantener el catabolismo de la glucosa. En condiciones de aerobiosis, el piruvato es descarboxilado para producir acetil-CoA que será posteriormente empleado en la síntesis de ácidos grasos, fosfolípidos, colesterol, cuerpos cetónicos o para su participación en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs. En dicho ciclo el acetil-CoA, procedente tanto de la degradación de glucosa como del catabolismo de ácidos grasos y aminoácidos cetogénicos, es oxidado completamente. En el proceso se obtiene  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y poder reductor ( $\text{NADH}$  y  $\text{FADH}_2$ ), empleado en el proceso de fosforilación oxidativa para la obtención de energía.

Como ruta alternativa a la glucólisis, la glucosa puede entrar en la vía de las pentosas fosfato, cuya función principal es la de producir NADPH, la principal fuente de equivalentes de reducción para los procesos biosintéticos, y la ribosa 5-fosfato (R5P), precursor de los ácidos nucleicos, a partir de G6P (Figura II-6). Esta ruta se encuentra muy activa en tejidos que sintetizan ácidos grasos o esteroides. Así, en peces, es más activa en hígado que en músculo (Nagayama et al., 1972; Shimeno y Takeda, 1972, 1973; Shimeno, 1982; Walton y Cowey, 1982). Además, también es muy importante en aquellos lugares en los que es necesario un gran aporte de NADPH para la regeneración del glutatión oxidado a reducido, favoreciendo la protección frente al daño de los agentes oxidantes (Halliwell y Gutteridge, 2000; Dabrowski y Guderley, 2002).

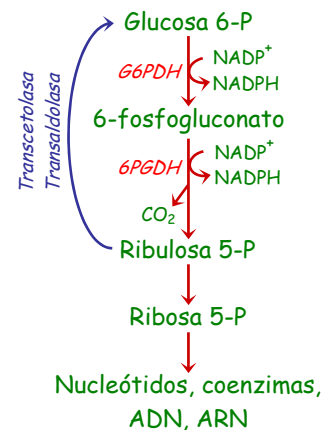


Figura II-6. Vía de las pentosas fosfato.

Por otra parte, la glucosa puede ser almacenada como una fuente energética de reserva en forma de glucógeno a través del proceso denominado glucogénesis (Figura II-7). El glucógeno es la principal forma de almacenamiento de hidratos de carbono en los animales, incluidos los peces, acumulándose fundamentalmente en el hígado y músculo (Moon y Foster, 1995; Halver y Hardy, 2002). El glucógeno es un polisacárido formado por cadenas ramificadas de D-glucosa con enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6. La síntesis de glucógeno o glucogénesis, tiene lugar durante y después de la alimentación, bien por la incorporación de la glucosa sanguínea a glucógeno, o bien por la generación de glucógeno a partir de la G6P derivada de la gluconeogénesis.

Por otro lado, bajo determinadas circunstancias, como el ayuno o un ejercicio intenso, los peces precisan de un suministro de glucosa para el mantenimiento de este metabolito en sangre, o bien para cubrir directamente sus necesidades energéticas (Moon y Foster, 1995; Dabrowski y Guderley, 2002). Para conseguir este objetivo, éstos pueden catabolizar el glucógeno almacenado (glucogenolisis, Figura II-7), o bien recurrir a la síntesis de glucosa *de novo* a partir de otros precursores no glucídicos (gluconeogénesis,

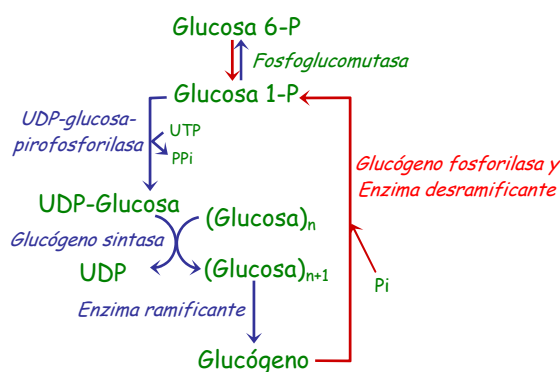


Figura II-7. Rutas glucogénica (azul) y glucogenolítica (rojo).

Figura II-5). El hígado es el principal órgano gluconeogénico, siendo el lactato, piruvato, glicerol, determinados aminoácidos y cualquiera de los intermediarios del ciclo de Krebs los sustratos del proceso. No obstante, el lactato y los aminoácidos son el sustrato preferido para la gluconeogénesis en peces (Suárez y Mommsen, 1987; Moon y Foster, 1995).

Casi todos los enzimas que participan en la vía glucolítica participan también en la gluconeogénesis, excepto los que catalizan reacciones irreversibles, precisando por tanto de la intervención de enzimas específicos (Moon y Foster, 1995).

Los pasos irreversibles de la glucólisis son los catalizados por los enzimas hexoquinasa y glucoquinasa (HK y HK IV), fosfofructoquinasa (PFK) y finalmente piruvato quinasa (PK). Para revertir estos pasos se precisan enzimas específicas. Así, la glucosa 6-fosfatasa invierte la reacción catalizada por la HK/HK IV pudiendo liberar la glucosa en sangre, mientras que la fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa) invierte la del enzima PFK. Por su parte, el piruvato generado por el PEP mediante la PK, es reconvertido a PEP a través de dos enzimas, piruvato carboxilasa (convierte el piruvato en oxalacetato) y fosfoenol piruvato carboxiquinasa (de oxalacetato a PEP). Es necesario destacar, además, que una reacción funcionalmente equivalente puede ser la realizada por el enzima málico (EM), que convierte el piruvato en malato en una reacción reversible, y el malato en oxalacetato mediante el enzima malato deshidrogenasa.

## 2.2. METABOLISMO PROTEICO

Los peces, como el resto de los animales, precisan de un aporte proteico constante suministrado a través del alimento. Sin embargo, en comparación con otros animales, los peces parecen ser más dependientes de la proteína dietaria que del resto de macronutrientes de la dieta para suplir sus necesidades metabólicas (Cowey y Luquet,

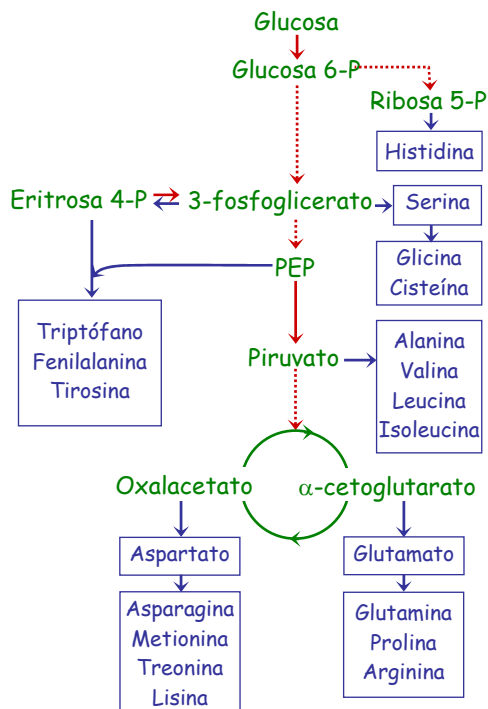


Figura II-8. Biosíntesis de aminoácidos.

1983). Las proteínas están continuamente siendo sintetizadas y degradadas en los aminoácidos que las componen (Fauconneau, 1985; Jürss y Bastrop, 1995; Dabrowski y Guderley, 2002). La síntesis de aminoácidos no esenciales, realizada principalmente en el hígado, se produce mediante el mecanismo de transaminación a partir de intermediarios derivados de la glucólisis, el ciclo de Krebs y la vía de las pentosas fosfato (Figura II-8). De igual forma, y debido a la reversibilidad de sus reacciones, la transaminación también puede ser considerada una vía catabólica de los aminoácidos. Así, en determinadas circunstancias metabólicas, como el ayuno o

tras la ingesta de dietas ricas en proteína, con el subsiguiente exceso aminoacídico, los aminoácidos pueden sufrir la transaminación por la que se generan otros aminoácidos como el glutamato, e intermediarios metabólicos como el piruvato, succinil-CoA, fumarato, acetil-CoA, acetoacetato, oxalacetato y  $\alpha$ -cetoglutarato. Además de la transaminación, que generalmente constituye el primer paso de la degradación de los aminoácidos, el glutamato obtenido por este proceso puede ser totalmente catabolizado mediante otros mecanismos como la desaminación oxidativa (Figura II-9).

La suma de ambas vías es conocida como transdesaminación. Se ha demostrado que, en peces, los tejidos hepático y muscular poseen capacidad para desaminar todos los aminoácidos (Stieber y Cvancara, 1977; Van Waarde, 1983), aunque en músculo la actividad de degradación es menor (Fauconneau, 1985; Houlihan et al., 1986, 1988; Jürss y Bastrop, 1995; Halver y Hardy, 2002).

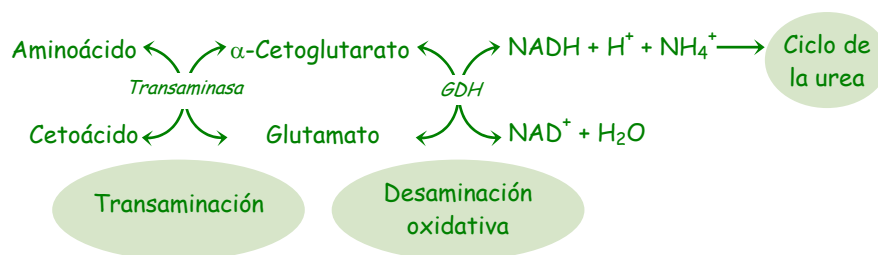


Figura II-9. Reacciones de transaminación y desaminación del metabolismo de los aminoácidos.

### 2.3. METABOLISMO LIPÍDICO

Los ácidos grasos de los peces pueden proceder tanto de los lípidos dietarios como de la síntesis *de novo*, fundamentalmente hepática, mediante una ruta similar a la de los mamíferos, a partir del acetil-CoA derivado fundamentalmente del metabolismo de los carbohidratos (Figura II-10) (Farkas, 1977; Sargent et al., 2002). En cada uno de los pasos de reducción se requiere NADPH como donador de hidrógeno. Aunque la principal fuente de NADPH para la síntesis de ácidos grasos procede de la oxidación de la glucosa a través de la vía de las pentosas fosfato descrita anteriormente, también la reacción catalizada por el enzima málico (EM) supone un suministro importante de este agente reductor.

Una vez generados, los ácidos grasos pueden ser esterificados con glicerol para formar triglicéridos, o bien ser oxidados hasta acetyl-CoA mediante la  $\beta$ -oxidación (Figura II-10).

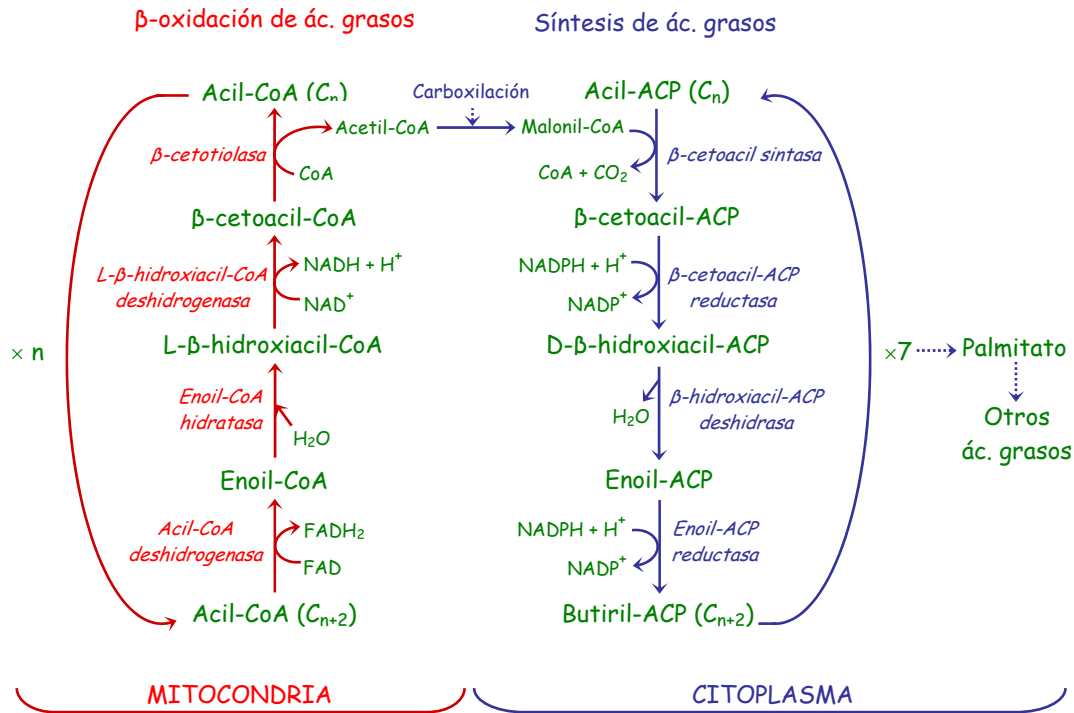


Figura II-10. Síntesis y degradación de ácidos grasos.

El acetyl-CoA generado durante este proceso, puede ser empleado en la obtención de energía mediante su oxidación en el ciclo de Krebs, hecho que ha sido bien establecido en peces (Sargent et al., 2002). No obstante, es importante resaltar que aunque los ácidos grasos no son sustratos gluconeogénicos, la introducción del acetyl-CoA en el ciclo de Krebs genera intermediarios que podrían ser utilizados durante los procesos de gluconeogénesis.

Además de esta vía, el acetyl-CoA también puede utilizarse como precursor en la síntesis de colesterol y otros esteroides, o bien para la formación (en el hígado) de cuerpos cetónicos (acetoacetato,  $\beta$ -hidroxibutirato y acetona). Los cuerpos cetónicos sirven como importantes combustibles metabólicos en muchos tejidos periféricos bajo situaciones excepcionales como por ejemplo el ayuno (Carrillo et al., 1982; Ballantyne, 1995; Soengas et al., 1996,1998; Figueroa et al., 2000). En estos casos, el incremento en

la tasa gluconeogénica en el hígado hace decrecer los niveles de oxalacetato disponibles para su transformación en citrato. En consecuencia, la entrada de acetil-CoA al ciclo de Krebs se ve reducida, existiendo un exceso de acetil-CoA que puede ser empleado en la cetogénesis (Figura II-11).

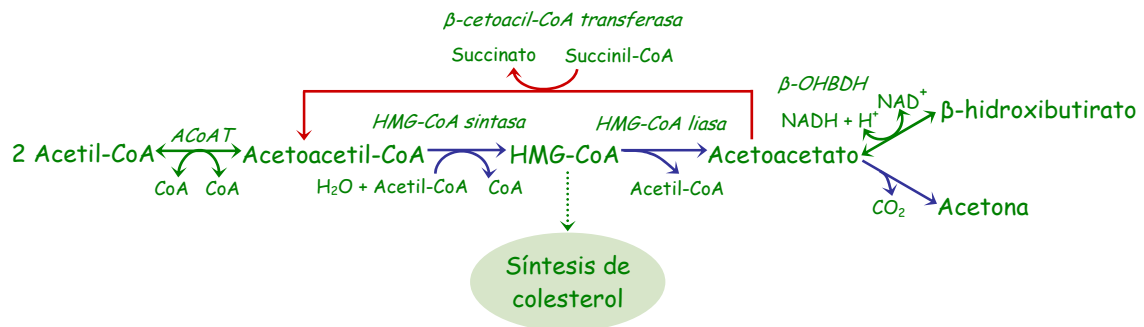


Figura II-11. Metabolismo de los cuerpos cetónicos.

No existe un posicionamiento claro sobre la relevancia de estos compuestos en peces, ya que, mientras algunos estudios indican que no poseen un importante papel para la supervivencia del animal (Zammit y Newsholme, 1979; Black y Love, 1986; Segner et al., 1997), otros indican lo contrario (Zammit y Newsholme, 1979; Carrillo et al., 1982; Singer et al., 1990; LeBlanc y Ballantyne, 1993; Soengas et al., 1996,1998; Figueroa et al., 2000). Una vez generados, los cuerpos cetónicos son liberados por el hígado al torrente sanguíneo y transportados a los tejidos donde, mediante su reconversión a acetil-CoA, servirán como sustrato alternativo para la obtención de energía (Ballantyne, 1995).



### **3. ASPECTOS GENERALES DEL METABOLISMO DE AGENTES OXIDANTES EN PECES**

Las reacciones donde intervienen oxidantes y radicales libres han jugado un papel esencial en el origen de las formas de vida aerobias y son una parte integral de la homeostasis celular. Sin embargo, la interacción de estas especies con biomoléculas esenciales, como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, conducen a alteraciones en su estructura y función. Debido a estos efectos tóxicos colaterales, los sistemas biológicos poseen mecanismos de defensa antioxidante, enzimáticos y no enzimáticos, que son capaces de controlar la presencia y los efectos de estos productos. Estos mecanismos de defensa antioxidante se complementan con los sistemas celulares de reparación y reemplazo, que en forma coordinada y acoplados al metabolismo intermediario, logran mantener un nivel bajo de agentes oxidantes, compatible con la vida celular aeróbica. Oxidantes y antioxidantes tienen una clara función en el organismo y un desequilibrio en este delicado balance en favor de los primeros puede generar una condición de estrés oxidativo, que puede conducir al daño y muerte celular.

#### **3.1. RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS**

Los radicales libres pueden ser definidos como cualquier especie química, átomo o molécula, capaz de existir de forma independiente y que presenta uno o más electrones desapareados ocupando un orbital electrónico (Halliwell y Gutteridge, 2000). En la Figura II-12 se muestran distintos mecanismos de producción de radicales libres.

Además de los radicales libres, existen otras moléculas denominadas “especies reactivas” que, si bien no presentan electrones desapareados, se caracterizan por poseer al menos un electrón en un orbital de mayor contenido energético que el correspondiente a su estado fundamental, lo que las hace muy reactivas, pudiendo incluso llegar a favorecer la aparición de radicales libres en determinadas circunstancias.

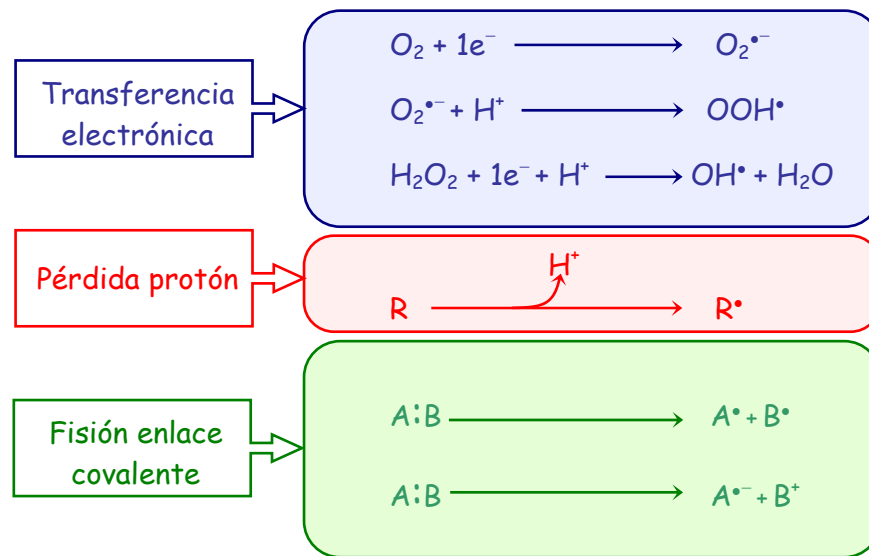


Figura II-12. Mecanismos de producción de radicales libres.

En general, las especies reactivas más importantes son las derivadas del oxígeno, agrupadas dentro del término genérico de “especies de oxígeno reactivo” (ROS), que incluye, además, los radicales libres de oxígeno. Junto a éstas, también podemos encontrar las derivadas de compuestos nitrogenados denominadas especies de nitrógeno reactivo (RNS) (Halliwell y Gutteridge, 2000).

Las fuentes de producción de radicales libres y especies reactivas son numerosas y variadas, pudiendo diferenciarse en endógenas y exógenas. Entre las endógenas, se encuentran la cadena de transporte electrónico mitocondrial y la activación catalítica de diversas enzimas del metabolismo intermediario celular como la xantina oxidasa, urato oxidasa y acil-CoA oxidasa. Igualmente, en respuesta a la presencia de agentes infecciosos y otros estímulos, las células fagocíticas muestran un rápido consumo de oxígeno (el llamado "estallido respiratorio") generando, tras un conjunto de reacciones,  $NO^{\bullet}$  y  $O_2^{\bullet -}$ , dando lugar este último a la iniciación de una cascada de producción de radicales libres. Entre las fuentes exógenas destacan los xenobióticos, radiaciones ionizantes, fármacos, ozono e hiperoxia, entre otros.

En la Figura II-13 se muestran los principales tipos de especies reactivas potencialmente peligrosas para los seres vivos y sus procesos de formación.

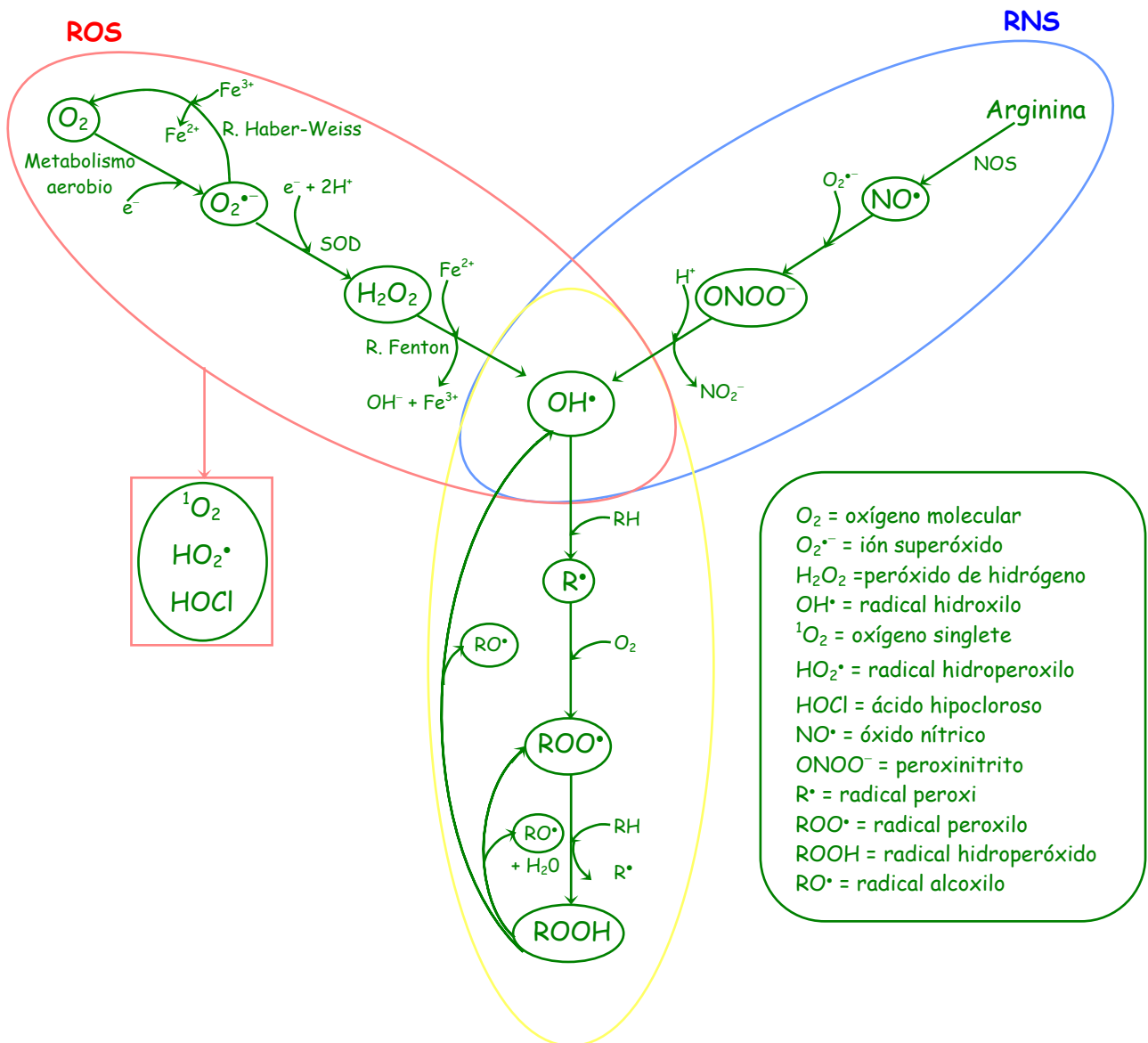


Figura II-13. Principales radicales libres, ROS y RNS y sus procesos de formación.

### 3.2. MECANISMOS DE DEFENSA

Para prevenir los posibles daños que los agentes oxidantes pudieran tener sobre el organismo, los peces, como el resto de animales, han desarrollado un complejo sistema de mecanismos de defensa antioxidante (Sies, 1993; Jacob, 1995). En este sentido, se ha definido como antioxidante aquella sustancia que se encuentra en pequeñas concentraciones, en comparación con un sustrato oxidable, e inhibe o retarda significativamente la oxidación de dicho sustrato (Halliwell y Gutteridge, 2000). A partir de esta definición, los sistemas antioxidantes pueden clasificarse atendiendo a varios criterios (Figura II-14). Uno de ellos es el que los divide entre defensas antioxidantes primarias y secundarias (Cadenas, 1995; Jacob, 1995; Halliwell y Gutteridge, 2000). Las primarias serían aquellas que previenen el fenómeno oxidativo, impidiendo la formación del radical libre o eliminándolo cuando se ha formado. En cuanto a las secundarias, corresponderían a los sistemas enzimáticos de reparación o de síntesis *de novo*. Tanto los antioxidantes primarios como los secundarios han sido detectados en numerosas especies de peces (Winston y Di Giulio, 1991; Martínez-Álvarez et al., 2005), si bien es cierto que la posibilidad de aparición de estos antioxidantes depende de la especie a considerar.

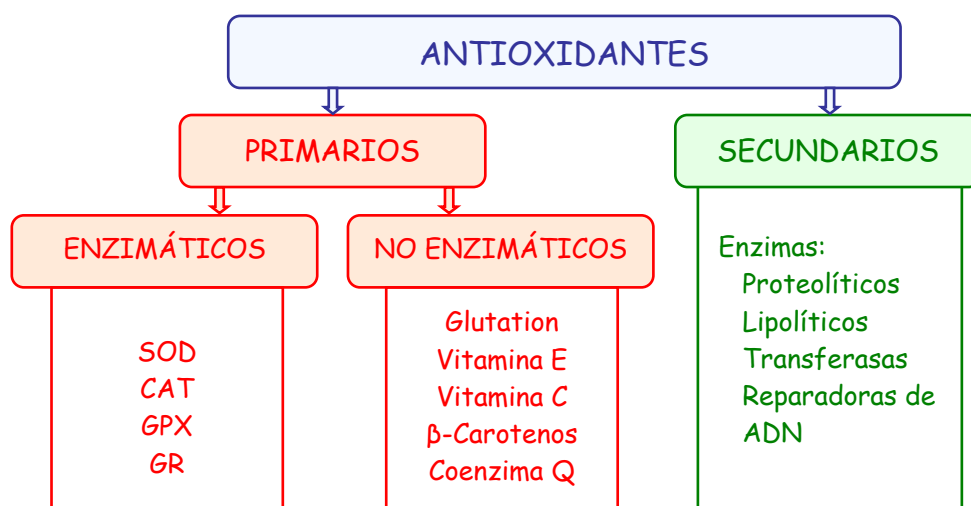


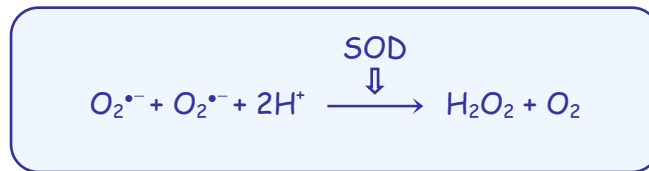
Figura II-14. Clasificación de los principales sistemas de defensa antioxidante.

### 3.2.1. Defensas antioxidantes primarias

#### ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

##### *Superóxido dismutasa (SOD)*

El enzima SOD juega un papel fundamental como mecanismo de defensa al llevar a cabo la aceleración de la dismutación espontánea del radical superóxido, el cual inicia la cascada de producción de radicales del oxígeno, formándose como productos peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, según la siguiente ecuación:

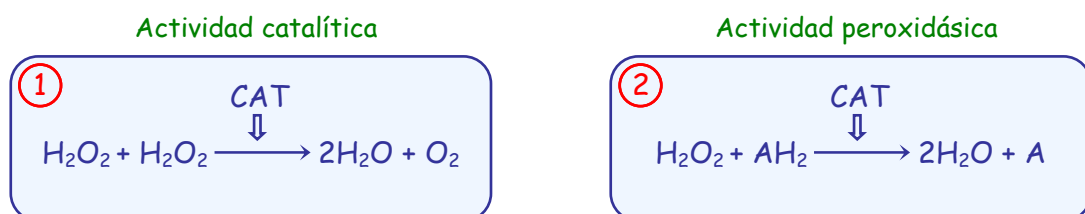


Es por este motivo, por el que no es de extrañar que este enzima se encuentre ampliamente distribuido en todos los organismos aeróbicos (Halliwell y Gutteridge, 2000). Se han identificado dos clases de SODs en peces, agrupadas según el metal que forme parte de su centro activo. Las CuZn-SODs, constituídas por dos subunidades idénticas, con un átomo de cobre y otro de zinc en cada uno de sus centros activos. De estos dos metales, el cobre presenta una actividad catalítica, mientras que el zinc parece desempeñar tanto una función catalítica como de estabilización del enzima, aunque algunos autores sólo le asignan esta última función. Se localiza principalmente en el citosol de la célula, aunque también aparece en lisosomas y mitocondrias (Forman y Fridovich, 1973; Halliwell y Gutteridge, 2000; Martínez-Álvarez et al., 2005). Por otro lado, las Mn-SODs están constituídas por cuatro subunidades idénticas, con un átomo de manganeso en cada centro activo. Se localizan principalmente en la mitocondria, estando ausentes en eritrocitos y leucocitos (Weisigner y Fridovich, 1973; Halliwell y Gutteridge, 2000). Para la identificación de las distintas clases de SODs se utilizan inhibidores. Así, las CuZn-SODs se inhiben por cianuro y peróxido de hidrógeno, mientras que las Mn-SODs son resistentes a ambos inhibidores, aunque son sensibles al cloroformo y metanol.

Es importante destacar que una elevada actividad SOD, que no se encuentra acompañada de un incremento en las actividades glutatión peroxidasa y catalasa (descritas a continuación), conlleva un aumento en la producción de peróxido de hidrógeno con los consecuentes posibles efectos tóxicos.

### *Catalasa (CAT)*

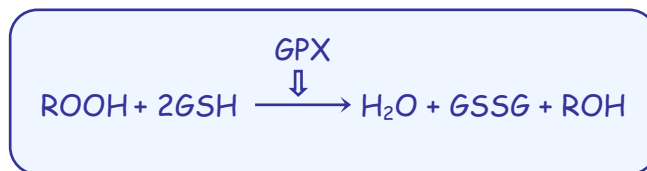
La catalasa es un enzima constituido por cuatro subunidades, con un grupo hemo con  $\text{Fe}^{3+}$  enlazado a cada uno de sus centros activos. Posee una doble función, ya que cataliza tanto la descomposición de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (actividad catalítica, ecuación 1), como la oxidación de donadores de hidrógeno, como son metanol, etanol, ácido fórmico, fenoles y aminas (actividad peroxidásica, ecuación 2) (Aebi, 1984; Halliwell y Gutteridge, 2000). El que predomine la acción catalítica o la peroxidásica va a depender de la concentración de donadores de hidrógeno y de la concentración o producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el sistema (Aebi, 1984; Halliwell y Gutteridge, 2000). Además, aunque la principal función de este enzima es descomponer el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , también presenta actividad con metil y etil hidroperóxidos.



La catalasa está presente en prácticamente todas las células de animales y plantas (Halliwell y Gutteridge, 2000). La concentración de este enzima es distinta en los diferentes órganos, presentando actividades muy elevadas especialmente en hígado y eritrocitos, mientras que en cerebro, corazón y músculo es más baja. Está localizada principalmente en los peroxisomas, aunque su biogénesis se produce a partir de precursores sintetizados fuera de estos orgánulos. Esta localización se considera estratégica ya que se encuentra asociada a la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos.

### *Glutation peroxidasa (GPX)*

Otro enzima considerado crucial como sistema de defensa antioxidante es la glutacion peroxidasa selenio-dependiente (GPX). Está formado por cuatro subunidades que contienen selenio en el centro activo de cada una de ellas (Paglia y Valentine, 1967; Mannervik, 1985; Halliwell y Gutteridge, 2000). La GPX cataliza la descomposición de  $H_2O_2$ , al igual que la catalasa, pero además puede reaccionar con otros hidroperóxidos. Para ello, este enzima requiere de un compuesto antioxidante, denominado glutacion, que en su forma reducida (GSH) actúa como donador de hidrógeno, generando glutacion oxidado (GSSG) y el producto de reducción de los hidroperóxidos:



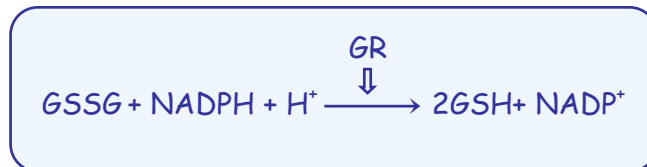
El radical (R) puede ser cualquier grupo orgánico, aromático o alifático, o simplemente hidrógeno (Mannervik, 1985).

Se ha detectado actividad de este enzima en casi todos los tejidos, siendo mayor en hígado y corazón, y escasa en músculo. Se localiza principalmente en el citosol, aunque también se ha encontrado en mitocondrias, matriz mitocondrial y en lugares de contacto entre la membrana externa e interna mitocondrial (Halliwell y Gutteridge, 2000).

Para el mantenimiento de la actividad GPX se precisa de un suministro constante de GSH que es reciclado a partir de su forma oxidada mediante la intervención del enzima glutacion reductasa (GR), cuya descripción y mecanismo de acción se expone a continuación.

*Glutation reductasa (GR)*

La glutatión reductasa es una proteína constituida por dos subunidades idénticas, con FAD en el centro activo de cada subunidad. Este enzima se encarga de catalizar la reducción del glutatión oxidado (GSSG) utilizando NADPH como donador de electrones (Carlberg y Mannervik, 1975; Halliwell y Gutteridge, 2000).



La glutatión reductasa tiene una distribución subcelular similar a la GPX, encontrándose en el citosol, la matriz mitocondrial y también en otros orgánulos asociados a la membrana celular como el retículo endoplasmático.

## ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

Los antioxidantes no enzimáticos son moléculas principalmente exógenas (aunque algunas son de origen endógeno) que reaccionan directamente con los agentes oxidantes siendo consumidas durante esta acción, por lo que deben ser reemplazadas fundamentalmente a través del aporte dietario (Halliwell y Gutteridge, 2000). Estas moléculas antioxidantes pueden encontrarse tanto en la fracción acuosa como lipídica, de forma que, atendiendo a esta división, podemos clasificarlas en dos grupos: liposolubles e hidrosolubles.

Dentro de las moléculas antioxidantes liposolubles destacan la vitamina E, considerado el mejor antioxidante liposoluble en los organismos; los  $\beta$ -carotenos, y el coenzima Q, actuando no sólo en la eliminación de los radicales libres, sino también en la regeneración de antioxidantes como la vitamina E (Halliwell y Gutteridge, 2000).



En cuanto a las moléculas hidrosolubles, destacan dos, glutatión y vitamina C, por su importante papel antioxidante en la mayoría de los organismos. Por un lado, el glutatión en su forma reducida (GSH) proporciona el poder reductor necesario para la conversión de dehidroascorbato a ascorbato y de radical tocoferilo a tocoferol, además de ser sustrato de enzimas antioxidantes como la GPX. Por otra parte, también puede reaccionar directamente con  $O_2^{\cdot -}$ ,  $OH^{\cdot}$  y radicales libres orgánicos (Halliwell y Gutteridge, 2000). Por otro lado, la vitamina C es capaz de pasar de su forma reducida a su forma oxidada mediante dos procesos oxidativos consecutivos, característica que hace de este compuesto un excelente antioxidante hidrosoluble (Buettner y Jurkiewicz, 1995). El ácido ascórbico es capaz de reaccionar directamente con  $O_2^{\cdot -}$ ,  $OH^{\cdot}$ ,  $HO_2^{\cdot}$ , oxígeno singlete, radicales del nitrógeno y el sulfuro y radicales lipídicos (Stadtman, 1991, Buettner y Jurkiewicz, 1995). Además, interacciona con metales traza que constituyen los centros funcionales de algunos enzimas antioxidantes (Jacob, 1995) e interviene en la regeneración del  $\alpha$ -tocoferol.

Otros compuestos con reconocida función antioxidante son el ácido úrico, ferritina, hemosiderina, ceruloplasmina, compuestos fenólicos, melatonina, riboflavina, cisteína, taurina, metionina, bilirrubina y glucosa. Además, aunque oligoelementos como el Zn, Se, Cu y Mn no son antioxidantes en sí mismos, sí son fundamentales, considerando que forman parte de los principales enzimas de protección frente a las ROS.

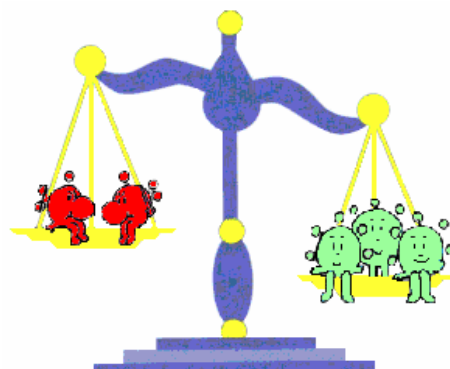
### 3.2.2. Defensas antioxidantes secundarias

Como comentábamos anteriormente, los mecanismos de defensa primarios no son completamente efectivos a la hora de prevenir el daño oxidativo. Este hecho estimula los sistemas de defensa antioxidante secundarios, encargados tanto de “reparar” las biomoléculas dañadas antes de que su presencia dé lugar a alteraciones en el metabolismo celular o incluso la muerte de la célula, como de “renovar” sintetizando una nueva molécula que sirva de “repuesto” (Cadenas, 1995). Entre estos mecanismos de defensa encontramos enzimas específicos de reparación del ADN, enzimas proteolíticos, enzimas lipolíticos y transferasas.

### 3.3. EFECTOS DE LOS RADICALES LIBRES Y LAS ESPECIES REACTIVAS

#### 3.3.1 Estado redox y estrés oxidativo

Como se ha comentado previamente, además de proceder de fuentes exógenas, los radicales libres y las especies reactivas se están generando continuamente en el organismo. Por ello, es necesario que existan adecuados sistemas de protección para eliminar y/o reparar el daño que puede ser producido por estos compuestos, estableciéndose un tenue equilibrio entre las propiedades fisiológicas de los radicales libres y sus propiedades dañinas. Son los sistemas antioxidantes los encargados de mantener el equilibrio adecuado entre estas funciones, dando lugar a lo que se conoce como “balance oxidativo”. Cuando este balance se desequilibra a favor de los agentes oxidantes, por exceso de producción de estos compuestos, por disminución de las defensas antioxidantes o por ambas circunstancias simultáneamente, se produce el “estrés oxidativo” (Sies, 1985; Tocher et al., 2002). El estrés oxidativo puede generar daños oxidativos sobre moléculas de gran importancia biológica como son lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos, provocando alteraciones que pueden llegar incluso a producir la muerte celular (Winston y Di Giulio, 1991; Halliwell y Gutteridge, 2000).



### 3.3.2. Daño oxidativo a las principales biomoléculas

#### DAÑO OXIDATIVO A LÍPIDOS

Una de las consecuencias más importantes del estrés oxidativo es el proceso conocido como “peroxidación lipídica”, el cual puede entenderse como la destrucción oxidativa de ácidos grasos en un proceso autocatalítico e incontrolable que da lugar a la formación de hidroperóxidos de ácidos grasos y una serie de productos secundarios, incluyendo un amplio rango de compuestos aldehídos. La peroxidación lipídica se puede dividir en cuatro fases: iniciación, propagación, ramificación y terminación (Figura II-15).

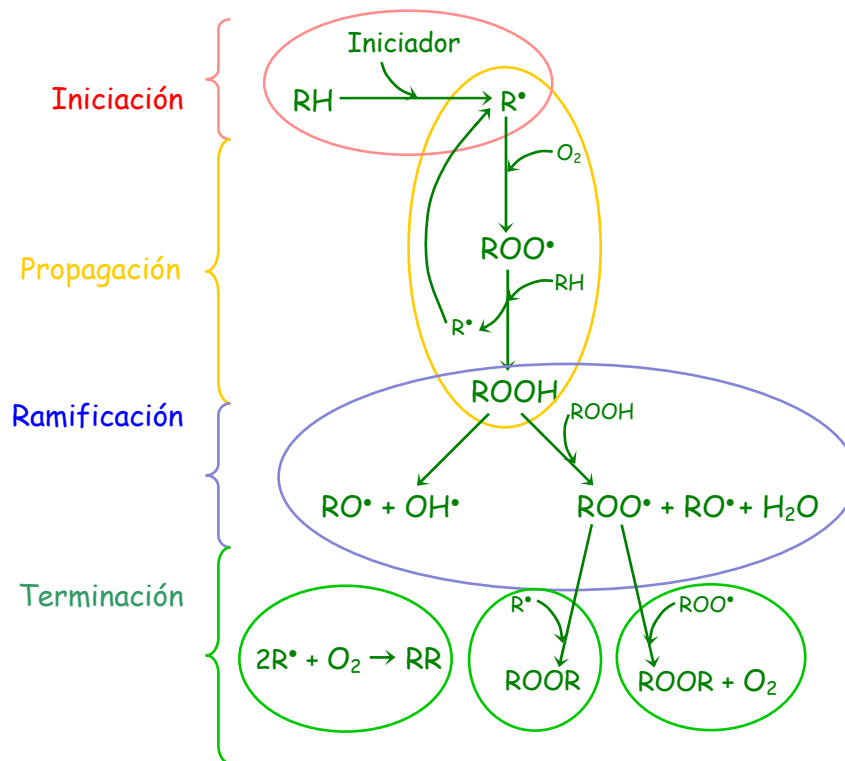


Figura II-15. Fases de la peroxidación lipídica.

Los ácidos grasos más susceptibles de sufrir el ataque de los agentes prooxidantes son los poliinsaturados (PUFAs), debido a que la posibilidad de sustraer un hidrógeno de su estructura es mayor a medida que aumenta el contenido de dobles enlaces, ya que éstos debilitan la unión C-H del carbono adyacente (Halliwell y Gutteridge, 2000; Niki et al., 2005). Por esta razón, los ácidos grasos monoinsaturados son relativamente resistentes a este ataque y los saturados sólo son oxidables bajo condiciones extremas.

Son numerosos los productos terminales de la oxidación de los PUFAs (Halliwell y Gutteridge, 2000; Niki et al., 2005). Entre ellos, podemos encontrar alcanos (por ejemplo pentano y etano) y aldehídos, siendo el predominante el malondialdehído (MDA) (Valenzuela, 1991), producto que puede formar enlaces cruzados entre varios tipos de moléculas, produciendo así citotoxicidad (Halliwell y Gutteridge, 2000). La generación de este producto, a través del empleo de ácido tiobarbitúrico, ha sido tradicionalmente usada como biomarcador de estrés oxidativo en peces.

En peces, como en otros organismos, la peroxidación lipídica puede provocar un daño directo sobre los lípidos que integran las membranas celulares siendo sus principales efectos el decremento de su fluidez, cambios en las propiedades de las fases de la membrana y disminución de su resistencia eléctrica. Todo esto altera sus propiedades, pudiendo afectar significativamente a las proteínas unidas a ella. Además, a nivel metabólico pueden aparecer trastornos que van desde la esteatosis hepática hasta la inhibición de ciertas enzimas del ciclo de Krebs. Desde el punto de vista comercial, posee efectos negativos sobre la calidad de la carne, ya que aparte de la posible aparición de distrofia muscular, es probable una disminución de la coloración y una alteración de su sabor, además de una disminución en su calidad dietética debida a la destrucción parcial de los ácidos grasos más valorados para la nutrición humana y de la vitamina E y otras vitaminas sensibles a la oxidación (Guillaume et al., 2004).

## DAÑO OXIDATIVO A PROTEÍNAS

En general, cualquier ROS es capaz de generar oxidación proteica. Sin embargo, el  $\text{OH}^\cdot$  es el que generalmente inicia la reacción de oxidación, estando el curso del proceso condicionado por la presencia de  $\text{O}_2^{\cdot -}$  y  $\text{HO}_2^\cdot$  (Davies, 1987; Berlett y Stadtman, 1997; Stadtman, 2006).

El ataque de radicales libres a proteínas puede ser clasificado como difuso o selectivo. En los ataques difusos, se producen modificaciones en diferentes regiones de la estructura proteica como consecuencia de exposiciones a radiaciones ionizantes o como consecuencia secundaria de cadenas de propagación de radicales libres, entre las que destaca la peroxidación lipídica, especialmente por la acción del malondialdehído.

Los ataques selectivos, por su parte, son extremadamente específicos, siendo los aminoácidos lisina, histidina, arginina y prolina los más frecuentemente atacados. En este tipo de daño oxidativo juegan un papel importante los metales de transición, siendo los enzimas que contienen estos metales los que aparentemente presentan mayor riesgo de sufrirlos (Stadtman, 1990).

Entre los productos generados durante la oxidación proteica encontramos derivados carbonilos, los cuales pueden ser introducidos en las proteínas a través de diversas rutas como la aducción de lípidos oxidados o azúcares que contienen estos carbonilos, o a partir de la transformación de residuos aminoacídicos mediante oxidación catalizada por metales (Amici et al., 1989; Bainy et al., 1996; Requena et al., 2003).

Distintos estudios han sugerido que la determinación del contenido en grupos carbonilo en proteínas puede ser usada, al igual que la producción de MDA en el caso de la peroxidación lipídica, como biomarcador del estrés oxidativo general (Fessard y Livingstone, 1998; Chevion et al., 2000; Dalle-Donne et al., 2003). Sin embargo, aún no son demasiados los trabajos en los que se ha empleado este biomarcador, tanto para conocer el estado oxidativo en peces (Fessard y Livingstone, 1998; Sayeed et al., 2003; Almroth et al., 2005; Parvez y Raisuddin, 2005; Parvez et al., 2006; Tokur y Korkmaz, 2007), como las repercusiones concretas sobre el animal, producidas por el daño proteico.

En general, los ataques oxidativos a proteínas y aminoácidos pueden dar lugar a entrecruzamientos catalíticos, alteraciones, fragmentación y desnaturalización proteica, etc., siendo todas ellas modificaciones irreversibles que ponen en peligro la funcionalidad e integridad del metabolismo celular (Davies y Delsignore, 1987; Davies, a,b; Berlett y Stadtman, 1997; Almroth et al., 2005; Parvez et al., 2006; Stadtman, 2006).

## DAÑO OXIDATIVO A HIDRATOS DE CARBONO

Se ha observado que azúcares como glucosa, manitol y desoxiazúcares reaccionan rápidamente con el OH $\cdot$ . Por otra parte, los monosacáridos, en condiciones fisiológicas, son capaces de reducir el oxígeno molecular, autooxidándose y formando cetoaldehídos e intermediarios oxidantes, como O $_2^{\cdot-}$ , autooxidación catalizada por metales de transición (Wolf et al., 1984). Paralelamente, la glucosa es capaz de unirse a proteínas en los grupos amino terminal, iniciando su glicación y generando productos que son extremadamente reactivos y capaces de alterar la estructura espacial de las proteínas (aparición de puentes, entrecruzamientos, acortamientos, cambios conformacionales, etc.), observándose que tanto la autooxidación como la producción de estos productos están íntimamente relacionados a través de la interacción con metales de transición.

## DAÑO OXIDATIVO A ÁCIDOS NUCLEICOS

Las alteraciones de ADN, frecuentemente observadas en situaciones de estrés oxidativo, consisten en mutaciones, entrecruzamientos, incremento en los niveles de fragmentación y modificaciones oxidativas en la bases púricas y pirimídicas, pérdida de fragmentos cromosómicos e incluso pérdida total de determinados cromosomas. Los principales agentes involucrados en estos daños oxidativos son el radical OH $\cdot$  y el H $_2$ O $_2$ . Igualmente, también se han observado entrecruzamientos producidos por la interacción del MDA con los grupos aminos del ADN (Roche y Romero-Alvira, 1996).



### III- MATERIAL Y MÉTODOS







## **1. DISEÑO EXPERIMENTAL**

En el presente apartado se describe el diseño experimental común a todos los trabajos de esta memoria. El diseño experimental específico de cada ensayo se encuentra descrito detalladamente en su correspondiente bloque experimental.

### **1.1. DIETAS EXPERIMENTALES**

Las dietas experimentales formuladas y descritas en los diseños experimentales de los ensayos IV-1, IV-2 y IV-3 siguieron un proceso de fabricación común que se describe a continuación. El proceso de elaboración tuvo lugar en las instalaciones del Dpto. de Biología Animal de la Facultad de Ciencias (Universidad de Granada).

#### **1.1.1. Formulación**

La principal fuente proteica escogida fue harina de pescado LT (Low Temperatura) elaborada con pescado fresco obtenido de pesca extractiva, en un proceso integral, con una evaporación suave y a baja temperatura para no alterar sus propiedades. Fue suministrada por la empresa Harinas del Atlántico, S.A. (España). Para la formulación de las dietas experimentales de cada ensayo, se realizaron análisis de humedad (9.1%), proteína (71.5% ss), lípidos (10.6% ss) y ceniza (16.3% ss) de dicha harina. Adicionalmente en el caso del ensayo 1 también se empleó caseína (Musal & Chemical, S.A.) como fuente secundaria de proteína, cuya composición fue igualmente analizada (8.9% humedad, 86.9% proteína ss, 1.4% lípidos ss y 4.3% ceniza ss).

El aceite de pescado, obtenido, al igual que la harina de pescado, de pescado fresco proveniente de pesca extractiva (Harinas del Atlántico, S.A.), fue la principal fuente lipídica, usándose lecitina (Musal & Chemical, S.A.) como complemento, además de la grasa aportada por la harina de pescado y, en su caso, por la caseína.

Como fuente de carbohidratos se utilizaron almidón pregelatinizado, dextrina y/o maltodextrina, según la formulación de cada ensayo, proporcionados por Musal & Chemical, S.A.

La composición de los complementos mineral y vitamínico (Musal & Chemical, S.A.) se encuentra reflejada en la Tabla III-1. En cuanto a la vitamina C (Musal & Chemical, S.A.) y la colina (Acros Organics) fueron añadidas separadamente del complemento vitamínico. En todos los casos, la vitamina C se añadió como ascorbil palmitato.

Tabla III-1. Composición de los complementos vitamínico y mineral utilizados en la formulación de los distintos piensos.

<b>Vitaminas</b>	<b>mg kg dieta<sup>-1</sup></b>	<b>Minerales</b>	<b>mg kg dieta<sup>-1</sup></b>
Retinol (A)	14	CO <sub>3</sub> Ca	600
Tiamina (B <sub>1</sub> )	40	ClK	200
Riboflavina (B <sub>2</sub> )	56	ClNa	400
Niacina (B <sub>3</sub> )	350	IK	2
Ácido pantoténico (B <sub>5</sub> )	105	MoO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1
Piridoxina (B <sub>6</sub> )	28	(PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Ca·H <sub>2</sub> O	4000
Biotina (B <sub>8</sub> )	4.2	PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	3000
Ácido fólico (B <sub>9</sub> )	10.5	SeO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub>	0.4
Cianocobalamina (B <sub>12</sub> )	0.1	(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> Al <sub>2</sub> ·18H <sub>2</sub> O	1.6
Inositol (B <sub>h</sub> )	1400	SO <sub>4</sub> Co	2
Colecalciferol (D <sub>3</sub> )	1.4	SO <sub>4</sub> Cu·5H <sub>2</sub> O	10
α-Tocoferol (E)	210	SO <sub>4</sub> Fe·7H <sub>2</sub> O	300
Menadiona (K <sub>3</sub> )	28	SO <sub>4</sub> Mg	1000
Cantaxantina	50	SO <sub>4</sub> Mn·H <sub>2</sub> O	30
Excipiente (celulosa)	2702.8	SO <sub>4</sub> Zn·7H <sub>2</sub> O	50
		Excipiente (celulosa)	403
<b>Total</b>	<b>5000</b>	<b>Total</b>	<b>10000</b>

Para la determinación de los coeficientes de digestibilidad aparente, en los ensayos IV-2 y IV-3, se añadió como marcador inerte sesquióxido de cromo (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) proporcionado por Acros Organics.

Como aglutinante dietario se utilizó hidroxipropil-metil celulosa (HPMC) suministrada por Musal & Chemical, S.A. Finalmente se empleó celulosa microcristalina (Musal & Chemical, S.A.) para completar el 100% de la dieta.

### 1.1.2. Elaboración

En función de su porcentaje en la dieta, los ingredientes se fueron mezclando en orden de menor a mayor nivel de inclusión, con el fin de lograr una mezcla lo más homogénea posible. Posteriormente se añadieron y mezclaron los ingredientes líquidos como la lecitina y la colina disueltas en agua y finalmente el aceite de pescado. Tras esto se añadió una cantidad de agua variable en función de la dieta, de tal forma que permitiera conseguir la consistencia necesaria para la granulación del pienso. La mezcla de todos los ingredientes, incluyendo el agua, se realizó manualmente durante el tiempo necesario para la obtención de una mezcla homogénea, a excepción del ensayo IV-3, donde debido a la gran cantidad de pienso fabricado se utilizó la ayuda de una mezcladora industrial.

Terminado este primer paso del proceso de fabricación, se procedió a la granulación de la mezcla obtenida mediante una granuladora industrial, utilizándose para ello una matriz perforada con un diámetro que varió entre 1.5 mm y 4.5 mm en función del ensayo a considerar (ver diseño experimental de cada caso), con el fin de obtener un tamaño de grano adecuado al tamaño de los animales.

Las dietas húmedas ya granuladas se sometieron a un proceso de desecación, colocándolas sobre unas bandejas de malla de plástico en el interior de una secadora industrial a una temperatura de 20-30 °C durante el tiempo necesario para reducir su humedad hasta el 5-10% aproximadamente.

Una vez finalizada la fabricación de las dietas, éstas se almacenaron en bolsas opacas cerradas herméticamente que se conservaron en cámara fría a 4 °C hasta el momento de su envío a la Planta de Cultivos Marinos del Instituto Español de Oceanografía en Mazarrón, Murcia.

## 1.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 1.2.1. Control de peso e ingesta

La ingesta de los animales de cada lote fue registrada diariamente durante el periodo experimental. Al inicio de cada experimento los animales se pesaron individualmente para favorecer la homogeneidad de los lotes. Al finalizar el periodo experimental los animales fueron pesados de forma individual o en lotes, en función del ensayo. Los controles de peso fueron realizados mediante inmersión previa de los animales en un recipiente que contenía una mezcla de agua con anestésico, esencia de clavo (Guinama, S.L.), a una concentración de 40 ppm, a excepción del ensayo de ayuno-realimentación, en cuyo caso el anestésico empleado fue 2-fenoxietanol a una concentración 1:2000 (v/v). Se empleó una balanza monoplato con un error de  $\pm 0.01$  g. En todos los casos, los animales se mantuvieron en ayunas durante las 24 horas previas al control de peso.

### 1.2.2. Toma y procesamiento de muestras

#### DIETAS

Finalizado el proceso de fabricación de las dietas, y antes de su almacenamiento, se tomó una muestra de cada una de ellas. A fin de obtener resultados analíticos precisos, la muestra fue triturada con un molinillo mecánico hasta conseguir un polvo lo más homogéneo posible. Éste fue almacenado en botes cerrados herméticamente y conservados en frío, hasta la realización de los correspondientes análisis de composición y en algunos casos de cromo (ensayos IV-2 y IV-3).

#### HECES

Para los ensayos IV-2 y IV-3, donde se determinaron coeficientes de digestibilidad aparente, fue necesaria la toma de muestras de heces. Para ello, los animales se alojaron en tanques cilíndricos de fibra de vidrio, en los que el flujo de agua antes de abandonar el tanque se hacía pasar por una columna de sedimentación basada en el sistema Guelph (Cho et al., 1982) y, semejante en diseño a la descrita por Morales

(1993) y Bazoco et al. (1993). Antes de la primera comida del día se recogían las heces de la columna de sedimentación, siendo posteriormente sometidas a un proceso de centrifugación a 17000 g y 7 °C, durante 20 minutos. El sobrenadante resultante fue eliminado, y las heces obtenidas fueron liofilizadas. Finalmente, se mezclaron las heces de varios días sucesivos con el fin de obtener una cantidad suficiente y homogénea de muestra para realizar los análisis de composición y contenido en cromo.

## ANIMALES

Los animales muestreados en cada uno de los experimentos, tanto para realizar análisis de composición como aquellos destinados a extracción de sangre y tejidos, fueron sacrificados mediante choque térmico por inmersión en agua helada hasta asegurar su muerte.

Los peces enteros, a los que se les determinó la composición corporal, siguieron un protocolo en el cual, el primer paso fue el pesado y troceado del animal para, posteriormente, someterlo a desecación en estufa a 105 °C hasta peso constante. A continuación, los peces ya desecados fueron triturados utilizando un molino mecánico hasta alcanzar el mayor grado de uniformidad de la muestra, siendo almacenada la harina resultante en botes cerrados herméticamente y conservados en frío hasta la realización de los análisis correspondientes.

## SANGRE

La toma de muestras de sangre fue realizada sobre la vena caudal de los peces sacrificados como se describió en el apartado anterior. Para ello se emplearon jeringas previamente heparinizadas. La sangre extraída se mantuvo en tubos de ensayo con heparina hasta el momento de su análisis (hematocrito y hemoglobina) y posterior procesamiento para obtención de plasma y hemolisado.

### *Extracción de plasma*

La sangre fue centrifugada a 1000 g durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido, correspondiente a la fracción plasmática, fue guardado en viales de plástico que se congelaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

### *Obtención de hemolisado*

Tras la obtención del plasma, el sedimento de glóbulos rojos fue resuspendido en solución salina al 9 ‰ y lavado mediante agitación suave por inversión, para no lisar los glóbulos rojos. Esta mezcla se centrifugó de nuevo (1000 g durante 10 minutos) y el sobrenadante obtenido fue eliminado, de forma que el sedimento restante volvió a ser sometido a este proceso de lavado dos veces más.

El precipitado final de glóbulos rojos fue diluido en proporción 1:3 con una solución tampón Tris-HCl 20 mM pH 8, que contenía Tritón X-100 al 0.1% y glicerol al 10%. Posteriormente se congeló a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas con el fin de lisar las células. Transcurrido este tiempo, la muestra descongelada se centrifugó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 5000 g durante 10 minutos. El sobrenadante, correspondiente al hemolisado, fue recuperado y almacenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis.

## TEJIDOS

Tras la toma de muestras de sangre, se diseccionó a los animales extrayéndoles (según el ensayo) el hígado, el corazón y una porción de músculo blanco del área dorsal anterior. Inmediatamente después de su extracción, todas las muestras fueron introducidas en nitrógeno líquido para evitar su deterioro, siendo posteriormente almacenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , donde permanecieron hasta su procesamiento. El procesado de los tejidos, previo a los análisis (excepto para el contenido en lípidos), comenzó con la descongelación de las muestras sumergidas en tampón Tris-HCl 100 mM pH 7.8, con Tritón X-100 al 0.1% y EDTA 0.1 mM, en cápsulas mantenidas en hielo picado. Todo el proceso de homogeneización se realizó en frío. En función de los análisis a los que sería sometida la muestra, el procesado fue como se describe a continuación:

*Análisis de glucógeno*

Una porción del hígado ó músculo blanco, aproximadamente 400 mg, fue homogeneizada con agua destilada fría añadida en proporción 1:5 (w/v). El homogenado obtenido se recuperó en su totalidad y sin ser centrifugado se almacenó en viales de plástico guardados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

*Resto de análisis*

Las muestras de hígado, músculo blanco y corazón se homogeneizaron en proporción 1:9 (w/v) con tampón Tris-HCl 100 mM pH 7.8 conteniendo además Tritón X-100 al 0.1% y EDTA 0.1 mM. El homogenado obtenido se centrifugó a 30000 g a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos y el sobrenadante resultante se recuperó y almacenó en viales de plástico guardados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

## 2. ÍNDICES BIOLÓGICOS

### 2.1. CRECIMIENTO Y EFICACIA ALIMENTICIA

El incremento de peso se expresó como incremento en porcentaje del peso medio inicial y se calculó según la siguiente expresión:

$$\Delta \text{Peso (\%)} = \frac{\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)}}{\text{Peso inicial (g)}} \times 100$$

La Tasa de Crecimiento Instantáneo, que refleja el porcentaje de crecimiento diario de los animales, se determinó según la siguiente expresión:

$$\text{TCI (\%)} = \frac{\text{Ln Peso final (g)} - \text{Ln Peso inicial (g)}}{\text{N}^{\circ} \text{ días}} \times 100$$



El índice de conversión nos permite evaluar la eficacia de las dietas experimentales para promover el crecimiento de los animales, de forma que este índice refleja la relación entre el peso ganado en función del alimento ingerido:

$$IC = \frac{\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)}}{\text{Alimento ingerido (g)}}$$

## 2.2. UTILIZACIÓN DIGESTIVA

La adición de un marcador inerte, no digestible, en las dietas, como es el caso del sesquióxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) nos permite calcular de forma indirecta los coeficientes de digestibilidad aparente (CDA) de los distintos componentes dietarios (proteína, lípidos, materia extractiva libre de nitrógeno, materia seca y materia orgánica). Estos CDA son calculados en base a los cambios en las proporciones del nutriente y el marcador en dieta y heces. Para ello se emplea la siguiente expresión:

$$CDA (\%) = 100 - \left( \frac{\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ en dieta} \times \% \text{ nutriente en heces}}{\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ en heces} \times \% \text{ nutriente en dieta}} \right) \times 100$$

## 2.3. UTILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA Y LOS LÍPIDOS

El incremento de peso experimentado por el animal puede deberse no sólo al buen uso de la proteína para fines estructurales, sino que los lípidos dietarios también contribuyen al incremento de peso mediante acumulación de grasa corporal. Por este motivo, es importante conocer en que medida proteínas y lípidos procedentes del alimento son utilizados por el animal.

El coeficiente más utilizado en la evaluación de la proteína para el crecimiento es el Coeficiente de Eficacia en Crecimiento, que relaciona la ganancia de peso con la ingesta proteica según la siguiente expresión:

$$CEC = \frac{\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)}}{\text{Proteína ingerida (g)}}$$

Otro de los índices que reflejan este aprovechamiento de la proteína es el dado en función de los valores de nitrógeno ingeridos y retenidos por el animal. Así, el Valor Productivo de la Proteína establece una relación porcentual entre la ganancia de nitrógeno corporal y el nitrógeno ingerido:

$$VPP (\%) = \frac{\text{N corporal final (g)} - \text{N corporal inicial (g)}}{\text{N ingerido (g)}} \times 100$$

Por su parte, el Valor Productivo de los Lípidos establece una relación porcentual entre la ganancia de lípidos corporales y los lípidos ingeridos:

$$VPL (\%) = \frac{\text{Lípidos corporales finales (g)} - \text{Lípidos corporales iniciales (g)}}{\text{Lípidos ingeridos (g)}} \times 100$$

## 2.4. ÍNDICES BIOMÉTRICOS

El Índice de Nutrición se calcula como la relación entre el peso y la longitud de los animales de acuerdo con la siguiente expresión:

$$IN (g \text{ cm}^{-3}) = \frac{\text{Peso (g)}}{(\text{Longitud total (cm)})^3}$$

La Relación Hepatosomática indica la relación porcentual existente entre el peso del hígado y el peso corporal. Una variación de los valores normales puede ser indicativo de alteraciones fisiológicas o metabólicas. Es calculada según la siguiente expresión:

$$\text{RHS (\%)} = \frac{\text{Peso hígado (g)}}{\text{Peso pez (g)}} \times 100$$

Por su parte, la Relación Digestivosomática indica la relación porcentual existente entre el peso del digestivo y el peso corporal:

$$\text{RDS (\%)} = \frac{\text{Peso digestivo (g)}}{\text{Peso pez (g)}} \times 100$$

El Índice de Grasa Perivisceral refleja la relación porcentual existente entre el peso de la grasa perivisceral y el peso corporal:

$$\text{IGP (\%)} = \frac{\text{Peso grasa perivisceral (g)}}{\text{Peso pez (g)}} \times 100$$

## 2.5. ÍNDICES HEMATOLÓGICOS

La concentración de hemoglobina corpuscular media expresa la concentración media de hemoglobina por cada 100 ml de glóbulos rojos aglutinados. Se calcula a partir de la relación entre la concentración de hemoglobina y el hematocrito:

$$\text{CHCM (g dl}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Hb (g dl}^{-1}\text{)}}{\text{H (\%)}} \times 100$$

### **3. MÉTODOS ANALÍTICOS**

Los métodos analíticos empleados para la realización del presente trabajo se indican a continuación. Una descripción detallada de la metodología se encuentra recogida en el Anexo I.

#### **3.1. ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN Y DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN CROMO**

Los análisis de composición (humedad, cenizas, lípidos, proteínas y MELN) de las materias primas, dietas, heces y animales se realizaron de acuerdo con los métodos establecidos por la AOAC (2000). El contenido en cromo de las muestras de dietas y heces fue determinado por espectrofotometría de absorción atómica (espectrofotómetro Pye Unicam SP-1900).

#### **3.2. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS**

Se determinó el hematocrito (Blaxhall y Daisley, 1973) y la concentración de hemoglobina (Van Kampen y Zijlstra, 1961).

#### **3.3. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS PLASMÁTICOS**

Se emplearon kits comerciales para la determinación de glucosa (Trinder, 1969), colesterol total (Meiattini et al., 1978), colesterol LDL (Okada et al., 1998), colesterol HDL (Naito, 1989), triglicéridos (Buccolo y David, 1973) y lípidos totales (Cottet y Etienne, 1965). El contenido en aminoácidos según el método descrito por Spies (1957).

#### **3.4. CONTENIDO EN PROTEÍNAS SOLUBLES**

Las proteínas solubles se determinaron por el método Bradford (1976).

### 3.5. DETERMINACIÓN DE GLUCÓGENO Y LÍPIDOS TISULARES

La técnica empleada para la determinación de la cantidad de glucógeno hepático y muscular fue una modificación a la original propuesta por Roehrig y Allred (1974). En el análisis del contenido lipídico del hígado y músculo blanco se empleó el método descrito por Folch et al. (1957).

### 3.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO

La determinación de la actividad de todos los enzimas analizados implicados en el metabolismo intermediario se realizó mediante lectura de cambios en la absorbancia de una “mezcla de reacción”, según el enzima a analizar, la cual se indica resumidamente en la Tabla III-2.

### 3.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

La actividad superóxido dismutasa (SOD, E.C. 1.15.1.1) se determinó según el método de McCord y Fridovich (1969). Para la identificación de los distintos isoenzimas de la SOD se empleó la técnica electroforética descrita por Ornstein (1964) y Davis (1964). Tras el proceso de desplazamiento electroforético, los geles fueron incubados y revelados siguiendo el protocolo descrito por Beauchamp y Fridovich (1971).

Las actividades catalasa (CAT, E.C. 1.11.1.6), glutatión peroxidasa (GPX, E.C. 1.11.1.9) y glutatión reductasa (GR, E.C. 1.6.4.2) se determinaron según los métodos descritos por Aebi (1984), Flohé y Günzler (1984) y el método modificado de Carlberg y Mannervik (1975), respectivamente.

Tabla III-2. Resumen de las condiciones para la determinación de la actividad de los distintos enzimas del metabolismo intermediario analizados. Los valores asociados a cada reactivo expresan la concentración en pocillo (mM) empleada para la determinación de la actividad enzimática.

	HK	HK IV	PK	FBPasa	GK	GDH	GOT	GPT	CS	G6PDH	EM	HOAD	ACOAT	$\beta$ -OHBDDH
$\lambda$ (nm)	340	340	340	340	340	340	340	340	412	340	340	340	313	340
T. Imidazol pH 7.4	50	50	50	42.84	50		50			50	50			
T. Imidazol pH 8					50				50			50	50	50
MgCl <sub>2</sub>	5	5	5	5	5					5	5		5	5
ClK			100											
Acetato amónico						100								
$\beta$ - mercaptoetanol				12										
DTNB									0.1					
Piridoxal fosfato							0.05	0.05						
Glucosa	1	100												
PEP			2		10									
FBP				0.5										
Glicerol					2.5									
$\alpha$ -KG						10	10	10						
L-Alanina								25						
L-Aspartato							25							
OAA									0.2					
Acetil-CoA									0.2					
G6P										1				
L-Malato											2			
Acetoacetil-CoA												0.1	0.14	
CoA													0.24	
Acetoacetato														2
NADP	0.4	0.4		0.5						2	0.4			
NADH			0.5		0.75	0.2	0.3	0.2				0.1		0.1
ATP	2.5	2.5			5									
ADP			1			1								
G6PDH	2	2		2										
LDH			2		4	2		2						
PGI				2										
PK					4									
MDH							3							

### 3.8. INDICADORES DE DAÑO OXIDATIVO

Entre los indicadores de daño oxidativo se pueden encontrar los niveles de peroxidación lipídica y el contenido de grupos carbonilo en proteínas.

La medida de los productos finales de la peroxidación lipídica es uno de los métodos más comúnmente utilizados como índice de daño oxidativo. Entre estos productos se encuentra el malondialdehído (MDA), cuya concentración fue determinada por el método propuesto por Buege y Aust (1978).

En el caso del daño oxidativo a proteínas se determinó el contenido de grupos carbonilo siguiendo el método de Levine et al. (1990).

## 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tratamiento estadístico de los datos se realizó utilizando el paquete informático SPSS 14.0.1 para Windows © 2006.

Para la estimación del posible efecto de los distintos tratamientos donde interviene un solo factor sobre los parámetros medidos se utilizó el Análisis de la Varianza de una vía (ANOVA). Para poner de manifiesto el efecto general y combinado de los distintos tratamientos donde interviene más de un factor sobre los parámetros medidos se aplicó el Análisis de la Varianza de dos vías. Cuando el análisis de la varianza confirmó la existencia de diferencias significativas en los parámetros, debido a los distintos tratamientos, se aplicó el test de Tukey HSD. El nivel de confianza considerado en las comparaciones fue del 95% ( $P < 0.05$ ), 99% ( $P < 0.01$ ) ó 99.9% ( $P < 0.001$ ), según los casos. Todos los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar.

En el apartado de material y métodos específico de cada ensayo se proporciona una descripción más detallada de la estadística aplicada en cada caso.







# IV- BLOQUES EXPERIMENTALES





# 1. BLOQUE EXPERIMENTAL IV-1. Empleo de niveles crecientes de vitamina C en dietas para dentón: efectos sobre el crecimiento, utilización nutritiva, metabolismo y estado redox.

## 1.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La vitamina C se considera una vitamina esencial para el crecimiento y mantenimiento óptimo de las funciones fisiológicas en la mayoría de los peces, ya que éstos carecen de la enzima gulonolactona oxidasa (E.C. 1.1.3.8) necesaria para el último paso en la síntesis del ácido ascórbico a partir del ácido glucorónico (Wilson, 1973; Jauncey et al., 1985; Dabrowski, 1991; Mæland y Waagbø, 1998; Fracalossi et al., 2001). Existen, no obstante, aisladas excepciones como la carpa (*Cyprinus carpio*), el carpín dorado (*Carassius auratus*), el mágil (*Mugil cephalus*) y distintas especies de esturión (*Acipenser fulvescens*, *Acipenser transmontanus* y *Acipenser baerii*) (Sato et al., 1978; Yamamoto et al., 1978; Soliman et al., 1985; Thomas et al., 1985; Moreau y Dabrowski, 1996; Moreau, et al., 1999; Xie et al., 2006), que poseen la capacidad de sintetizar esta vitamina.

Las principales funciones de la vitamina C se basan en sus propiedades de oxidación-reducción, debido a la interconversión reversible entre su forma reducida (ácido ascórbico) y su forma oxidada (ácido dehidroascórbico), ambas con actividad vitamínica (Figura IV-1).

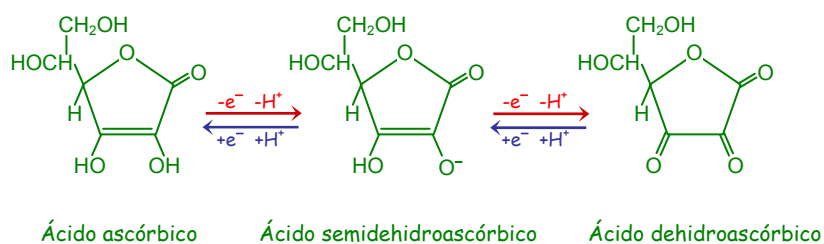


Figura IV-1. Interconversión de ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico.

Además de ser un excelente antioxidante hidrosoluble, la vitamina C interviene en muchos procesos vitales, como la hidroxilación de la lisina y la prolina y, consecuentemente, en la formación de colágeno y todas sus implicaciones estructurales, jugando un papel vital en el mantenimiento de la integridad del tejido conectivo, vasos sanguíneos, tejido óseo y en la reparación del tejido dañado. Igualmente, es importante en la transformación del colesterol en ácidos biliares, en la síntesis de catecolaminas, carnitina y de hormonas esteroides, en la reproducción (vitelogénesis y desarrollo embrionario), así como en la degradación de sustancias exógenas (contaminantes, medicamentos). Estas funciones han sido estudiadas en distintas especies de peces (Wilson y Poe, 1973; Ginter y Bobek, 1981; Sato et al., 1982; Sandnes, 1991; Le Grusse y Watier, 1993; Miyasaki et al., 1995; Ji et al., 2003a,b).

Por su esencialidad y su importancia vital, el suministro de esta vitamina en cantidades suficientes a través del alimento es fundamental, sobre todo cuando se consideran condiciones de cultivo acuícola. En este sentido, la vitamina C no suele ser incluida en las premezclas vitamínicas para la elaboración de piensos, debido a su baja estabilidad. Además, un factor importante a considerar es que, una vez en el agua, el ácido ascórbico es particularmente propenso a perderse por lixiviación (Hilton et al., 1977; Lovell y Lim, 1978; Soliman et al., 1987; Steffens, 1989; Shiau y Hsu, 1993). Estas dificultades pueden ser superadas mediante el empleo de mayores niveles dietéticos de vitamina C o bien utilizando formas protegidas o más estables.

Igualmente, no se puede olvidar que la vitamina C, al ser hidrosoluble, se caracteriza por no ser almacenada en cantidades significativas en los tejidos, siendo excretada en su mayor parte en la orina, lo cual hace necesario un aporte regular de esta vitamina para mantener los procesos bioquímicos y fisiológicos dependientes de ella.

Las necesidades de dicha vitamina pueden ser fácilmente determinadas mediante el empleo del modelo conocido como “broken line”, basado en la utilización de dietas con un contenido gradualmente creciente de un nutriente, en este caso de vitamina C, y considerando como valor requerido de dicho nutriente por la especie, el “punto de inflexión” en una curva dosis-respuesta.

El tipo de respuestas que pueden ser utilizadas como criterio para esta determinación son múltiples, por ejemplo, el crecimiento, eficiencia alimenticia, estado de las reservas vitamínicas en los tejidos, funciones bioquímicas e incluso tasas de supervivencia (Robbins et al., 1979; Forster y Ogata, 1998; Aguirre y Gatlin, 1999; Chou et al., 2001; Wang et al., 2003a; Lin y Shiau, 2005b).

Desde un punto de vista general, Merchie et al. (1997) establecieron que, para peces, las necesidades de vitamina C para un crecimiento y supervivencia normales en la fase de preengorde oscilan entre valores de 20 y 130 mg ácido ascórbico kg dieta<sup>-1</sup>, siempre que ésta sea suministrada en forma estable y biodisponible. Sin embargo, no se debe olvidar que estas necesidades varían de unas especies a otras e incluso dentro de la misma especie debido tanto a factores endógenos como exógenos. Entre ellos podemos encontrar la edad del animal (las necesidades son mayores durante las fases de desarrollo embrionario, larvario y de maduración sexual), su estado fisiológico, situaciones estresantes (incrementan los requerimientos de vitamina C), temperatura del agua (influye directamente sobre la tasa metabólica que a su vez determina el nivel requerido para esta vitamina), composición dietaria (interacciones entre los distintos componentes de la dieta), entre otros muchos (Hilton et al., 1978; Li y Lovell, 1985; Dabrowski, 1986, 1991; Fletcher, 1997; Merchie et al., 1997; Chien et al., 1999). Las necesidades mínimas para algunas especies de teleósteos se muestran en la Tabla IV-1.

En aquellos casos en los que se producen carencias de vitamina C, se pueden ver afectadas las tasas de crecimiento y supervivencia de los animales, así como el índice de conversión del alimento. En este sentido, Lee et al. (1998) y Wang et al. (2003b) observaron baja supervivencia, tasa de crecimiento y coeficiente de eficacia en crecimiento en *Sebastes schlegeli* (3-7 g peso inicial), tras ser alimentados con dietas deficientes en vitamina C (<50-75 mg ácido ascórbico kg dieta<sup>-1</sup>) durante 16 y 12 semanas, respectivamente. Similares resultados han sido observados en otras especies marinas, alimentadas con dietas carentes o deficientes en vitamina C, como *Oplegnathus fasciatus* (Ishibashi et al., 1992 Wang et al., 2003a), *Sciaenops ocellatus* (Aguirre y Gatlin, 1999), *Paralichthys olivaceus* (Teshima et al., 1993; Wang et al., 2002), *Lateolabrax japonicus* (Ai et al., 2004), *Epinephelus malabaricus* (Lin y Shiau, 2005a).

Tabla IV-1. Necesidades de vitamina C para un correcto crecimiento y supervivencia normal en algunas especies de teleósteos durante las fases iniciales de su desarrollo.

<b>Especie</b>	<b>mg AA kg dieta<sup>-1</sup></b>	<b>Referencia</b>
<i>Dicentrarchus labrax</i>	21	Merchie et al. (1996)
<i>Ictalurus punctatus</i>	10-25	Mustin y Lovell (1992)
	50-60	Wilson y Poe (1973) Lovell y Lim (1978)
<i>Lateolabrax japonicus</i>	53	Ai et al. (2004)
<i>Lates calcarifer</i>	10-20	Boonyaratpalin et al. (1994)
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	50-80	Halver et al. (1969)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	10-25	Dabrowski (1990) Cho y Cowey (1993)
	40-100	Hilton et al. (1978) Halver et al. (1969) Sato et al. (1982)
<i>Oplegnathus fasciatus</i>	118	Wang et al. (2003a)
	250	Ishibashi et al. (1992)
<i>O. niloticus</i> × <i>O. aureus</i>	15-20	Shiau y Hsu (1999)
	80	Shiau y Jan (1992) Shiau y Hsu (2002)
<i>Paralichthys olivavaceus</i>	28-47	Teshima et al. (1993)
	91-93	Wang et al. (2002)
<i>Pseudosciaena crocea</i>	28	Ai et al. (2006)
<i>Salmo salar</i>	10-20	Sandnes et al. (1992)
<i>Sciaenops ocellatus</i>	12-18	Aguirre y Gatlin (1999)
<i>Scophthalmus maximus</i>	20	Merchie et al. (1996)
<i>Sebastes schlegeli</i>	65	Bai y Lee (1996)
	103	Lee et al. (1998)

De acuerdo con lo anterior, Ortuño et al. (1999) encontraron una tasa de crecimiento reducida en doradas (*Sparus aurata*), con un peso inicial de 150 g, alimentadas durante 10 semanas con dietas carentes de vitamina C. Sin embargo, para esta misma especie, Henrique et al. (1998) no encontraron efecto alguno sobre la supervivencia ni sobre la tasa de crecimiento de los animales (peso inicial de 9 g) cuando fueron alimentados con dietas carentes de vitamina C durante 12 semanas, aunque sí en el índice de conversión y el coeficiente de eficacia en crecimiento, que empeoraron a medida que disminuía el contenido de esta vitamina (de 200-100 mg ácido ascórbico kg dieta<sup>-1</sup> en comparación con 25-0 mg ácido acórbico kg dieta<sup>-1</sup>). Similares resultados fueron obtenidos por Ji et al. (2003a) en *Acanthopagrus schlegeli*. Así, un tiempo de experimentación demasiado corto podría no ser suficiente para manifestar síntomas carenciales de vitamina C, ya que las reservas corporales de esta vitamina, procedentes de una alimentación previa, podrían no consumirse por completo durante ese periodo. Este hecho fue comprobado por Merchie et al. (1996), quienes encontraron que, en larvas de lubina (*Dicentrarchus labrax*) con un peso inicial de 12.1 mg, ni la tasa de crecimiento ni la supervivencia se vieron afectadas por la ausencia de vitamina C dietaria durante las tres primeras semanas de experimentación, mientras que cinco semanas después de esta primera fase, ambos parámetros se vieron fuertemente reducidos.

Otro de los síntomas de deficiencia de vitamina C es la anorexia, observada en distintos estudios (Lim y Lovell, 1978; Hilton et al., 1978; Shiau y Hsu, 1995a,b; Lee et al., 1998; Adham et al., 2000; Wang et al., 2002, 2003b). Sin embargo, Henrique et al. (1998) observaron en dorada una respuesta inversa, de modo que aquellos grupos alimentados con dietas deficientes en esta vitamina (< 25 mg ácido ascórbico kg dieta<sup>-1</sup>) presentaron una mayor ingesta que los grupos alimentados con las dietas que contenían cantidades mas elevadas de vitamina C (100-200 mg ácido ascórbico kg dieta<sup>-1</sup>). Trenzado et al. (2007) observaron una respuesta similar en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentada con dietas carentes de vitamina C. Estos resultados corroborarían que los peces son capaces de regular su ingesta para compensar la deficiencia generada en esta vitamina.



Igualmente, la deficiencia de vitamina C puede generar síntomas de tipo escorbútico debido a la alteración de la maduración del colágeno, escoliosis, lordosis, filamentos branquiales deformados, hemorragias, dificultad en la curación de heridas, depresión del sistema inmune, exoftalmia, anemia o letargia, que han sido descritos en varias especies de peces (Wilson et al., 1989; Aguirre y Gatlin, 1999; Wang et al., 2002, 2003b; Ai et al., 2004, 2006; Trenzado, 2004; Lin y Shiau, 2005a).

En cuanto al posible efecto beneficioso de la ingesta de altas dosis de vitamina C (900-3000 mg de ácido ascórbico kg dieta<sup>-1</sup>) para prevenir los efectos del estrés y mejorar la resistencia a diversas bacterias y patógenos, los resultados son contradictorios. Así, mientras algunos autores no observaron estos beneficios en especies como *Onchorhynchus nerea* (Bell et al., 1984), *Ictalurus punctatus* (Mazik et al., 1987) o *Salmo salar* (Thompson et al., 1993), otros sí los encontraron, incluso para especies en las que anteriormente no habían sido observados (Durve y Lovell, 1982; Liu et al., 1989; Navarre y Halver, 1989; Waagbo, 1997; Ortuño et al., 1999, 2001; Ai et al., 2004, 2006; Lin y Shiau, 2004). Los mecanismos propuestos para estas respuestas varían entre especies, aunque parece que la vitamina C estimula la actividad hemolítica, proliferación de linfocitos, fagocitosis y la producción de anticuerpos (Verlhac y Gabaudan, 1994, 1997).

Por lo que respecta a los efectos de la vitamina C sobre el metabolismo intermediario en peces, los estudios realizados son muy escasos, centrándose sólo en aspectos parciales. Así, la mayoría están enfocados hacia el metabolismo lipídico, como consecuencia del importante papel que juega la vitamina C en la síntesis de carnitina, molécula que es necesaria para la oxidación de los ácidos grasos (Ginter y Bobek, 1981; Miyasaki et al., 1995; Ji et al., 2003a,b; Harpaz, 2005). En ellos se concluye que, la deficiencia de vitamina C disminuye la síntesis de carnitina, lo cual conduciría a una reducción de la actividad lipolítica, afectando directamente al metabolismo de los triglicéridos (Miyasaki et al., 1995; Ji et al., 2003a,b). En cuanto a la información bibliográfica relacionada con el metabolismo proteico, se basa fundamentalmente en la determinación de la relación de la vitamina C con el nivel de proteínas plasmáticas, de forma que se ha observado que los niveles más altos de este metabolito corresponden a aquellos animales alimentados con mayores niveles de vitamina C (Hilton et al., 1979; Waagbo et al., 1993; De Menezes et al., 2006; Affonso et al., 2007; De Andrade et al., 2007).

Finalmente, los resultados de los escasos estudios realizados en peces para intentar determinar la conexión entre el metabolismo de los carbohidratos y la vitamina C, no permiten establecer una relación clara, ya que los parámetros analizados en *Brycon amazonicus* relacionados con este metabolismo (glucosa plasmática), no se vieron afectados por el empleo de dietas con distintos niveles de vitamina C (de 350 a 800 mg ácido ascórbico/kg dieta) (Affonso et al., 2007).

Por otro lado, es conocido el importante papel de la vitamina C como mecanismo de defensa antioxidante en peces, reaccionando directamente con especies de oxígeno reactivo (ROS) especialmente con el radical hidroxilo y el oxígeno singlete (Sandnes, 1991), además de con otros agentes oxidantes. En este sentido, Chien y Hwang (2001) observaron que los niveles de peroxidación lipídica en el hepatopáncreas de especímenes de *Terapon jarbua*, aumentaron en los animales alimentados sin vitamina C. Similares resultados han sido obtenidos por otros autores en especies como *Cyprinus carpio* (Hwang y Lin, 2002), *Oreochromis niloticus* × *O. aureus* (Shiau y Hsu, 2002), *Acanthopagrus schlegeli* y *Pagrus major* (Ji et al., 2003b).

Además de su intervención directa en la eliminación de especies de oxígeno reactivo, la vitamina C podría afectar indirectamente a la actividad de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa o glutatión peroxidasa. En este sentido, los centros funcionales de estas enzimas están constituidos por metales traza (Co, Fe, Mn, Se, Zn), cuya disponibilidad, tanto en cantidad como en forma (activa o no), se encuentra condicionada por la influencia ejercida por la presencia de vitamina C sobre su absorción, metabolismo y excreción (Jacob, 1995). Sin embargo, no existen estudios en peces que versen sobre la relación de estas interacciones con la actividad de los distintos enzimas antioxidantes, y aquellos dedicados a la interacción de la vitamina C con los metales traza no son concluyentes, ya que los resultados obtenidos son a veces contradictorios (Yamamoto et al., 1977, 1981; Hilton et al., 1978; Lanno et al., 1985; Maage et al., 1990; Andersen et al., 1996, 1998).

Por otra parte, es interesante destacar que la vitamina C juega un importante papel en la regeneración de la vitamina E a partir de sus formas oxidadas (radicales tocoferilo), de forma que se establece, además, un efecto sinérgico de protección antioxidante simultáneo entre ambas vitaminas (Tappel, 1962; Bendich, 1990; Sandnes, 1991; Jacob,

1995; Halliwell y Gutteridge, 2000). Este hecho ha sido reportado por distintos autores para especies como *Salmo salar* (Hamre, et al., 1997), *Seriola quinqueradiata* (Ito et al., 1999), *Acipenser fulvescens* (Moreau et al., 1999), *Oreochromis niloticus* × *O. aureus* (Shiau y Hsu, 2002), *Pagrus major* (Ji et al., 2003b) y *Oncorhynchus mykiss* (Trenzado, 2004).

Finalmente, hemos de señalar que además del papel antioxidante, la vitamina C también puede ejercer un efecto prooxidante. Este hecho va a depender de diversos factores, entre los que destacan los niveles de vitamina C y el estado y concentración de los metales de transición en el organismo, fundamentalmente hierro y cobre. Así, la vitamina C puede reducir  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  convirtiéndolos en  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{+}$  que pueden volver a intervenir en la reacción de Fenton (Figura II-13) generando radicales hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno (Niki, 1987; Halliwell, 1996). Este efecto ha sido observado por distintos autores, aunque mientras que algunos encontraron un efecto prooxidante a bajas concentraciones de vitamina C (Deng et al., 1978; Chen, 1988; Decker y Hultin, 1992) otros, por el contrario, lo detectaron a altas (Deng et al., 1977).

## 1.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 1.2.1. Dietas experimentales y alimentación

Para evaluar el efecto del nivel de inclusión dietaria de vitamina C en dentón se formularon y fabricaron 8 dietas experimentales, que diferían en el nivel de vitamina C añadida como ascorbil palmitato. Los macronutrientes dietarios se establecieron en una proporción del 53% de proteína, 18% de lípidos y 10% de carbohidratos (dextrina). Las dietas fueron diseñadas para contener  $21.5 \text{ MJ kg}^{-1}$  de energía bruta, con una relación proteína/energía de  $24.6 \text{ g MJ}^{-1}$ . Los niveles de vitamina C usados fueron: 0, 30, 60, 120, 240, 480, 960, 1920 mg ácido ascórbico  $\text{kg dieta}^{-1}$ . El tamaño de grano empleado en la fabricación de las dietas fue de 1.5 mm. Se tomaron muestras de los piensos elaborados para determinar su composición analítica. El sistema de elaboración, almacenamiento y técnicas analíticas de composición de los piensos se encuentran descritos en el apartado de material y métodos. La formulación y composición analítica de las dietas se reflejan en la Tabla IV-2. Los peces fueron alimentados manualmente 3 veces al día hasta saciedad aparente.

### 1.2.2. Animales y mantenimiento

Los animales utilizados en el presente ensayo fueron juveniles de dentón (*Dentex dentex*) de un peso medio inicial de  $2.05 \pm 0.02 \text{ g}$ . Los peces fueron distribuidos al azar en 8 lotes triplicados (22 individuos/lote), correspondientes a cada una de las dietas formuladas. Cada uno de los 24 lotes experimentales se alojó en tanques rectangulares blancos de fibra de vidrio, de 180 litros de capacidad, abastecidos con agua de mar (37 ‰ de salinidad), en circuito abierto y con un flujo continuo de  $6 \text{ l min}^{-1}$ . El fotoperiodo fue de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. La temperatura media del agua durante el experimento fue de  $26.0 \pm 1.0 \text{ °C}$ . El oxígeno disuelto fue siempre superior al 80% del nivel de saturación. Una vez alojados en los tanques, los peces fueron sometidos a una fase de adaptación a las condiciones del ensayo durante 1 semana. Posteriormente, comenzó la fase experimental que se prolongó durante 8 semanas.

Tabla IV-2. Formulación y composición analítica de las dietas experimentales del ensayo de vitamina C.

	DIETAS									
	C <sub>0</sub>	C <sub>30</sub>	C <sub>60</sub>	C <sub>120</sub>	C <sub>240</sub>	C <sub>480</sub>	C <sub>960</sub>	C <sub>1920</sub>		
<i>Ingredientes (g 100 g dieta ss<sup>-1</sup>)</i>										
Harina de pescado	63.41	63.41	63.41	63.41	63.41	63.41	63.41	63.41	63.41	63.41
Caseína	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00	12.00
Aceite de pescado	10.55	10.55	10.55	10.55	10.55	10.55	10.55	10.55	10.55	10.55
Lecitina	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Almidón pregelatinizado	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Dextrina	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Complemento mineral <sup>1</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Complemento vitamínico <sup>1</sup>	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Cloruro de colina	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Ascorbil palmitato (mg 100 g <sup>-1</sup> )	0.00	7.06	14.12	28.25	56.49	112.98	225.96	451.92		
Hidroxipropil-metil celulosa	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Celulosa microcristalina	1.24	1.23	1.23	1.23	1.21	1.18	1.13	1.01	0.79	
<i>Análisis de las dietas</i>										
Humedad (%)	5.52	5.70	6.19	5.27	5.79	5.67	4.77	4.56		
Proteína (% ss)	52.78	53.55	53.44	54.11	54.15	53.44	52.63	52.71		
Lípidos (% ss)	18.01	17.59	17.69	17.69	17.67	17.83	17.61	17.56		
Ceniza (% ss)	12.65	12.74	12.79	12.59	12.57	12.73	12.35	12.52		
MELN (% ss)	16.55	16.12	16.07	15.60	15.61	16.01	17.41	17.22		

<sup>1</sup> Composición de los complementos vitamínico y mineral indicada en Tabla III-1.

### 1.2.3. Toma de muestras, parámetros calculados y análisis realizados

Diariamente se controló la ingesta de alimento y se registró la mortalidad de cada uno de los lotes experimentales. Tanto al inicio como al final del experimento los peces fueron medidos (longitud total) y pesados individualmente. Se muestrearon para composición corporal un total de 10 peces al inicio del experimento y de 6 peces por dieta (2 por lote) al final del mismo. Al término del periodo experimental se procedió al sacrificio de los animales. Los hígados de todos los peces fueron pesados, y se almacenaron 5 hígados por lote (15 por dieta), para posteriores análisis.

La metodología empleada para la toma de muestras, así como para su procesamiento y análisis, y la descripción de los índices determinados se encuentran detalladas en el apartado de material y métodos general, así como en el Anexo I.

Se calcularon el incremento de peso y los índices IC, TCI, CEC, VPP, VPL, IN y RHS.

En las muestras hepáticas se determinaron las actividades de enzimas del metabolismo intermediario HK, HK-IV, PK, FBPasa, GK, GDH, GOT, GPT, CS, G6PDH, EM, HOAD, ACoAT y  $\beta$ -OHBDH. También se valoró el posible daño oxidativo hepático producido por las especies de oxígeno reactivo mediante indicadores de peroxidación lipídica (concentración de MDA) y de daño oxidativo a proteínas (contenido de grupos carbonilo). Se evaluaron igualmente las actividades de los enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPX y GR. Finalmente, también se analizó el patrón isoenzimático de la SOD hepática mediante técnicas electroforéticas.

Para la estimación del posible efecto de los distintos tratamientos se utilizó el Análisis de la Varianza de una vía (ANOVA), con un nivel de confianza del 95%. En los casos en los que el análisis de la varianza confirmó la existencia de diferencias significativas, se aplicó el test de Tukey HSD. Las necesidades de vitamina C fueron estimadas mediante el método de regresión "broken line" basado en los datos de crecimiento de los animales (Robbins et al., 1979).

### 1.3. RESULTADOS

#### 1.3.1. Crecimiento e índices biométricos

En la Tabla IV-3 se muestran los resultados de crecimiento e índices biométricos en juveniles de dentón alimentados con las distintas dietas experimentales.

Las dietas C<sub>0</sub>, C<sub>30</sub>, C<sub>60</sub> y C<sub>120</sub> promovieron los peores resultados en crecimiento (incremento de peso y TCI). Por su parte, los animales alimentados con la dieta C<sub>240</sub> mostraron un valor que podría ser considerado de “transición” hacia los mejores resultados obtenidos con las dietas de mayor contenido en vitamina C (C<sub>480</sub>, C<sub>960</sub> y C<sub>1920</sub>).

No se observó ninguna influencia estadísticamente significativa del nivel de vitamina C dietaria sobre el IN. En cuanto a los valores de RHS, aunque la estadística no muestra una agrupación tan clara como en el caso del crecimiento, se pueden observar dos grupos, uno con valores más elevados de RHS correspondiente a los dentones alimentados con las cuatro dietas de menor contenido en vitamina C, y otro cuyas RHS fueron más bajas correspondiente a las cuatro dietas restantes.

Tabla IV-3. Crecimiento e índices biométricos en juveniles de dentón alimentados con dietas con distintos niveles de vitamina C.

<b>Dieta</b>	<b>Peso Medio Inicial (g)</b>	<b>Peso Medio Final (g)</b>	<b>Δ Peso (%)</b>	<b>TCI (%)</b>	<b>IN (g cm<sup>-3</sup>)</b>	<b>RHS (%)</b>
<b>C<sub>0</sub></b>	2.54 ± 0.53	11.25 ± 2.96 <sup>a</sup>	335.2 ± 28.8 <sup>a</sup>	2.67 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.47 ± 0.03	1.79 ± 0.16 <sup>b</sup>
<b>C<sub>30</sub></b>	2.05 ± 0.08	11.20 ± 2.43 <sup>a</sup>	441.2 ± 97.4 <sup>ab</sup>	3.01 ± 0.31 <sup>ab</sup>	1.49 ± 0.03	1.45 ± 0.08 <sup>a</sup>
<b>C<sub>60</sub></b>	2.01 ± 0.04	10.60 ± 1.91 <sup>a</sup>	424.5 ± 84.7 <sup>ab</sup>	2.97 ± 0.28 <sup>ab</sup>	1.46 ± 0.06	1.51 ± 0.07 <sup>ab</sup>
<b>C<sub>120</sub></b>	1.99 ± 0.04	10.38 ± 0.57 <sup>a</sup>	421.9 ± 20.3 <sup>ab</sup>	3.00 ± 0.07 <sup>ab</sup>	1.49 ± 0.03	1.47 ± 0.07 <sup>ab</sup>
<b>C<sub>240</sub></b>	2.09 ± 0.03	16.22 ± 2.63 <sup>ab</sup>	673.9 ± 118.0 <sup>b</sup>	3.67 ± 0.30 <sup>bc</sup>	1.53 ± 0.03	1.35 ± 0.07 <sup>a</sup>
<b>C<sub>480</sub></b>	2.09 ± 0.02	23.48 ± 0.75 <sup>b</sup>	1024.0 ± 41.9 <sup>c</sup>	4.40 ± 0.07 <sup>c</sup>	1.58 ± 0.02	1.28 ± 0.04 <sup>a</sup>
<b>C<sub>960</sub></b>	2.00 ± 0.06	23.06 ± 1.04 <sup>b</sup>	1052.0 ± 50.2 <sup>c</sup>	4.44 ± 0.08 <sup>c</sup>	1.56 ± 0.02	1.33 ± 0.06 <sup>a</sup>
<b>C<sub>1920</sub></b>	2.16 ± 0.14	24.13 ± 0.86 <sup>b</sup>	1021.4 ± 31.2 <sup>c</sup>	4.39 ± 0.05 <sup>c</sup>	1.57 ± 0.02	1.23 ± 0.04 <sup>a</sup>

Los resultados son media ± E.S. de tres lotes experimentales, excepto en IN y RHS donde n = supervivientes. Diferentes superíndices en una misma columna indican diferencias significativas (P<0.05) entre dietas.

### 1.3.2. Ingesta, utilización nutritiva del alimento y supervivencia

Los resultados de ingesta, utilización nutritiva del alimento y supervivencia se encuentran reflejados en la Tabla IV-4. El IC fue peor ( $P < 0.05$ ) en los dentones alimentados con las cuatro dietas de menor contenido en vitamina C, y es la dieta C<sub>240</sub>, al igual que ocurría con los resultados de crecimiento, una dieta de “transición” hacia los mejores IC observados en los animales que ingirieron las dietas C<sub>480</sub>, C<sub>960</sub> y C<sub>1920</sub>. Niveles altos de vitamina C reflejaron un claro efecto ( $P < 0.05$ ) sobre el resto de los índices de utilización nutritiva de la dieta. Así, los mejores resultados para VPP y VPL se pueden observar en los tratamientos C<sub>480</sub>, C<sub>960</sub> y C<sub>1920</sub>. Igualmente, los valores más elevados de CEC correspondieron a las dietas C<sub>240</sub>, C<sub>480</sub>, C<sub>960</sub> y C<sub>1920</sub>. Aunque la mortalidad media fue superior en las dietas con menor contenido en vitamina C (C<sub>0</sub>, C<sub>30</sub> y C<sub>60</sub>), no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de supervivencia de los peces entre tratamientos.

Tabla IV-4. Ingesta, utilización nutritiva de la dieta y supervivencia en juveniles de dentón alimentados con dietas con distintos niveles de vitamina C.

<b>Dieta</b>	<b>Ingesta</b> (g 100 g pez <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	<b>IC</b>	<b>CEC</b>	<b>VPP</b> (%)	<b>VPL</b> (%)	<b>Supervivencia</b> (%)
<b>C<sub>0</sub></b>	3.63 ± 0.62	0.67 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.10 <sup>a</sup>	19.11 ± 0.28 <sup>ab</sup>	10.63 ± 1.44 <sup>a</sup>	53.03 ± 15.38
<b>C<sub>30</sub></b>	3.76 ± 0.30	0.67 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.05 ± 0.04 <sup>a</sup>	23.42 ± 1.15 <sup>ab</sup>	17.55 ± 1.18 <sup>a</sup>	50.04 ± 16.87
<b>C<sub>60</sub></b>	3.62 ± 0.51	0.71 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.53 ± 0.13 <sup>bc</sup>	21.91 ± 1.44 <sup>ab</sup>	14.28 ± 0.94 <sup>a</sup>	33.28 ± 6.60
<b>C<sub>120</sub></b>	3.43 ± 0.29	0.73 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.35 ± 0.13 <sup>ab</sup>	13.81 ± 0.28 <sup>a</sup>	7.40 ± 0.83 <sup>a</sup>	63.58 ± 12.12
<b>C<sub>240</sub></b>	2.88 ± 0.23	0.98 ± 0.11 <sup>ab</sup>	2.01 ± 0.04 <sup>d</sup>	20.03 ± 1.68 <sup>ab</sup>	13.98 ± 3.29 <sup>a</sup>	75.81 ± 5.46
<b>C<sub>480</sub></b>	2.93 ± 0.14	1.04 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.93 ± 0.10 <sup>cd</sup>	35.34 ± 2.84 <sup>c</sup>	39.41 ± 8.37 <sup>b</sup>	78.83 ± 1.52
<b>C<sub>960</sub></b>	2.83 ± 0.06	1.08 ± 0.02 <sup>b</sup>	2.00 ± 0.04 <sup>d</sup>	30.59 ± 1.55 <sup>bc</sup>	27.86 ± 3.43 <sup>ab</sup>	62.11 ± 11.44
<b>C<sub>1920</sub></b>	2.75 ± 0.10	1.11 ± 0.04 <sup>b</sup>	2.05 ± 0.07 <sup>d</sup>	38.71 ± 5.36 <sup>c</sup>	40.38 ± 6.58 <sup>b</sup>	65.13 ± 5.25

Los resultados son media ± E.S. de tres lotes experimentales. Diferentes superíndices en una misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre dietas.



### 1.3.3. Composición corporal

Los resultados de composición corporal de los juveniles de dentón alimentados con las distintas dietas se muestran en la Tabla IV-5. Los animales alimentados con los tres niveles superiores de vitamina C presentaron los valores significativamente más bajos de humedad y altos de grasa, en relación con las cuatro dietas de menor contenido de vitamina C, mientras que los resultados de la dieta C<sub>240</sub> volvieron a ser un punto intermedio entre los dos grupos diferenciados. En el caso del contenido en cenizas, también se podrían diferenciar dos grupos. Así, los dentones alimentados con las dietas C<sub>0</sub>, C<sub>30</sub>, C<sub>60</sub> y C<sub>120</sub> presentaron mayor contenido en cenizas, mientras que en los tratamientos C<sub>240</sub>, C<sub>480</sub>, C<sub>960</sub> y C<sub>1920</sub> se dieron los niveles más bajos. No se observó ningún efecto de los distintos tratamientos sobre el contenido en proteína corporal.

Tabla IV-5. Composición corporal de juveniles de dentón alimentados con dietas con distintos niveles de vitamina C.

<b>Dieta</b>	<b>Humedad</b> (%)	<b>Ceniza</b> (% ss)	<b>Grasa</b> (% ss)	<b>Proteína</b> (% ss)
<b>C<sub>0</sub></b>	78.10 ± 0.54 <sup>c</sup>	21.86 ± 0.67 <sup>d</sup>	11.36 ± 0.91 <sup>a</sup>	60.39 ± 0.55
<b>C<sub>30</sub></b>	76.84 ± 0.48 <sup>c</sup>	20.34 ± 0.38 <sup>cd</sup>	13.85 ± 0.35 <sup>ab</sup>	58.22 ± 0.32
<b>C<sub>60</sub></b>	76.73 ± 0.35 <sup>c</sup>	20.10 ± 0.38 <sup>cd</sup>	12.63 ± 0.39 <sup>ab</sup>	59.53 ± 0.64
<b>C<sub>120</sub></b>	76.67 ± 0.16 <sup>c</sup>	19.99 ± 0.51 <sup>cd</sup>	11.44 ± 0.48 <sup>a</sup>	60.90 ± 1.05
<b>C<sub>240</sub></b>	75.65 ± 0.47 <sup>bc</sup>	18.70 ± 0.32 <sup>abc</sup>	15.04 ± 0.36 <sup>abc</sup>	60.30 ± 0.19
<b>C<sub>480</sub></b>	72.52 ± 0.45 <sup>a</sup>	16.96 ± 0.63 <sup>a</sup>	19.46 ± 1.31 <sup>c</sup>	57.55 ± 1.67
<b>C<sub>960</sub></b>	73.44 ± 0.63 <sup>ab</sup>	18.18 ± 0.37 <sup>abc</sup>	16.76 ± 1.91 <sup>bc</sup>	59.02 ± 1.24
<b>C<sub>1920</sub></b>	73.47 ± 1.15 <sup>ab</sup>	17.84 ± 0.22 <sup>ab</sup>	19.05 ± 0.27 <sup>c</sup>	59.38 ± 0.63

Los resultados son media ± E.S. (n = 6). Diferentes superíndices en una misma columna indican diferencias significativas (P<0.05) entre dietas.

### 1.3.4. Metabolismo intermediario

En la Tabla IV-6 se recogen las actividades específicas de los enzimas del metabolismo intermediario en hígado de juveniles de dentón alimentados con distintos niveles de vitamina C.

En general, se puede observar que la actividad de la mayoría de los enzimas implicados en las principales rutas del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas se vio afectada por los distintos tratamientos dietarios. Así, a excepción de HK-IV y GOT, el resto reflejó diferencias significativas entre los tratamientos. En los enzimas HK, PK, GK, GDH, GPT, G6PDH y EM se pueden volver a diferenciar los dos grupos generados por el efecto de los niveles de vitamina C, distinguiendo entre actividades enzimáticas más bajas en los hígados de dentones alimentados con las dietas de menor contenido en vitamina C (C<sub>0</sub>, C<sub>30</sub>, C<sub>60</sub>) y más elevadas para el resto (C<sub>240</sub>, C<sub>480</sub>, C<sub>960</sub> y C<sub>1920</sub>). En el caso del tratamiento C<sub>120</sub>, las actividades de GDH, G6PDH y EM fueron similares a aquellas encontradas en los hígados de dentón alimentados con bajos niveles de vitamina C, mientras que para GPT y HK los valores fueron similares a los observados en los tratamientos con mayores niveles de vitamina C. Para las actividades PK y GK, los valores de las actividades correspondientes a la dieta C<sub>120</sub> podrían ser considerados como un punto intermedio entre los dos grupos diferenciados.

Las enzimas FBPasa, CS, HOAD, ACoAT y  $\beta$ -OHBDH también exhibieron diferencias significativas entre tratamientos, aunque en estos casos no fue tan clara la distinción estadística entre los dos grupos que venimos comentando. Sí se observaron, sin embargo, niveles más altos de actividad FBPasa y CS, y más bajos en HOAD y ACoAT, para aquellos tratamientos de menor contenido en vitamina C.

Tabla IV-6. Actividad específica de enzimas del metabolismo intermediario en hígado de juveniles de dentón alimentados con dietas con distintos niveles de vitamina C. Los datos se expresan como mU mg proteína<sup>-1</sup>.

Dieta	HK	HK-IV	PK	FBPasa	GK	GDH	GOT	GPT	CS	G6PDH	EM	HOAD	ACOAT	β-OHBDH
C <sub>0</sub>	1.85 <sup>ab</sup>	2.56	2.13 <sup>a</sup>	101.27 <sup>c</sup>	6.76 <sup>a</sup>	65.96 <sup>a</sup>	1433.8	59.51 <sup>a</sup>	57.53 <sup>ab</sup>	2.27 <sup>a</sup>	1.38 <sup>a</sup>	16.93 <sup>abc</sup>	44.29 <sup>bcd</sup>	2.36 <sup>bc</sup>
	± 0.10	± 0.22	± 0.41	± 3.79	± 0.30	± 24.15	± 95.5	± 0.55	± 6.29	± 0.18	± 0.31	± 3.46	± 1.02	± 0.24
C <sub>30</sub>	0.82 <sup>a</sup>	3.02	4.39 <sup>a</sup>	83.81 <sup>bc</sup>	8.64 <sup>ab</sup>	45.00 <sup>a</sup>	1269.9	48.50 <sup>a</sup>	90.21 <sup>c</sup>	5.97 <sup>a</sup>	0.50 <sup>a</sup>	14.54 <sup>abc</sup>	46.14 <sup>cde</sup>	3.21 <sup>c</sup>
	± 0.07	± 0.04	± 0.80	± 7.12	± 0.47	± 5.31	± 97.7	± 1.44	± 5.15	± 1.65	± 0.02	± 2.48	± 0.44	± 0.15
C <sub>60</sub>	1.49 <sup>a</sup>	3.39	3.75 <sup>a</sup>	103.59 <sup>c</sup>	7.36 <sup>a</sup>	53.67 <sup>a</sup>	1365.6	51.93 <sup>a</sup>	56.66 <sup>ab</sup>	5.37 <sup>a</sup>	2.98 <sup>a</sup>	12.98 <sup>ab</sup>	36.65 <sup>abc</sup>	3.00 <sup>bc</sup>
	± 0.08	± 0.49	± 0.19	± 11.25	± 0.56	± 4.24	± 18.6	± 0.96	± 4.42	± 0.97	± 0.76	± 1.61	± 0.42	± 0.50
C <sub>120</sub>	3.31 <sup>c</sup>	3.14	8.92 <sup>b</sup>	69.19 <sup>ab</sup>	11.66 <sup>bc</sup>	47.89 <sup>a</sup>	1304.6	521.03 <sup>b</sup>	67.81 <sup>bc</sup>	4.84 <sup>a</sup>	1.78 <sup>a</sup>	11.90 <sup>a</sup>	32.51 <sup>a</sup>	1.93 <sup>ab</sup>
	± 0.58	± 0.48	± 0.25	± 3.52	± 0.06	± 18.27	± 117.3	± 49.86	± 1.68	± 0.10	± 0.38	± 1.08	± 0.11	± 0.31
C <sub>240</sub>	3.02 <sup>bc</sup>	2.57	16.27 <sup>c</sup>	84.43 <sup>bc</sup>	14.32 <sup>cd</sup>	344.61 <sup>b</sup>	1196.0	588.16 <sup>b</sup>	47.38 <sup>ab</sup>	42.97 <sup>b</sup>	8.44 <sup>b</sup>	19.73 <sup>abc</sup>	33.53 <sup>ab</sup>	2.64 <sup>bc</sup>
	± 0.10	± 0.38	± 0.32	± 4.26	± 0.48	± 15.05	± 49.9	± 8.89	± 4.00	± 1.15	± 0.44	± 1.98	± 0.55	± 0.18
C <sub>480</sub>	3.41 <sup>c</sup>	3.15	19.66 <sup>cd</sup>	92.04 <sup>bc</sup>	18.30 <sup>c</sup>	319.11 <sup>b</sup>	1139.2	529.93 <sup>b</sup>	49.60 <sup>ab</sup>	39.58 <sup>b</sup>	8.14 <sup>b</sup>	21.86 <sup>abc</sup>	56.94 <sup>c</sup>	1.88 <sup>ab</sup>
	± 0.22	± 0.03	± 1.51	± 0.89	± 1.41	± 5.38	± 63.5	± 14.40	± 3.37	± 3.97	± 0.61	± 1.90	± 2.35	± 0.26
C <sub>960</sub>	4.97 <sup>d</sup>	3.52	19.83 <sup>cd</sup>	47.09 <sup>a</sup>	16.41 <sup>de</sup>	320.75 <sup>b</sup>	1077.6	525.02 <sup>b</sup>	44.17 <sup>a</sup>	42.73 <sup>b</sup>	8.08 <sup>b</sup>	22.49 <sup>bc</sup>	55.61 <sup>de</sup>	0.95 <sup>a</sup>
	± 0.08	± 0.29	± 1.26	± 3.21	± 1.42	± 13.36	± 44.8	± 27.66	± 2.60	± 3.59	± 0.89	± 1.58	± 4.30	± 0.10
C <sub>1920</sub>	4.84 <sup>d</sup>	3.34	20.84 <sup>d</sup>	54.44 <sup>a</sup>	13.96 <sup>cd</sup>	319.66 <sup>b</sup>	1091.9	590.86 <sup>b</sup>	46.40 <sup>ab</sup>	43.81 <sup>b</sup>	7.89 <sup>b</sup>	24.08 <sup>c</sup>	56.06 <sup>c</sup>	2.86 <sup>bc</sup>
	± 0.21	± 0.69	± 1.26	± 2.00	± 0.42	± 24.89	± 74.1	± 1.54	± 6.96	± 0.64	± 1.12	± 1.73	± 4.42	± 0.09

Los resultados son media ± E.S. (n = 3). Diferentes superíndices en una misma columna indican diferencias significativas (P<0.05) entre dietas.

### 1.3.5. Estado redox

Las actividades específicas de los enzimas hepáticos CAT y GPX fueron las únicas, de los cuatro enzimas antioxidantes analizados, que mostraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos dietarios, de forma que fue la dieta carente de vitamina C la que promovió los mayores niveles de actividad (Tabla IV-7).

Tabla IV-7. Actividad específica de enzimas antioxidantes en hígado de juveniles de dentón alimentados con dietas con distintos niveles de vitamina C.

<b>Dieta</b>	<b>SOD</b> (U mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>CAT</b> (U mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>GPX</b> (mU mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>GR</b> (mU mg proteína <sup>-1</sup> )
<b>C<sub>0</sub></b>	364.9 ± 11.7	725.9 ± 14.2 <sup>d</sup>	192.2 ± 7.4 <sup>d</sup>	13.00 ± 1.24
<b>C<sub>30</sub></b>	370.6 ± 65.0	405.5 ± 10.9 <sup>bc</sup>	129.0 ± 11.7 <sup>bc</sup>	13.37 ± 1.16
<b>C<sub>60</sub></b>	363.3 ± 110.5	461.5 ± 43.5 <sup>c</sup>	118.2 ± 1.6 <sup>ab</sup>	12.18 ± 0.88
<b>C<sub>120</sub></b>	413.2 ± 1.00	377.7 ± 5.5 <sup>abc</sup>	109.5 ± 9.8 <sup>ab</sup>	13.57 ± 0.94
<b>C<sub>240</sub></b>	347.4 ± 12.7	285.5 ± 12.6 <sup>a</sup>	125.3 ± 4.2 <sup>bc</sup>	10.75 ± 0.22
<b>C<sub>480</sub></b>	341.0 ± 25.9	359.9 ± 19.8 <sup>abc</sup>	128.2 ± 2.2 <sup>bc</sup>	11.99 ± 0.56
<b>C<sub>960</sub></b>	392.7 ± 30.6	330.7 ± 20.6 <sup>ab</sup>	158.2 ± 0.1 <sup>c</sup>	11.81 ± 0.21
<b>C<sub>1920</sub></b>	389.0 ± 9.3	359.8 ± 36.5 <sup>abc</sup>	88.2 ± 7.6 <sup>a</sup>	10.08 ± 0.26

Los resultados son media ± E.S. (n = 3). Diferentes superíndices en una misma columna indican diferencias significativas (P<0.05) entre dietas.

Finalmente, en relación con el daño oxidativo a lípidos y proteínas en hígado, los resultados reflejados en la Tabla IV-8 muestran mayores niveles de MDA en los dentones alimentados con las tres dietas de menor contenido en vitamina C (C<sub>0</sub>, C<sub>30</sub>, C<sub>60</sub>), siendo intermedios en los tratamientos C<sub>120</sub> y C<sub>240</sub> e inferiores en las dietas C<sub>480</sub>, C<sub>960</sub> y C<sub>1920</sub>. En el caso del daño oxidativo a proteínas, el mayor contenido en grupos carbonilo se observó en las cuatro dietas de menor nivel de vitamina C, siendo significativamente menores para las cuatro dietas de mayor contenido en esta vitamina.

Tabla IV-8. Indicadores de daño oxidativo a lípidos y proteínas hepáticas de juveniles de dentón alimentados con dietas con distintos niveles de vitamina C.

Dieta	Peroxidación lipídica	Grupos carbonilo
	(nmol MDA g tejido <sup>-1</sup> )	(nmol C=O mg proteína <sup>-1</sup> )
C <sub>0</sub>	439.52 ± 34.59 <sup>cd</sup>	5.12 ± 0.43 <sup>b</sup>
C <sub>30</sub>	369.59 ± 21.47 <sup>bc</sup>	5.31 ± 0.32 <sup>b</sup>
C <sub>60</sub>	585.00 ± 48.80 <sup>d</sup>	9.74 ± 0.59 <sup>c</sup>
C <sub>120</sub>	252.45 ± 42.59 <sup>b</sup>	8.35 ± 0.32 <sup>c</sup>
C <sub>240</sub>	245.95 ± 35.02 <sup>b</sup>	0.72 ± 0.11 <sup>a</sup>
C <sub>480</sub>	54.41 ± 4.80 <sup>a</sup>	1.91 ± 0.41 <sup>a</sup>
C <sub>960</sub>	70.71 ± 0.39 <sup>a</sup>	1.72 ± 0.33 <sup>a</sup>
C <sub>1920</sub>	43.46 ± 5.75 <sup>a</sup>	2.01 ± 0.49 <sup>a</sup>

Los resultados son media ± E.S. (n = 3). Diferentes superíndices en una misma columna indican diferencias significativas (P<0.05) entre dietas.

### 1.3.6. Patrón isoenzimático de la SOD

La Figura IV-2 muestra el patrón isoenzimático de la SOD hepática en los distintos grupos experimentales. Como se puede observar, existen dos isoenzimas SOD de carácter constitutivo a nivel hepático en todos los casos, de forma que estos isoenzimas corresponderían a las isoformas CuZn-SOD I y Mn-SOD, esta última puesta de manifiesto tras inhibición con cianuro. No obstante, en el caso de las dietas C<sub>0</sub>, C<sub>240</sub>, C<sub>480</sub>, C<sub>960</sub> y C<sub>1920</sub>, también se observa un tercer isoenzima SOD, en este caso de carácter regulable, que correspondería con la isoforma CuZn-SOD II.

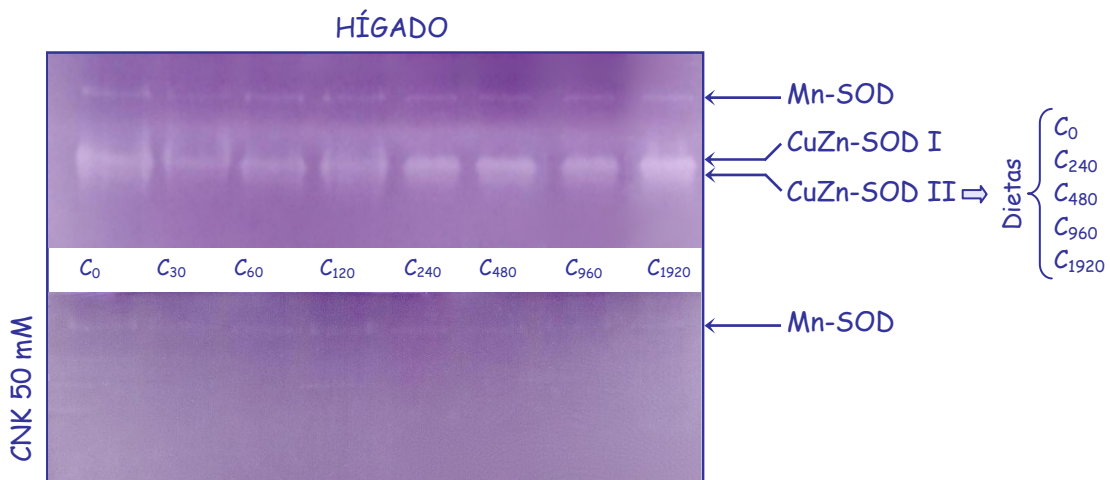


Figura IV-2. Patrón isoenzimático de la SOD en hígado de juveniles de dentón alimentados con distintos niveles de vitamina C. La fotografía inferior correspondería al gel incubado para inhibición en solución 50 mM CNK.

## 1.4. DISCUSIÓN

La vitamina C se considera un nutriente esencial para la mayoría de los teleósteos. Entre las principales consecuencias de su deficiencia podemos encontrar una baja tasa de crecimiento de los animales. Así, los resultados del presente estudio ponen de manifiesto este efecto en juveniles de dentón, donde se obtuvieron valores bajos de incremento de peso y TCI en los animales alimentados con las dietas de menor contenido en vitamina C (C<sub>0</sub>, C<sub>30</sub>, C<sub>60</sub> y C<sub>120</sub>). De igual forma, numerosos estudios en diversas especies también evidencian este efecto (Ishibashi et al., 1992; Teshima et al., 1993; Lee et al., 1998; Aguirre y Gatlin, 1999; Ortuño et al., 1999; Wang et al., 2002, 2003a,b; Ai et al., 2004; Lin y Shiau, 2005a; De Menezes et al., 2006).

Es importante resaltar que el tiempo de experimentación es un factor clave para poder determinar las consecuencias de un tratamiento experimental concreto. Así, la duración del presente ensayo y del resto de estudios anteriormente referenciados parece haber sido suficientemente prolongada para permitir la aparición de efectos sobre el crecimiento. Sin embargo, otros autores no observaron ningún efecto sobre este parámetro como consecuencia de la deficiencia de vitamina C (Henrique et al., 1998, Ji et al., 2003a; Ai et al., 2006; De Andrade et al., 2007). En este sentido, los autores de estos estudios argumentan que, considerando las condiciones experimentales y la edad de los peces empleados en cada uno de ellos, el período de experimentación probablemente fue demasiado corto. Como consecuencia de esta limitación temporal, puede que no se consumieran completamente las reservas de ácido ascórbico presentes en los animales procedentes de una alimentación previa, además de no tener suficiente tiempo para desarrollar síntomas carenciales.

Los resultados observados en el presente estudio podrían estar justificados por diferentes motivos. Así, no se puede olvidar el importante rol que juega la vitamina C en la formación de colágeno y en todas sus implicaciones estructurales, tales como la integridad del tejido conectivo, vasos sanguíneos, tejido óseo etc. (Halver et al., 2000). Aunque en el presente ensayo no se han realizado análisis del contenido en colágeno de los animales, otros autores han indicado para diversas especies que una alimentación con dietas carentes de vitamina C produce un crecimiento reducido de los animales, presentándose, además, un menor contenido en colágeno óseo, así como de sus

precursores, prolina e hidroxiprolina, respecto a aquellos individuos alimentados con dietas que cubren sus necesidades de vitamina C. Estos resultados han sido observados en *O. mykiss* (Albrektsen et al., 1988), *Ictalurus punctatus* (Mustin y Lovell, 1992), *Oreochromis spilurus* (Al-Amoudi et al., 1992), *Cyprinus carpio* (Hwang y Lin, 2002) y *Pseudosciaena crocea* (Ai et al., 2006).

Por otro lado, considerando que la vitamina C es un importante agente antioxidante, otro de los motivos que influirían en el crecimiento de los animales serían los daños oxidativos generados como consecuencia de su déficit. Este hecho podría poner en peligro la integridad física del animal, así como producir alteraciones en su metabolismo, afectando directamente su crecimiento (Ikeda et al., 1997; Adham et al., 2000).

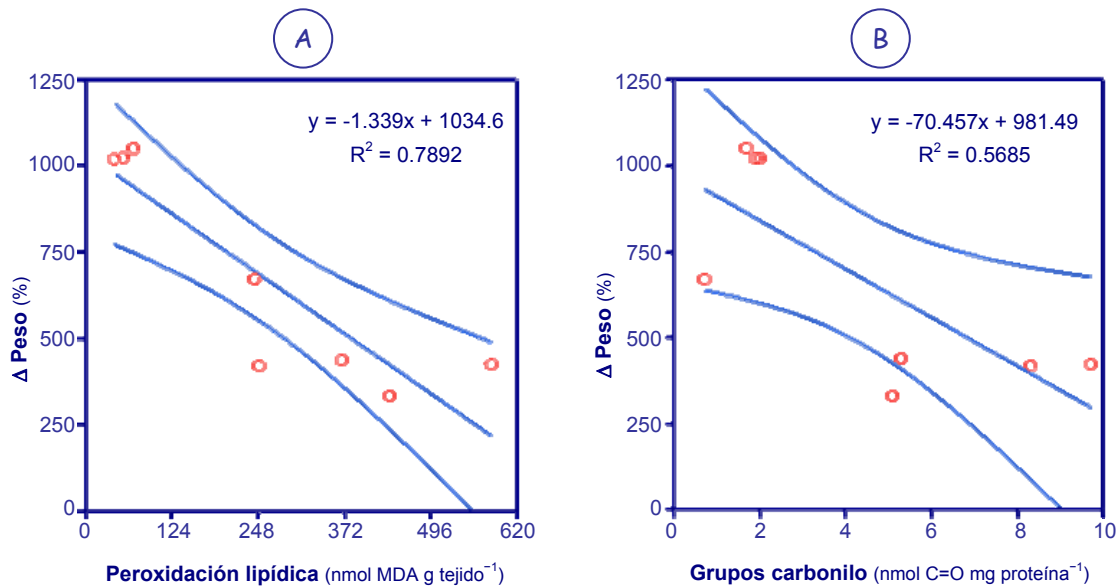


Figura IV-3. Regresión lineal entre las variables  $\Delta$  Peso y peroxidación lipídica (A) o contenido en grupos carbonilo (B) en hígado de dentón alimentados con dietas con distintos niveles de vitamina C, donde se muestra el intervalo de predicción de la media con un 95% de confianza.

Los resultados obtenidos en la actividad de enzimas claves del metabolismo intermediario y en las antioxidantes, así como los indicadores de daño oxidativo analizados, que serán discutidos con mayor detalle más adelante, podrían confirmar este hecho. En este sentido, las Figuras IV-3, A y B, muestran una clara relación entre los daños generados sobre lípidos y proteínas a nivel hepático como consecuencia del déficit de vitamina C y el crecimiento obtenido para los distintos grupos de dentones

alimentados con esas dietas. Estas alteraciones metabólicas y el estrés generado por el déficit vitamínico, obligarían a destinar parte de la energía de los nutrientes a sintetizar y renovar los tejidos dañados, con los subsecuentes efectos de reducción de la energía disponible para el crecimiento de los animales.

Por otra parte, basándonos en los valores de crecimiento del presente estudio (incremento de peso y TCI), la vitamina C contenida en la dieta C<sub>240</sub> se podría considerar como un nivel de “transición” a los mejores resultados obtenidos en aquellas dietas con los mayores niveles de inclusión empleados (C<sub>480</sub>, C<sub>960</sub> y C<sub>1920</sub>). Esta “transición” en C<sub>240</sub> vendría a demostrar que, para este nivel, las necesidades de vitamina C comienzan a ser cubiertas, al menos en parte.

Aplicando el modelo “broken line” a los resultados de crecimiento (Figuras IV-4 y IV-5), se puede comprobar que el nivel de vitamina C que permite un desarrollo normal y, por tanto, cubre las necesidades básicas para juveniles de dentón en las condiciones ensayadas, se encuentra entre 477.5 y 499.8 mg ácido ascórbico kg dieta<sup>-1</sup>, en función del factor, TCI ó incremento de peso, considerado.

En comparación con las necesidades de vitamina C observadas en juveniles de otras especies de teleósteos, los juveniles de dentón precisarían de niveles bastante más elevados para su correcto desarrollo. Dabrowski (1991) sugirió que el principal factor regulador de las necesidades de vitamina C en peces es la tasa metabólica de los mismos. Como la tasa metabólica varía entre diferentes especies de peces (Jobling, 1985), aún en la misma etapa de su desarrollo, las necesidades de vitamina C también podrían variar. Así, las diferencias observadas en el dentón con respecto a otras especies podría deberse a este hecho. Por otra parte, también existe una variación interespecífica en la capacidad de utilización de las distintas formas de suministro de vitamina C dietaria, por lo que no sólo la forma en la que fue suministrada en cada uno de estos estudios, sino también la propia capacidad del pez para asimilar esta vitamina, serían factores que justificarían las diferencias observadas (Dabrowski et al., 1994).



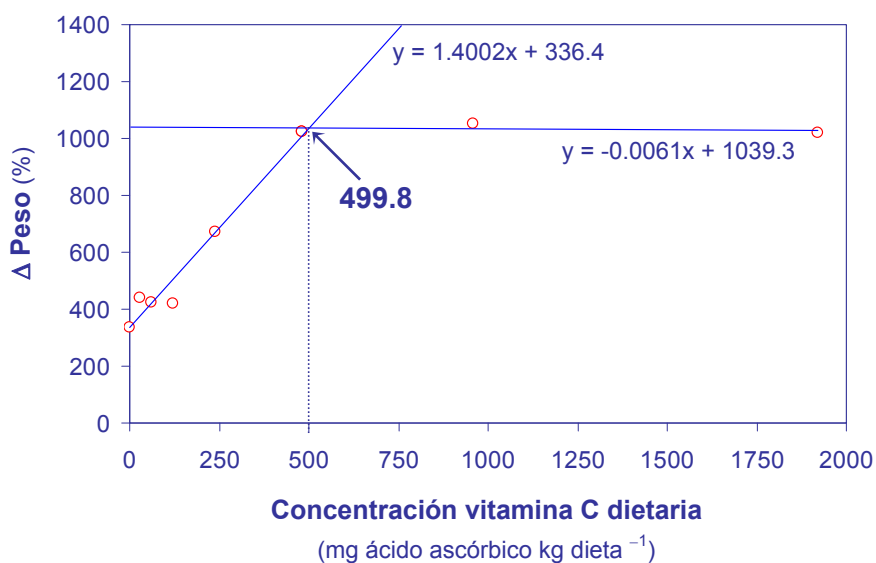


Figura IV-4. Determinación del nivel de vitamina C dietaria, para un crecimiento normal de juveniles de dentón, mediante modelo “broken line” basado en los resultados de incremento de peso de los peces.

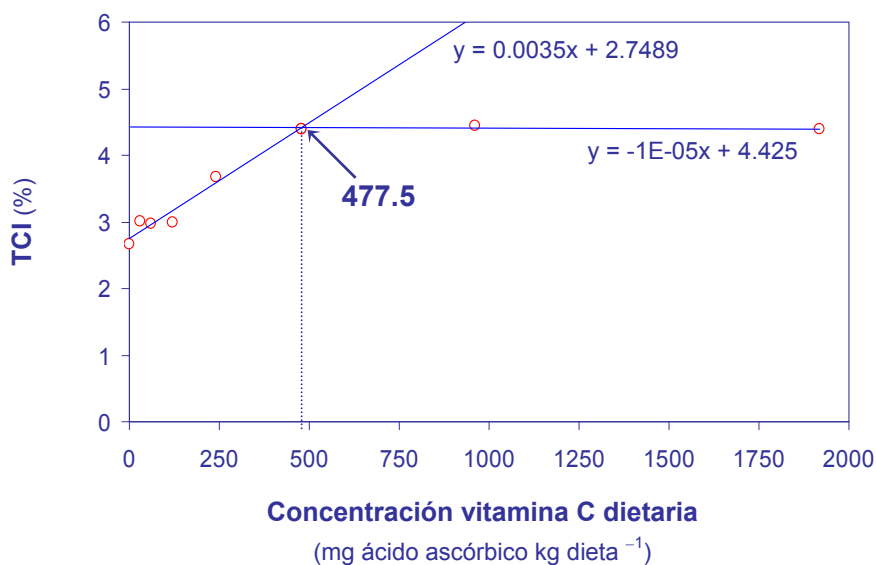


Figura IV-5. Determinación del nivel de vitamina C dietaria, para un crecimiento normal de juveniles de dentón, mediante modelo “broken line” basado en los resultados de la TCI de los peces.

En cuanto al índice de nutrición (IN) y la relación hepatosomática (RHS), ambos parámetros podrían ser considerados, *a grosso modo*, indicativos del nivel de reservas energéticas en los peces (Goede y Barton, 1990). Aunque en el presente trabajo el estudio estadístico no reveló influencia del contenido de vitamina C sobre el IN, los

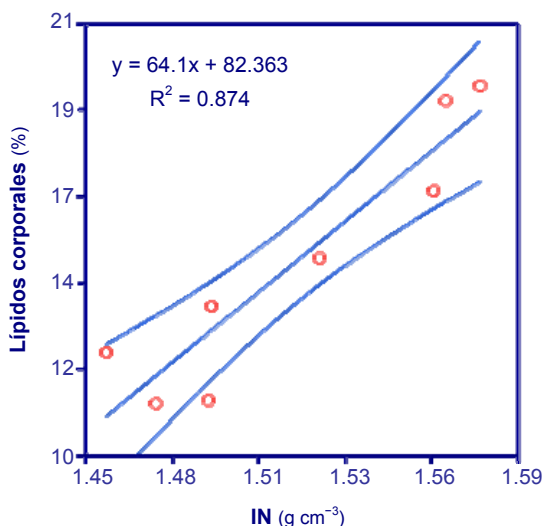


Figura IV-6. Regresión lineal entre las variables lípidos corporales e IN en dentones alimentados con distintos niveles de vitamina C, donde se muestra el intervalo de predicción de la media con un 95% de confianza

valores ligeramente más elevados observados para este índice en los animales alimentados con los niveles más altos de vitamina C, podrían ser resultado de la mayor ganancia de peso promovida a estos niveles, así como de la mayor acumulación lipídica corporal como reserva energética, tal y como nos muestran los resultados de composición corporal obtenidos en los juveniles de dentón del presente estudio (Figura IV-6). Este patrón de respuesta del IN ha sido observado en otras especies como en juveniles de *Sebastes schlegeli* (Lee et al., 1998; Wang et al., 2003b) y *Paralichthys olivaceus* (Wang et al., 2002).

No obstante, la ausencia de efecto del nivel de vitamina C sobre el IN ha sido indicada por otros autores en *Salmo salar* (Waagbø et al., 1993) y *O. mykiss* (Trenzado et al., 2007).

En cuanto a la consideración de la RHS como parámetro indicativo del nivel de reservas energéticas que apuntábamos anteriormente (Goede y Barton, 1990) parece lógico pensar que el suministro de vitamina C en cantidades suficientes para cubrir las necesidades del animal supondría un normal estado fisiológico, por lo que las reservas glucogénicas y lipídicas hepáticas y, en consecuencia, la RHS serían mayores a aquellas que pudieran existir cuando se dan carencias de esta vitamina (Merchie et al., 1996). Los resultados obtenidos para especies como *Seabastes schelegeli* (Lee et al., 1998), *Paralichthys olivaceus* (Wang et al., 2002) y *Epinephelus malabaricus* (Lin y Shiau, 2005a) estarían en consonancia con este argumento.

A diferencia de este planteamiento, en el presente estudio los juveniles de dentón alimentados con mayores niveles de vitamina C presentaron los valores más bajos de RHS. Esta respuesta también ha sido observada en *Sparus aurata* (Henrique et al., 1998), *Terapon jarbua* (Chien y Hwang, 2001), *Acanthopagrus schlegeli* y *Pagrus major* (Ji et al., 2003b) y *O. mykiss* (Trenzado et al., 2007). Henrique et al. (1998) consideraron que estos cambios en la RHS podrían ser consecuencia de modificaciones temporales en el flujo sanguíneo hepático como consecuencia de la respuesta al estrés fisiológico. Otra posible razón podría venir dada por la posibilidad de una acumulación de agua en el hígado (transformación hidrópica) provocada por un estado metabólico alterado, lo que daría lugar a una RHS incrementada. Aunque este hecho no ha sido documentado como consecuencia de la deficiencia de vitamina C, sí ha sido observado en distintas especies de peces, como *Lates calcarifer* y *Pleuronectes americanus*, con daños hepáticos similares inducidos por alteraciones metabólicas debidas a la presencia en el medio de distintos compuestos químicos tóxicos para el animal (Moore y Stegeman, 1992; Moore et al., 1996; Thophon et al., 2003).

Por otro lado, la vitamina C afecta a la síntesis de carnitina, molécula con un papel esencial en el transporte de ácidos grasos de cadena larga al interior de la mitocondria, donde tiene lugar la  $\beta$ -oxidación (Hulse et al., 1978). Este hecho influye directamente sobre el metabolismo de los triglicéridos. Así, se ha observado una disminución de los niveles de carnitina en el hígado de cobayas con deficiencia de vitamina C, por lo que el transporte de ácidos grasos hacia la mitocondria se vería “bloqueado”. Consecuentemente, la imposibilidad de oxidar estos ácidos grasos implicaría una redirección de su uso metabólico hacia la síntesis de triglicéridos, resultando en una acumulación de grasa hepática (Ha et al., 1991; Fernández et al., 1997; Montano et al., 1998). Este hecho podría justificar la mayor RHS observada en los dentones alimentados con dietas deficientes en vitamina C, y estaría además respaldado por los resultados obtenidos para el enzima HOAD, clave en el proceso de  $\beta$ -oxidación, cuyos valores de actividad fueron ligeramente inferiores para los grupos C<sub>0</sub>, C<sub>30</sub>, C<sub>60</sub> y C<sub>120</sub>. Finalmente, estudios en otras especies de peces no encuentran relación entre la RHS y el contenido en vitamina C (Waagbø et al., 1993; Ji et al., 2003a).

Por otra parte, aunque los valores de ingesta no fueron estadísticamente diferentes entre grupos, la mayor ingesta observada en los animales alimentados con las dietas de menor contenido en vitamina C ( $C_0$ ,  $C_{30}$ ,  $C_{60}$  y  $C_{120}$ ) podría deberse a una ingesta controlada por los propios juveniles de dentón con el fin de compensar la deficiencia de esta vitamina. Así, existen diversos estudios que demuestran que los peces son capaces de autorregular su ingesta dependiendo de distintos factores, tales como las propiedades organolépticas del alimento suministrado (Andrew et al., 2004), o bien la deficiencia de algún macronutriente, micronutriente o energética, hecho que ha sido observado en numerosos estudios (Yamamoto et al., 2002; Vivas et al., 2003, 2006; Atienza et al., 2004; Boujard et al., 2004; Rubio et al., 2005; Morais et al., 2006). Similares respuestas de hiperfagia ante deficiencias de vitamina C han sido previamente observados en especies como la dorada (Henrique et al., 1998) y la trucha arcoiris (Trenzado et al., 2007). De cualquier modo, este ligero incremento en la ingesta no fue suficiente para producir un crecimiento óptimo en estos peces, tal y como muestran los resultados que comentábamos anteriormente. Este hecho se encuentra respaldado por los resultados en los índices de utilización nutritiva que, en general, reflejan que niveles bajos de vitamina C dietaria generaron los peores valores para los índices IC, CEC, VPP y VPL. Este mismo patrón ha sido encontrado por otros autores en distintas especies (Chávez de Martínez, 1990; Henrique et al., 1998; Ji et al., 2003b; Ai et al., 2004; Lin y Shiau, 2005a, Trenzado et al., 2007). Sin embargo, existen estudios en los que esta relación se invierte (Shiau y Hsu, 1999), o bien no existe influencia de la vitamina C sobre la utilización nutritiva del alimento (Al-Amoudi et al., 1992).

De nuevo, sería posible que un metabolismo intermediario alterado como consecuencia de los daños oxidativos generados en los animales alimentados con bajas dosis de vitamina C, implicase una reducción en la capacidad para el uso y transformación de los nutrientes aportados por la dieta, además de una desviación de los nutrientes hacia la síntesis y renovación de tejidos dañados, en lugar del crecimiento y acumulación de reservas energéticas corporales. En este sentido, la baja actividad observada en el presente estudio para los enzimas implicados en el metabolismo proteico y lipídico justificarían los peores valores obtenidos para los índices VPP y VPL a niveles deficientes en vitamina C (Figura IV-7, A y B).

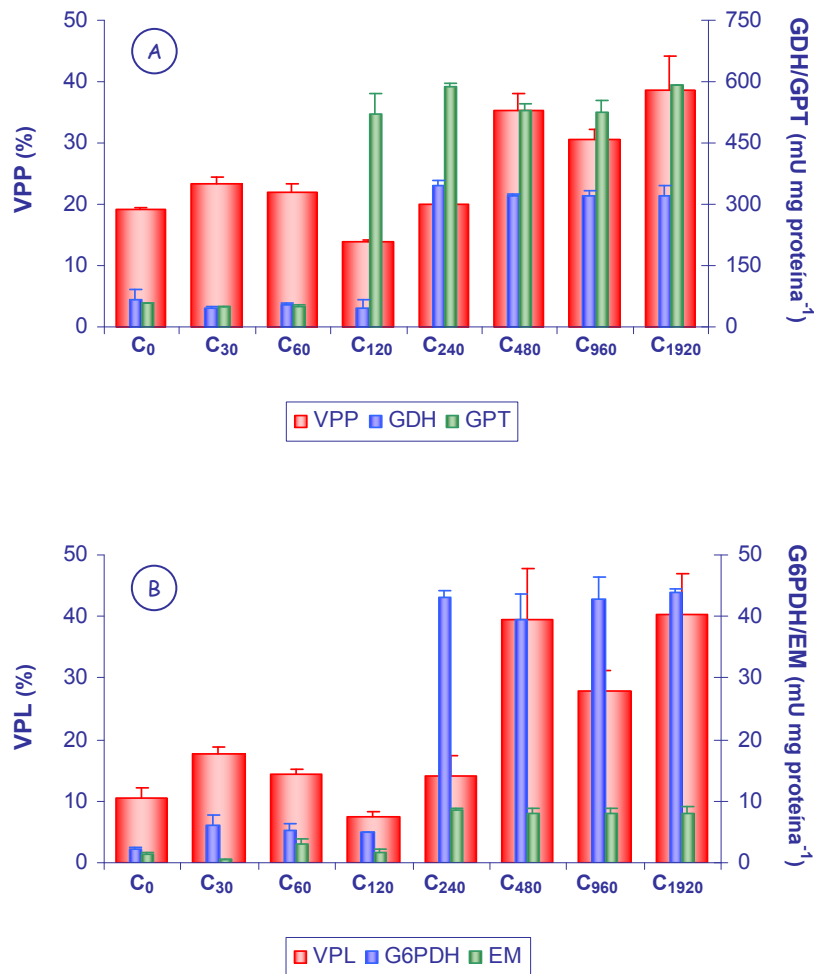


Figura IV-7. Representación comparativa entre el índice VPP y las actividades enzimáticas hepáticas GDH y GPT (A), y el índice VPL y las actividades enzimáticas hepáticas G6PDH y EM (B) en dentones alimentados con dietas con distintos niveles de vitamina C.

Igualmente, se observa un menor contenido en lípidos corporales en los animales alimentados con las dietas de menor contenido en esta vitamina, existiendo una correspondencia entre la reducida actividad obtenida para las enzimas G6PDH y EM, implicadas en la síntesis lipídica, en los grupos C<sub>0</sub>, C<sub>30</sub>, C<sub>60</sub> y C<sub>120</sub> y el menor contenido en lípidos corporales para los animales de estos tratamientos (Figura IV-8, A y B). Como ya ocurrió con los datos de crecimiento, también aquí se vería reflejado que el nivel de vitamina C incluido en la dieta C<sub>240</sub>, podría cubrir parcialmente las necesidades de esta vitamina en los juveniles de dentón, pero no en su totalidad.

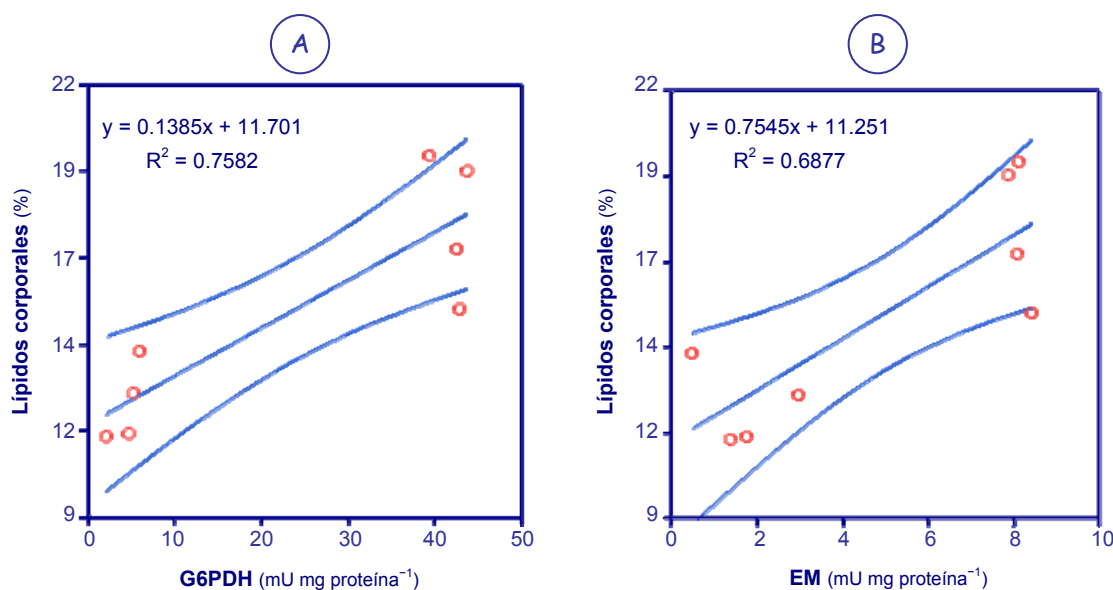


Figura IV-8. Regresión lineal entre las variables lípidos corporales y las actividades G6PDH (A) o EM (B) en hígado de dentón alimentados con dietas con distintos niveles de vitamina C, donde se muestra el intervalo de predicción de la media con un 95% de confianza. Se puede observar la formación de dos grupos extremos correspondientes a las dietas de los cuatro niveles más bajos y los cuatro más altos de vitamina C dietaria.

Al igual que en este trabajo, otros autores encontraron que la supervivencia de los peces no estuvo afectada significativamente por el nivel de vitamina C dietario (Chávez de Martínez 1990; Al-Amoudi et al., 1992; Waagbø et al., 1993; Henrique et al., 1998; Montero et al., 1999; Ji et al., 2003a,b). Sin embargo, como se ha indicado para otros aspectos, existen en bibliografía una gran variabilidad de respuestas, tanto inter como intraespecíficas, a la disponibilidad de vitamina C. Así, otros estudios encuentran que sí existe una relación negativa entre el nivel de vitamina C y la mortalidad de los peces (Shiau y Hsu, 1999; Lee et al., 1998; Wang et al., 2003a; Ai et al., 2004, 2006; Lin y Shiau, 2005a).

En lo que se refiere al metabolismo intermediario, en general, los resultados obtenidos en el presente trabajo nos muestran que la mayoría de los enzimas hepáticos analizados, implicados en las principales rutas del metabolismo intermediario (HK, PK, GK, GDH, GPT, G6PDH, EM y HOAD), se ven afectados por el nivel de vitamina C dietario (Figura IV-9). Aunque más adelante se va analizar la información disponible en

bibliografía que relaciona directamente los niveles de vitamina C con alteraciones en el metabolismo de lípidos, proteínas y carbohidratos, existen diversas razones por las cuales se podrían justificar estos resultados.

En este sentido, estudios histológicos realizados en especies como *Dicentrarchus labrax* y *Scophthalmus maximus* (Merchie et al., 1996) ponen de manifiesto que la deficiencia de vitamina C provocaba en estos animales una compartimentación celular de células hepáticas mal desarrollada, produciéndose una mejora de la organización de los orgánulos celulares paralelamente al aumento en la disponibilidad de esta vitamina. Este hecho afectaría al metabolismo de los animales, repercutiendo directamente sobre su crecimiento. Aunque en el presente trabajo no se han llevado a cabo estudios histológicos que corroboren este hecho, la depresión generalizada de la actividad metabólica observada en el hígado de los dentones alimentados con dietas deficientes en vitamina C podría confirmarlo.

Por otra parte, la vitamina C es un efectivo protector del ataque de radicales libres a biomoléculas fundamentales para la vida (Adham et al., 2000; Chen et al., 2004; Yousef et al., 2007), por lo que su carencia provocaría daños oxidativos que podrían tener efectos nocivos sobre la integridad física celular, incluyendo los enzimas (Ikeda et al., 1997; Adham et al., 2000).

Por su parte, los enzimas FBPasa y CS hepáticas parecen mostrar niveles ligeramente más altos de actividad cuando el suministro de vitamina C fue menor. Las actividades HK-IV y GOT no se vieron afectadas por los distintos tratamientos dietarios. La necesidad de mantener los niveles mínimos de glucosa plasmática y de un suministro energético constante, podría justificar estos resultados, pudiendo existir así una “protección” de estos enzimas a pesar de la situación prooxidante generada. Por último, las actividades ACoAT y  $\beta$ -OHBDH no presentaron patrones muy claros, probablemente debido a que el metabolismo de cuerpos cetónicos en teleósteos no es demasiado importante para el mantenimiento vital, cuando estos animales son alimentados.

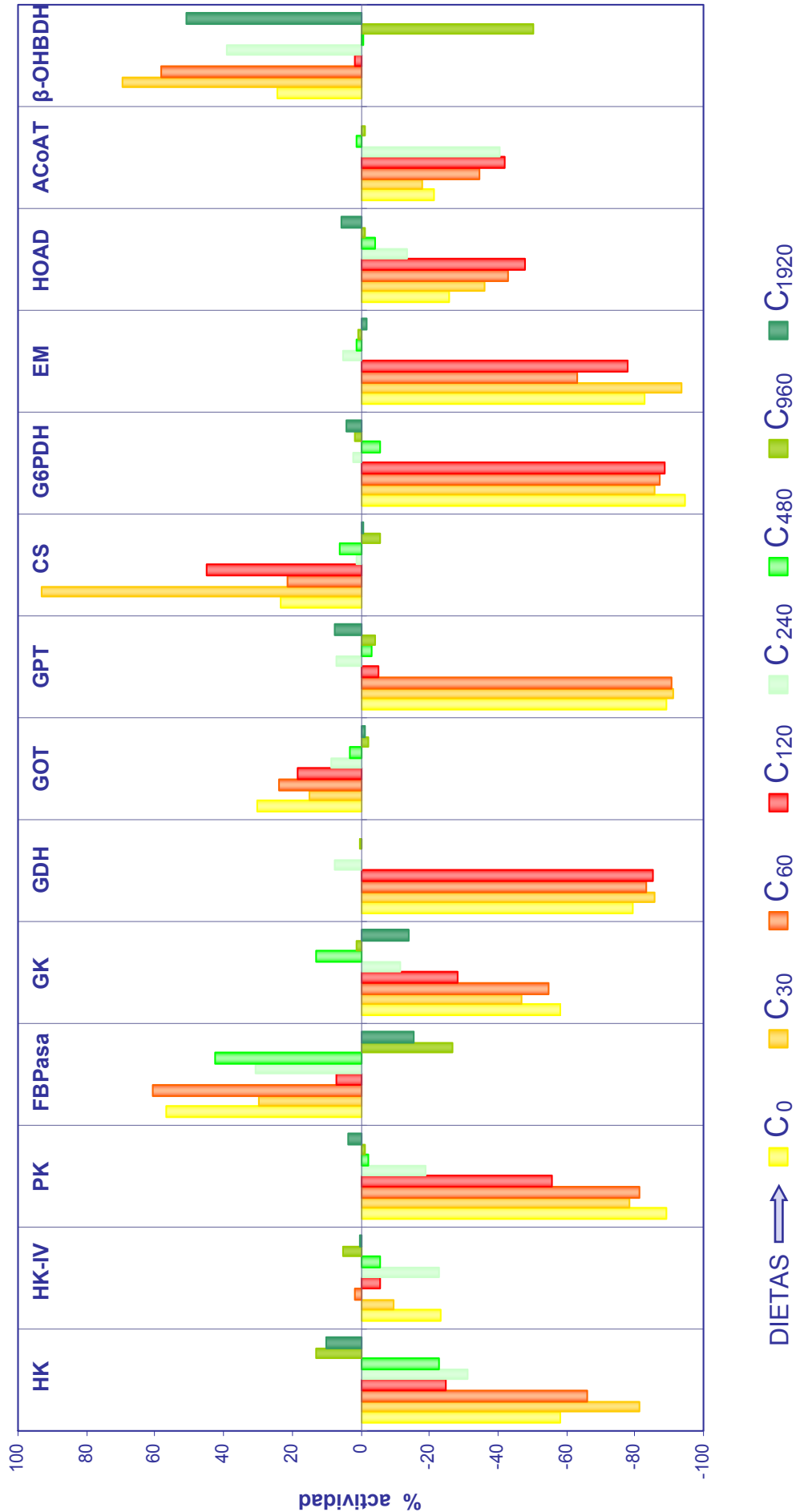


Figura IV-9. Actividad de los principales enzimas del metabolismo intermediario en hígado de dentón alimentado con dietas con distintos niveles de vitamina C. Los datos son presentados como % de actividad de cada grupo dietario respecto de la media calculada a partir de los datos de actividad enzimática obtenidos en aquellos grupos cuyo nivel de vitamina C dietaria ha sido considerado óptimo para un correcto crecimiento y supervivencia de los animales (dietas C<sub>480</sub>, C<sub>960</sub> y C<sub>1920</sub>).



En bibliografía, la mayoría de estudios dedicados a determinar la influencia de la vitamina C sobre el metabolismo de los principales nutrientes han sido realizados en animales terrestres, principalmente cobayas, siendo muy escasos en peces. En general, estos trabajos están enfocados, en su mayor parte, al estudio del metabolismo lipídico y, en menor medida, al metabolismo de las proteínas y los carbohidratos. Así, en múltiples estudios se ha observado que la vitamina C juega un importante papel en el metabolismo lipídico, fundamentalmente en aquellos aspectos relacionados con el colesterol, los triglicéridos y la síntesis de carnitina.

En este sentido, los resultados de distintos estudios muestran que la deficiencia crónica de vitamina C en cobayas está asociada con alteraciones de los enzimas hepáticos que regulan la homeostasis del colesterol. Así, Montano et al. (1998) observaron un catabolismo reducido de la transformación del colesterol a ácidos biliares, dando como resultado una acumulación de colesterol hepático. Una relación similar entre la vitamina C y el metabolismo del colesterol fue observada por otros autores (Weight et al., 1974; Ginter, 1978; Harris et al., 1979; Fernández et al., 1997). Estas alteraciones influyeron sobre los niveles de colesterol plasmático, de modo que deficiencias de vitamina C produjeron un incremento en los niveles de colesterol LDL y VLDL y un descenso en los de HDL (Hemila, 1972; Fernández et al., 1997; Montano et al., 1998) en el plasma de los animales objeto de estudio. Igualmente, en humanos también se ha observado la existencia de esta relación inversa entre ingesta de vitamina C y niveles de colesterol en plasma (Cerna y Ginter, 1978). Desafortunadamente, no existen estudios que nos permitan conocer si, por extensión, también existe esta relación en peces.

Distintos estudios han observado que la deficiencia de vitamina C en cobayas produce un incremento de triglicéridos tanto en plasma como en hígado (Ginter et al, 1976; John et al., 1979; Ha et al., 1991; Fernández et al., 1997; Montano et al, 1998). Para justificar este hecho, la mayoría de los autores apuntan a la alteración en la actividad de algunos enzimas lipolíticos. Uno de estos cambios se debería al importante papel que posee la vitamina C en la síntesis de carnitina, molécula encargada del transporte de los ácidos grasos de cadena larga hacia el interior de la mitocondria donde tiene lugar la  $\beta$ -oxidación (Hulse et al., 1978). Por tanto, y como ya expusimos anteriormente, la deficiencia de vitamina C implicaría una disminución en la síntesis de carnitina, lo cual a su vez reduciría la actividad lipolítica, influyendo directamente sobre el metabolismo

de los triglicéridos (Ha et al., 1991; Fernández et al., 1997; Montano et al., 1998). Esta relación entre vitamina C y actividad lipolítica regulada por la síntesis de carnitina ha sido observada tanto en mamíferos como en peces por diversos autores (Ginter y Bobek, 1981; Nelson et al., 1981; Simon, 1992; Ha et al., 1994; Chatzifotis et al., 1995; Miyasaki et al., 1995; Ji et al., 2003a,b; Harpaz, 2005). En el presente estudio, la actividad hepática HOAD observada, ligeramente inferior para los grupos alimentados con las dietas de menor contenido en vitamina C (C<sub>0</sub>, C<sub>30</sub>, C<sub>60</sub> y C<sub>120</sub>), podría confirmar el importante papel de la vitamina C en la síntesis de carnitina.

En cuanto a los estudios que pudieran establecer una relación entre la vitamina C y la actividad lipogénica o el metabolismo de proteínas y carbohidratos, los datos disponibles en bibliografía son escasos o inexistentes. Así, por lo que respecta al metabolismo proteico y, al margen del importante papel en la síntesis de colágeno, algunos autores afirman que la vitamina C influye en el metabolismo de este nutriente, estimulando su síntesis. La mayoría de los estudios basan esta consideración en los efectos observados sobre los niveles de proteína plasmática. Se ha observado que, tanto en mamíferos como en peces, los animales alimentados con mayor concentración de vitamina C presentaron los niveles más altos de proteína plasmática (Hilton et al., 1979; Waagbø et al., 1993; Johnston et al., 1994; De Menezes et al., 2006; Affonso et al., 2007; De Andrade et al., 2007). Los estudios sobre la influencia de la vitamina C en los enzimas relacionados con el metabolismo proteico en hígado son, sin embargo, inexistentes.

Respecto a la participación de la vitamina C en el metabolismo de los carbohidratos, los trabajos existentes en peces no permiten establecer una conexión clara entre ambos parámetros. Así, Affonso et al. (2007) no encontraron efecto de altas dosis de vitamina C sobre los niveles de glucosa plasmática. Sin embargo, un estudio realizado en mamíferos, concretamente en cobayas, determinó que la deficiencia de vitamina C produce alteraciones del metabolismo de los carbohidratos, ya que se observó que los animales deficientes en vitamina C contenían menos glucógeno, tanto hepático como muscular (Dieter, 1970).

En cualquier caso, los únicos posibles motivos, a la luz de la información disponible actualmente, que podrían justificar la reducción de la actividad de los enzimas G6PDH, EM, GDH, GPT, HK y PK en el presente estudio, serían los relacionados, como se ha expuesto anteriormente, con los daños generados por la deficiencia de vitamina C en el organismo.

Como se observa en los resultados obtenidos hasta el momento, la vitamina C es un micronutriente esencial para el normal funcionamiento metabólico del dentón. Una de las razones más importantes que justificarían este hecho es el papel fundamental de la vitamina C como mecanismo de defensa antioxidante, protegiendo de los daños oxidativos que se pudieran originar sobre moléculas indispensables para el organismo como proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos (Bánhegyi et al., 1997; Halliwell y Gutteridge, 2000; Padayatty et al., 2003).

Al margen del efecto protector de la vitamina C, la mayoría de los organismos están equipados con otros sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos. Los resultados de los estudios cuya finalidad es determinar la influencia de la vitamina C sobre los mecanismos de defensa antioxidante enzimáticos SOD, CAT, GPX y GR, no son concluyentes. Así, algunos autores han observado que, tanto en mamíferos como en aves en condiciones normales, la carencia de vitamina C disminuye la actividad de algunas de estas enzimas en hígado (Barja et al., 1994; Rojas et al., 1994; Öztürk-Ürek et al., 2001; Trenzado, 2004). De igual forma, se ha observado que cuando los animales sometidos a agentes estresantes, como sustancias tóxicas, reducen la actividad de las enzimas antioxidantes como consecuencia de ese factor, el suministro de vitamina C recupera los valores de actividad a su estado original, minimizando además los daños oxidativos (Kumar et al., 2004; Mehmet et al., 2005; Venkataraman et al., 2007; Yousef et al., 2007). Por el contrario, en un estudio realizado en *Clarias gariepinus* se observó que cuando los niveles de vitamina C son mayores, tanto el contenido en glutatión oxidado como la actividad GPX son menores (Elbaraasi et al., 2004). Similares resultados fueron obtenidos por Hamre et al. (1997) en salmón. Igualmente, Öztürk-Ürek et al. (2001) observaron una disminución en la actividad CAT en la dieta suplementada con vitamina C respecto de la dieta control, a pesar de que el resto de enzimas ensayadas siguieron el patrón contrario, como indicábamos anteriormente.

En el presente estudio (Figura IV-10), sólo para aquellos dentones alimentados con dietas carentes de vitamina C se observa un claro incremento en la actividad GPX. Igualmente, la CAT presenta valores de actividad más elevados en el grupo C<sub>0</sub>, aunque en este caso también se pueden observar valores ligeramente más altos en los grupos C<sub>30</sub> y C<sub>60</sub>. Sin embargo, los enzimas SOD y GR apenas reflejaron influencia del nivel de vitamina C sobre sus actividades. Así, al contrario que en los estudios anteriormente descritos, Chakraborty et al. (1994) tampoco observaron ninguna influencia sobre las actividades SOD, CAT y GPX en cobayas con deficiencia crónica de vitamina C, aunque sí altos niveles de peroxidación lipídica.

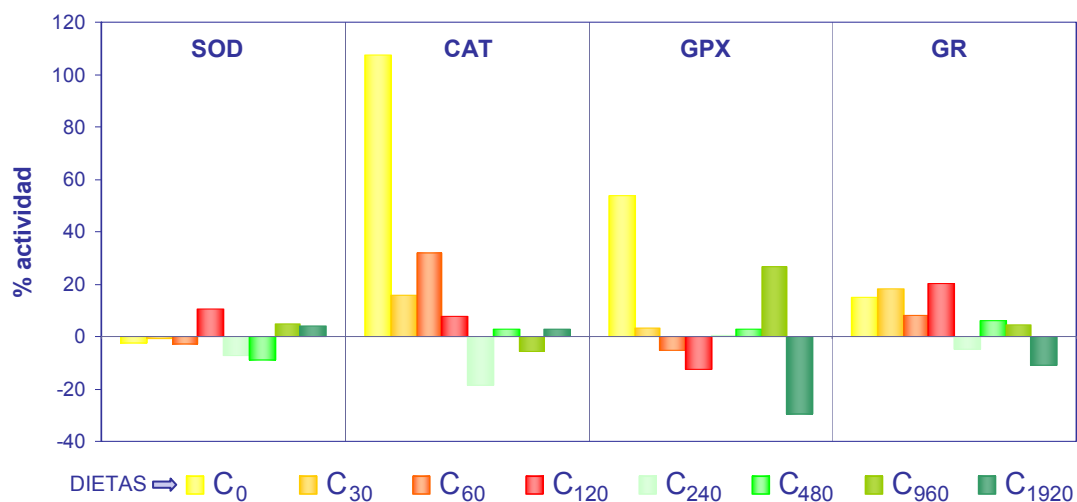


Figura IV-10. Actividad de los enzimas antioxidantes en hígado de dentón alimentado con dietas con distintos niveles de vitamina C. Los datos son presentados como % de actividad de cada grupo dietario respecto de la media calculada a partir de los datos de actividad enzimática obtenidos en aquellos grupos cuyo nivel de vitamina C dietaria ha sido considerado óptimo para un correcto crecimiento y supervivencia de los animales (dietas C<sub>480</sub>, C<sub>960</sub> y C<sub>1920</sub>).

Por otro lado, el suministro de distintos niveles de vitamina C dietaria pareció inducir cambios en el patrón isoenzimático de la SOD en hígado. Así, mientras que en todos los casos se confirmó la existencia de dos isoformas hepáticas de carácter constitutivo, CuZn-SOD I y Mn-SOD, los diferentes niveles de vitamina C proporcionados en las dietas parecen inducir la expresión de una tercera isoforma SOD, CuZn-SOD II, en los tratamientos C<sub>0</sub>, C<sub>240</sub>, C<sub>480</sub>, C<sub>960</sub> y C<sub>1920</sub>. No obstante, no debemos descartar que el daño oxidativo producido en las proteínas podría haber provocado cambios en la estructura de la SOD (Pedrajas et al., 1995, 1998), lo que influiría en la movilidad de este enzima en el gel, así como en la nitidez de aparición de las bandas. En este sentido, los grupos de dentones en los que existió un mayor daño oxidativo proteico, principalmente los alimentados con las dietas C<sub>30</sub>, C<sub>60</sub> y C<sub>120</sub>, presentaron las bandas electroforéticas más difusas. Este hecho, podría estar relacionado con la no detección de una banda evidente de la isoforma CuZn-SOD II en estas dietas.

Por su parte, es importante destacar que, tanto en el presente ensayo, como en el resto de ensayos que componen la presente tesis (ensayos IV-2, IV-3 y IV-4), se ha observado que para poner de manifiesto la existencia del isoenzima Mn-SOD, a través de la inhibición del resto de isoformas (CuZn-SOD), se precisó del empleo de una solución con una muy elevada concentración de CNK (50 mM), cuando, comúnmente, la utilización de una solución de CNK 5 mM es suficiente (Hidalgo et al., 2002; Trenzado et al., 2007). Futuros estudios deberán ser realizados para establecer si este podría ser otro rasgo característico de esta especie.

En cuanto a los daños oxidativos observados a nivel lipídico y proteico, parecen ser efecto directo de la deficiencia de vitamina C, ya que estos daños se generan a pesar de la presencia de adecuados niveles de otros antioxidantes (Chakraborty et al., 1992, 1994). Así, ni el mantenimiento de la actividad SOD y GR, ni el aumento de la actividad de las enzimas CAT y GPX parecieron ser suficientes para evitar la acumulación de agentes oxidantes, observándose un incremento en los valores de los indicadores de daño oxidativo tanto a nivel lipídico como proteico en los juveniles de dentón alimentados con dietas deficientes en vitamina C (Figura IV-11).

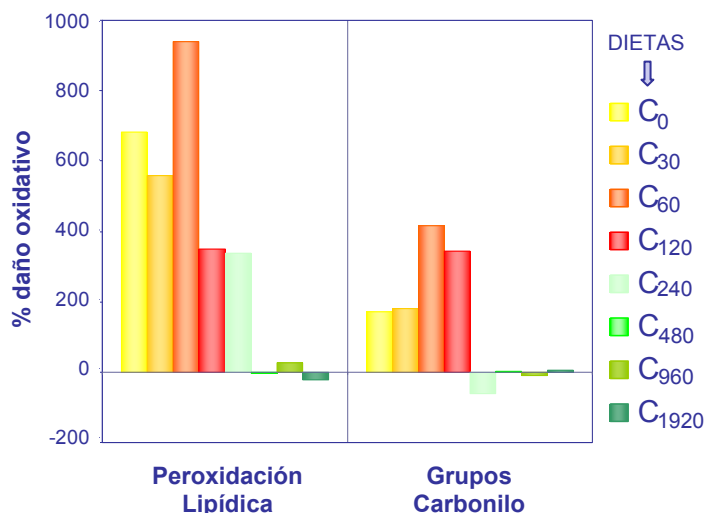


Figura IV-11. Daño oxidativo en lípidos y proteínas en hígado de dentón alimentado con dietas con distintos niveles de vitamina C. Los datos son presentados como % de daño oxidativo de cada grupo dietario respecto de la media calculada a partir de los datos de concentración de MDA o grupos carbonilo obtenidos en aquellos grupos cuyo nivel de vitamina C dietaria ha sido considerado óptimo para un correcto crecimiento y supervivencia de los animales (dietas C<sub>480</sub>, C<sub>960</sub> y C<sub>1920</sub>).

Respecto a los lípidos, son muy numerosos los estudios que demuestran el poder protector de la vitamina C frente al ataque de los agentes oxidantes. Así, bajo condiciones normales se ha observado que, tanto en peces (Andersen et al., 1998; Dabrowski y Ciereszko, 2001; Shiau y Hsu, 2002; Ji et al., 2003b; Elbaraasi et al., 2004) como en mamíferos (Barja et al., 1994; Chakraborty et al., 1994; Rojas et al., 1994; Mukhopadhyay et al., 1995; Santillo et al., 1996; Fernández et al., 1997; Tanaka et al., 1997; Lykkesfeldt, 2002) que no poseen la capacidad de sintetizar esta vitamina, el empleo de dietas deficientes en la misma resulta en un incremento significativo de la peroxidación lipídica en la mayoría de los tejidos corporales. Estos resultados son similares a los observados en el presente estudio en el hígado de los dentones pertenecientes a los grupos C<sub>0</sub>, C<sub>30</sub>, C<sub>60</sub>, C<sub>120</sub> y C<sub>240</sub>.

Igualmente, cuando los animales son sometidos a un factor estresante (temperatura, oxígeno, tóxicos etc.) el suministro de vitamina C en la dieta revierte los daños oxidativos en lípidos generados por ese factor. Este hecho ha sido descrito por diversos autores en peces (Chien y Hwang, 2001; Hwang y Lin, 2002; Chagas y Val, 2006) y mamíferos (Hudecova y Ginter, 1992; Young et al., 1992; Kumar et al., 2004; Mehmet et al., 2005; Venkataraman et al., 2007; Yousef et al., 2007; Jurczuk et al., 2007).

Por otro lado, cuando existe una tasa fija en la generación de agentes oxidantes, la peroxidación lipídica va a depender principalmente de dos factores, la concentración de antioxidantes y la cantidad de sustrato susceptible de oxidación. En peces como *Terapon jarbua* (Chien y Hwang, 2001) y *Cyprinus carpio* (Hwang y Lin, 2002) se ha detectado que la alimentación con dietas deficientes en vitamina C produce un incremento del contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). Considerando que estos ácidos grasos son los más susceptibles al ataque de los agentes oxidantes (Storey, 1996; Halliwell y Gutteridge, 2000; Niki et al., 2005), la mayor peroxidación lipídica observada en peces alimentados con dietas deficientes en vitamina C podría ser consecuencia, no sólo de la ausencia de su poder protector, sino también de la influencia de esta vitamina sobre la composición de ácidos grasos de estos animales.

Aunque no existen estudios en peces que establezcan las consecuencias del déficit de vitamina C sobre la oxidación de las proteínas, varios trabajos realizados en cobayas han demostrado que, al igual que para la peroxidación lipídica, esta vitamina previene el ataque de los agentes oxidantes sobre ellas, observándose una disminución del contenido en grupos carbonilo tanto en hígado como en otros tejidos del animal (Winter y Liehr, 1991; Barja et al., 1994; Mukhopadhyay et al., 1995; Cadenas et al., 1998). Una respuesta similar fue observada en el presente estudio para los dentones alimentados con las dietas más bajas en vitamina C (C<sub>0</sub>, C<sub>30</sub>, C<sub>60</sub> y C<sub>120</sub>), donde el contenido en grupos carbonilo fue mayor. Una vez que se ha producido la modificación de las proteínas por oxidación, sólo a través de la degradación proteolítica se consiguen retirar esas proteínas dañadas del organismo, por lo que una acumulación excesiva podría inducir en último término la muerte celular, con las subsiguientes consecuencias en el estado fisiológico del animal.

Además del papel antioxidante ampliamente descrito para la vitamina C, ésta también puede tener un efecto prooxidante. La condición antioxidante o prooxidante de la vitamina C depende, entre otros factores, de la concentración a la que esté presente. Así, Deng et al. (1978) observó una capacidad antioxidante durante la congelación de lisas (*Mugil cephalus*) cuando el contenido en vitamina C era alto (1000 ppm). Sin embargo, bajas concentraciones de vitamina C (50 ppm, 100 ppm y 500 ppm) mostraron un efecto prooxidante. Similares resultados fueron observados por Chen (1988) y Decker y Hultin (1992). En base a este planteamiento, el mayor daño oxidativo observado en los grupos alimentados con niveles deficientes en vitamina C podría deberse, además de a una posible acción prooxidante de esta vitamina, a esos bajos niveles.

En conjunto, los resultados de este experimento evidencian la importancia de la vitamina C para mantener un buen estado de salud general en el animal, permitiendo un correcto desarrollo y crecimiento, así como proporcionando una adecuada protección frente a agentes oxidantes, función esencial para mantener la integridad de lípidos y proteínas fundamentales para el correcto funcionamiento fisiológico del animal.



## 1.5. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman la hipótesis del carácter esencial de la vitamina C en juveniles de dentón, hecho que no había sido constatado previamente.
2. El nivel mínimo necesario de esta vitamina para juveniles de dentón, en las condiciones ensayadas, se encuentra entre 478 y 500 mg ácido ascórbico kg dieta<sup>-1</sup>, dependiendo de que se considere la tasa de crecimiento instantáneo o el incremento de peso como variable dependiente.
3. La deficiencia de vitamina C tiene como consecuencia la generación de daños oxidativos a nivel lipídico y proteico. Los niveles de actividad de los enzimas antioxidantes no parecen ser suficientes para evitar la acumulación de agentes oxidantes, dando lugar a la aparición de estrés oxidativo en estos animales.
4. Consecuencia directa de la situación de estrés y los daños oxidativos generados en aquellos dentones alimentados con niveles deficientes de vitamina C, la mayoría de los enzimas hepáticos del metabolismo intermediario muestran una alteración en su patrón de actividad que afecta negativamente los índices de utilización y transformación de los nutrientes aportados por la dieta.

## 1.6. CONCLUSIONS

1. Results obtained in the present study confirm the hypothesis of the essential character of vitamina C in common dentex fingerlings, a fact that had not been verified to date.
2. The minimum requirements of this vitamin for common dentex fingerlings, under the tested conditions, range from 478 and 500 mg ascorbic acid kg diet<sup>-1</sup>, depending of specific growth rate or weight increment is considered as dependent variable.
3. Vitamin C deficiency resulted in oxidative damage to lipids and proteins. Antioxidant enzymes do not seem to be sufficient to avoid the oxidant agent accumulation, leading to a situation of oxidative stress in these animals.
4. As a direct consequence of the stress situation and the oxidative damage generated in those common dentex fed with deficient vitamin C levels, most liver enzymes of the intermediary metabolism show an altered activity pattern that negatively affects the utilization and transformation of dietary nutrient.



## **2. BLOQUE EXPERIMENTAL IV-2. Inclusión de distintos tipos y niveles de hidratos de carbono en dietas para dentón: influencia sobre el crecimiento, utilización nutritiva, metabolismo y estado redox.**

### **2.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

Como consecuencia de la rápida expansión de la acuicultura, y considerando la limitación y el alto coste que supone el uso de harina de pescado en el alimento de las especies cultivadas, se ha generado la necesidad de encontrar fuentes alternativas de proteína y energía que puedan mantener la viabilidad de esta actividad (Stone, 2003). Una de las alternativas a la harina de pescado como fuente proteica ha sido el empleo de harinas vegetales, cuya producción global es elevada y comparativamente más barata que aquellas derivadas de animales (Stone, 2003). Sin embargo, además de constituir una fuente proteica parcialmente sustitutiva de las harinas de pescado, las harinas vegetales también pueden ser consideradas como una fuente energética alternativa, debido al elevado porcentaje de carbohidratos (generalmente almidón) que contienen (NRC, 1993), por lo que su empleo contribuye a la solución del problema desde otra perspectiva, la disminución del contenido proteico de los piensos mediante la optimización de la relación proteína/energía de los mismos. Aunque no se han demostrado necesidades reales de carbohidratos en peces (NRC, 1993; Wilson, 1994), su inclusión dietaria conlleva numerosos beneficios. Así, el empleo de carbohidratos supondría una reducción en los costes de alimentación, al igual que una mejora en las propiedades físicas del alimento fabricado (Wilson, 1994). Además, como se ha comentado, un nivel adecuado de carbohidratos digestibles podría minimizar el catabolismo de las proteínas con fines energéticos o proveer intermediarios metabólicos para la síntesis de otros compuestos biológicamente importantes, lo cual aumentaría la retención proteica, favoreciendo el crecimiento y minimizando la liberación de productos nitrogenados al medio (Wilson, 1994; Shiau, 1997; Hemre et al., 2002; Stone, 2003). Como veremos más adelante, son numerosos los estudios que evidencian este ahorro proteico derivado de la inclusión de carbohidratos en la dieta para peces.

Sin embargo, la capacidad de los peces para utilizar los carbohidratos dietarios como fuente de energía varía ampliamente entre especies. Estas diferencias parecen estar relacionadas con el sistema digestivo y el metabolismo de los peces, que se encuentran adaptados a los nutrientes existentes en el medio acuático donde viven, condicionando su alimentación (Wilson, 1994; Shiau, 1997; Hemre et al., 2002; Stone, 2003; Krogdahl et al., 2005). Así, la utilización de carbohidratos por la mayoría de los peces carnívoros es generalmente más baja que la de peces herbívoros u omnívoros (Spannhof y Plantikow, 1983; Hidalgo et al., 1999; Yamamoto et al., 2001). Este hecho se justifica tanto por la menor actividad amilolítica, como por la existencia de un menor número de receptores de insulina en las especies carnívoras (Gutiérrez et al., 1991; Párrizas et al., 1994; Hidalgo et al., 1999; Hemre et al., 2002). Por otra parte, en general, los peces de agua dulce y templada parecen digerir más eficientemente los carbohidratos que los peces marinos y de agua fría (Shimeno et al., 1977; Wilson, 1994). A pesar de estas tendencias, las respuestas de las especies que conforman cada uno de estos grupos también son muy variadas (Burel et al., 2000; Krogdahl et al., 2004).

Además de las diferencias interespecíficas, la eficiencia intraespecífica de la utilización de carbohidratos está condicionada, entre otros muchos factores, tanto por la complejidad y el tratamiento físico al que han sido previamente sometidos, como por su nivel de inclusión dietaria (Wilson, 1994; Shiau, 1997; Stone, 2003; Krogdahl et al., 2005). En general, los peces parecen mostrar una reducida capacidad para digerir carbohidratos no pretratados y de mayor complejidad molecular. Por ejemplo, el empleo de almidón crudo en comparación con el gelatinizado, o el uso de carbohidratos de menor peso molecular (dextrina, maltosa, glucosa, etc.) disminuye los coeficientes de digestibilidad aparente de este nutriente en especies como la trucha arcoiris (Bergot y Breque, 1983; Storebakken et al., 1998), lubina (Peres y Oliva-Teles, 2002; Enes et al., 2006) y dorada (Venou et al., 2003), entre otras (Erfanullah y Jafri, 1998; Grisdale-Helland y Helland, 1998; Rawles y Gatlin, 1998; Stone et al., 2003). En cuanto al nivel de inclusión, en general, la digestibilidad del almidón o de sus productos menos complejos (con excepción de la glucosa) parece disminuir cuanto mayor es su nivel en la dieta. Este hecho ha sido observado en trucha arcoiris (Singh y Nose, 1967; Brauge et al., 1994; Yamamoto et al., 2001), salmón (Hemre et al., 1995; Hillestad et al., 2001), dentón (Skalli, 2001) y lubina (Enes et al., 2006), además de en otras especies (Catacutan y Coloso, 1997; Grisdale-Helland y Helland, 1998; Hutchins et al., 1998).

El nivel adecuado de inclusión dietaria de carbohidratos digeribles se ha establecido entre un máximo recomendado del 20% para especies carnívoras, incluyendo salmónidos y peces marinos, y el 40% para especies omnívoras de agua caliente (Wilson, 1994; Stone, 2003). Sin embargo, las respuestas observadas para distintos tipos y niveles de carbohidratos son muy variadas, dependiendo de la interacción entre los factores anteriormente expuestos y de éstos con el resto de macronutrientes dietarios. De hecho, se pueden encontrar efectos contrarios a la tendencia general presentada. Así, Arnesen y Krogdahl (1993) y McMeniman (2003) observaron que un incremento en la gelatinización de los carbohidratos redujo su digestibilidad en *Salmo salar* y *Lates calcarifer*. Igualmente, Storebakken et al. (1998) observaron que en trucha arcoiris, mayores niveles de inclusión dietaria de carbohidratos generaban valores más altos del coeficiente de digestibilidad aparente de los mismos. Otros autores encontraron esta misma respuesta en otras especies (Mohapatra et al., 2003; Stone et al., 2003).

La maximización de la digestibilidad, junto con el uso metabólico de los carbohidratos, constituye, por tanto, un reto fundamental que, como ya hemos comentado, podría permitir el uso energético efectivo de este nutriente, optimizando el ahorro proteico y, por tanto, el crecimiento de los peces. En este sentido, distintos estudios muestran que tanto los índices de crecimiento como la eficiencia alimenticia fueron mayores en especies como *Anguilla anguilla* (Hidalgo et al., 1993; Sanz et al., 1993; Suárez et al., 1995), *Lates calcarifer* (Catacutan y Coloso, 1997), *Clarias batrachus* (Erfanullah y Jafri, 1998), *Oncorhynchus mykiss* (Peragón et al., 1999; Barroso et al., 2001), *Labeo rohita* (Mohapatra et al., 2003) y *Oreochromis niloticus* × *O. aureus* (Wang et al., 2005b), alimentadas con dietas de mayor contenido en carbohidratos. En general, estos resultados se encuentran respaldados por los índices de utilización proteica (CEC y VPP), que fueron mejores para los tratamientos que incluían más carbohidratos digeribles en las dietas, lo que confirmaría el buen uso de este nutriente para promover el ahorro proteico con fines estructurales (Hidalgo et al., 1993; Sanz et al., 1993; Peragón et al., 1999; Mohapatra et al., 2003; Stone et al., 2003; Wang et al., 2005b). Por el contrario, otros autores han observado que algunos de estos parámetros se veían afectados negativamente según se incrementaba el nivel de carbohidratos dietarios en distintas especies (Pérez et al., 1997; Hillestad et al., 2001; Suárez et al., 2002; Hatlen et al., 2005).

En cuanto al tipo de carbohidratos empleados, las respuestas son muy variables. En principio, al igual que en el caso de la digestibilidad, serían los carbohidratos menos complejos o pretratados los que producirían mejores resultados en crecimiento y utilización del alimento (Rawles y Gatlin, 1998; Peres y Oliva-Teles, 2002; Venou et al., 2003). Asimismo, también los índices CEC y VPP se verían favorecidos por el tratamiento previo de los carbohidratos (Peres y Oliva-Teles, 2002; Venou et al., 2003).

Sin embargo, son numerosos los estudios que demuestran que el empleo de carbohidratos digestibles más complejos conllevaría la obtención de mejores tasas de crecimiento, uso del alimento y utilización de la proteína. Así, Shiau y Chuang (1995) observaron que *Oreochromis niloticus* × *O. aureus* alimentados con almidón presentaron mejores resultados que aquellos alimentados con maltosa, sacarosa o lactosa. Igualmente, Erfanullah y Jafri (1995) obtuvieron una mejor respuesta en especímenes de *Labeo rohita* alimentados con dextrina en comparación con aquellos alimentados con sacarosa y glucosa. Similares tendencias han sido observadas en otras especies (Hutchins et al., 1998; Tan et al., 2006).

Esta diversidad de respuestas no sólo es consecuencia de las diferencias interespecíficas, ya que, al igual que ocurría en el caso de la digestibilidad, no se puede olvidar la interacción existente entre el tipo y el nivel de los carbohidratos empleados, así como la influencia del resto de nutrientes dietarios. Por ello, cuando se comparan resultados de distintos estudios se han de considerar todos estos factores para la obtención de conclusiones. En este sentido, Arockiaraj et al. (1999) observaron que para niveles superiores al 30% e inferiores al 8% de dextrina, los índices TCI, IC y CEC en *Channa striatus* disminuían. De igual forma, Fu (2005) no encontró influencia del tipo de carbohidratos (almidón crudo, almidón tratado y glucosa) sobre estos parámetros en *Silurus meridionalis*, cuando el nivel de inclusión era del 15%, mientras que los resultados eran peores en aquellos animales alimentados con las dietas que contenían glucosa, cuando el nivel de inclusión se incrementaba hasta el 30%. Otros estudios también establecen estas interacciones en *Oreochromis niloticus* × *O. aureus* y *Morone chrysops* × *M. saxatilis* (Shiau y Peng, 1993; Hutchins et al., 1998).

Por otro lado, es necesario destacar que otros autores no encuentran ningún efecto en el crecimiento, utilización del alimento o eficiencia de la proteína para crecimiento, derivado de la inclusión de distintos tipos y niveles carbohidratos en las dietas (Russell et al., 2001; Skalli, 2001; Rueda-Jasso et al., 2004; Martino et al., 2005; Enes et al., 2006).

A pesar de las discrepancias en los parámetros anteriormente comentados, existe un cierto consenso en relación con el efecto del empleo de carbohidratos digestibles sobre los niveles de glucemia post-prandial en los peces. En este sentido, y sin olvidar la influencia del tipo de carbohidratos empleados, cuando el nivel de los mismos en la dieta es elevado se puede observar la aparición de una hiperglucemia post-prandial prolongada, cuya regulación condiciona la eficacia de utilización del alimento (Wilson, 1994; Hemre et al., 2002; Stone et al., 2003; Venou et al., 2003; Krogdahl et al., 2005). Así, el mantenimiento continuo de glucosa en plasma, sin ser utilizada por las distintas vías metabólicas, podría suponer su pérdida a través de la orina, originando episodios de glucosuria que, en último término, conducirían a un deficiente aprovechamiento del alimento (Bureau, 1998; Deng et al., 2001; Peres y Oliva-Teles, 2002; Bucking y Wood, 2005).

Aunque originariamente se pensó que los peces eran diabéticos por naturaleza, posteriores estudios han demostrado que no es así. La hiperglucemia observada podría estar relacionada con los siguientes factores, en función de la especie considerada: baja actividad HK, incapacidad de regulación del enzima HK-IV, posible inhibición de la secreción de insulina por somatostatinas liberadas en respuesta a los altos niveles de glucosa en sangre, bajo número de receptores de insulina comparado con mamíferos, entre otros (Cowey et al., 1977; Furiuchi y Yone, 1982; Harmon et al. 1991; Wilson, 1994; Peragón et al., 1999; Hemre et al., 2002; Stone, 2003). Algunos autores han observado que, tras la respuesta hiperglucémica post-prandial, los niveles de glucosa plasmática no retornan a los niveles considerados normales, sino que se mantienen ligeramente elevados en comparación con los obtenidos para aquellos peces que son alimentados con dietas bajas o carentes de carbohidratos (Hemre et al., 2002). Así, Suárez et al. (2002) encontraron mayores niveles de glucosa plasmática en trucha arcoiris alimentadas con dietas de mayor contenido en carbohidratos. Similares resultados han sido observados en otras especies (Hutchins et al., 1998; Vielma et al.,



2003). Igualmente, el tipo de carbohidratos empleados también afectarían a estos niveles de glucosa, observándose respuestas variadas al igual que ocurría con el resto de parámetros comentados anteriormente (Hutchins et al., 1998; Hsieh y Shiau, 2000; Tan et al., 2006). Sin embargo, otros autores no revelan este efecto, incluso para especies en las que en estudios previos sí se observaron (Peres y Oliva-Teles, 2002; Capilla et al., 2003; Stone et al., 2003; Enes et al., 2006).

Una de las posibles claves de estas diferencias interespecíficas en los niveles de glucosa plasmática es, como acabamos de mencionar, la actividad reguladora de las enzimas HK y HK-IV, que catalizan la conversión de glucosa libre en glucosa 6-fosfato iniciando la glucólisis. La actividad HK ha sido determinada en una amplia variedad de especies (Nagayama et al., 1973; Nagayama y Ohshima, 1974; Furuichi y Yone, 1982; Sundby et al., 1991; Tranulis et al., 1991; Borrebaek et al., 1993, 2003; Blin et al., 1999; Capilla et al., 2003; Enes et al., 2006). Por su parte, la existencia del enzima HK-IV en peces ha estado mucho tiempo en debate ya que, en un principio, se pensó que los peces carecían de este enzima (Nagayama y Ohshima, 1974; Cowey et al., 1977). Sin embargo, existen estudios que han confirmado su presencia en especies como salmón, trucha arcoiris, dorada y lubina (Borrebaek et al., 1993; Tranulis et al., 1996; Blin et al., 1999; Caseras et al., 2000, 2002; Panserat et al., 2000, 2001; Capilla et al., 2003; Enes et al., 2006). Además, algunos autores han observado que las actividades de estas enzimas son dependientes del estado nutricional, pudiendo ser inducidas por los carbohidratos dietarios. En este sentido, Borrebaek et al. (1993) comprobaron que la actividad HK-IV aumentaba gradualmente en hígado de salmones alimentados con niveles crecientes (de 0% al 30%) de almidón. Distintos autores observaron este mismo efecto en la actividad HK y/o HK-IV en otras especies como trucha arcoiris, dorada, lubina, carpa, etc. (Shimeno et al., 1981; Likimani y Wilson, 1982; Caseras et al., 2000; Panserat et al., 2000, 2001; Borrebaek y Christophersen, 2001; Capilla et al., 2003; Enes et al., 2006).

El incremento en la disponibilidad de glucosa permite activar las distintas vías por las que ésta puede ser empleada. Así, la mayoría de los estudios coinciden en que el uso de carbohidratos en la alimentación de los peces produce un aumento significativo del contenido en glucógeno hepático de los animales, paralelo al aumento en la RHS (Hutchins et al., 1998; Rawles y Gatlin, 1998; Lygren y Hemre, 2002; Peres y Oliva-Teles, 2002; Suárez et al., 2002; Capilla et al., 2003; Vielma et al., 2003; Lee y Lee,

2004; Hatlen et al., 2005; Enes et al., 2006). Como el resto de parámetros, también el glucógeno y la RHS dependen del tipo de carbohidratos utilizados en la dieta, resultando, por lo general, en valores más elevados cuando se emplean carbohidratos pretratados o más complejos (Rawles y Gatlin, 1998; Hsieh y Shiau, 2000; Lygren y Hemre, 2002; Peres y Oliva-Teles, 2002; Enes et al., 2006).

Al igual que la glucólisis y la glucogénesis, la lipogénesis es otra de las rutas activadas por los carbohidratos dietarios. En este sentido, son muchos los autores que han observado un incremento de las enzimas implicadas en esta ruta. Por ejemplo, Likimani y Wilson (1982) obtuvieron que, en *Ictalurus punctatus*, todos los enzimas lipogénicos ensayados, tanto en el tejido adiposo como en el hepático, fueron estimulados por la alimentación con dietas altas en carbohidratos, mientras que la alimentación con dietas altas en lípidos produjo la inhibición de dichas actividades enzimáticas a nivel hepático. En general, el estudio de las actividades G6PDH y EM, principales enzimas generadores del NADPH necesario para la síntesis lipídica, revela que la actividad de ambos enzimas aumenta cuando los carbohidratos son incluidos en las dietas y cuando éstos son pretratados o más complejos (Borrebaek et al., 1993; Hemre et al., 1995, 2002; Lin y Shiau, 1995; Suárez et al., 1995; Álvarez et al., 1999; Barroso et al., 2001; Tan et al., 2006).

El incremento de la actividad lipogénica podría explicar parcialmente el mayor contenido en lípidos corporales observado, en general, en peces alimentados con mayor nivel de carbohidratos (Hidalgo et al., 1993; Catacutan y Coloso, 1997; Wang et al., 2005b). De nuevo, el tipo de carbohidratos influye en este parámetro, siendo los carbohidratos pretratados o más complejos los que inducen un mayor nivel de lípidos corporales (Erfanullah y Jafri, 1995; Lin y Shiau, 1995; Shiau y Chuang, 1995; Hsieh y Shiau, 2000; Venou et al., 2003). Existen, sin embargo, muchos estudios en los que el nivel de lípidos corporales no difiere entre tratamientos con distintos tipos y niveles de carbohidratos (Shiau y Peng, 1993; Arockiaraj et al., 1999; Peres y Oliva-Teles, 2002; Lee y Lee, 2004; Martino et al., 2005; Enes et al., 2006). Junto a esta heterogeneidad de respuestas, Erfanullah y Jafri (1998), Suárez et al. (2002) y Mokoginta et al. (2004) observaron un descenso en el contenido lipídico corporal en los animales alimentados con dietas que contenían mayores niveles de carbohidratos. En cuanto al hígado, se ha observado que, en general, la alimentación enriquecida con carbohidratos reduce el

contenido en lípidos de este órgano (Hutchins et al., 1998; Yamamoto et al., 2001; Lee y Lee, 2004), aunque es mayor cuando se emplean carbohidratos pretratados (Peres y Oliva-Teles, 2002; Venou et al., 2003).

Por su parte, el efecto de ahorro proteico se debería a la menor tasa glucogénica, derivada de la mayor disponibilidad de glucosa que evitaría el desvío de los aminoácidos hacia esa vía aumentando, por tanto, su disponibilidad para síntesis proteica (Hemre et al., 2002). Así, Peragón et al. (1999) observaron una mayor tasa de síntesis proteica, junto con un descenso en la degradación de las proteínas, en truchas alimentadas con dietas que contenían carbohidratos en comparación con aquellas carentes de este nutriente. Tras la alimentación con dietas ricas en carbohidratos, la actividad de enzimas gluconeogénicas, como FBPasa, muestra un descenso generalizado en especies como anguila, carpa, dorada y trucha arcoiris (Suárez et al., 1995, 2002; Panserat et al., 2002), entre otras (Walton y Cowey, 1982; Shimeno et al., 1993; Borrebaek y Christophersen, 2001). Igualmente, Suárez et al. (1995) también observaron una disminución en la actividad del enzima GDH hepática, implicada en la degradación de aminoácidos, en aquellas anguilas alimentadas con las dietas de mayor contenido en carbohidratos. En aquellos casos en los que la actividad gluconeogénica no es regulada, la glucosa producida por esta vía podría ser liberada al torrente sanguíneo y, junto con aquella procedente de la alimentación, podría inducir hiperglucemia. Si esta hiperglucemia es mantenida en el tiempo podría conducir, como comentábamos anteriormente, a un uso ineficiente del alimento.

Por otro lado, la composición dietaria ejerce una influencia importante tanto sobre la generación de los agentes oxidantes como en los mecanismos de defensa antioxidante. En este sentido, son muchos los ensayos dirigidos a determinar la influencia de los lípidos, vitaminas o minerales sobre estos parámetros en peces (Martínez-Álvarez et al., 2005). Sin embargo, muy pocos autores han estudiado el papel que ejercen los carbohidratos dietarios sobre el estado oxidativo de los peces (Álvarez et al., 1999; Lygren y Hemre, 2002; Rueda-Jasso et al., 2004). Los resultados de estos estudios arrojan, de nuevo, respuestas diversas. Así, mientras que Rueda-Jasso et al. (2004) no encontraron efectos significativos del tipo ni del nivel de carbohidratos sobre la actividad CAT o SOD hepática en lenguado, Lygren y Hemre (2002) indicaron, en salmón, una reducción en la actividad de estos enzimas cuando los niveles de

carbohidratos incluidos en la dieta se incrementaban, aunque no se vieron influenciadas por el tipo empleado. Además, estos mismos autores observaron un descenso en la actividad GPX en los peces alimentados con dietas que contenían almidón, en comparación con las que contenían glucosa. En cuanto al daño oxidativo en hígado, los niveles de peroxidación lipídica no se vieron significativamente afectados por el nivel de carbohidratos dietarios en salmón (Lygren y Hemre, 2002), pero sí en lenguado y trucha arcoiris, donde fueron inferiores cuando se emplearon niveles más elevados (Álvarez et al., 1999; Rueda-Jasso et al., 2004).

Un punto de conexión entre la influencia de los carbohidratos y los mecanismos de defensa antioxidante ha sido establecido a través de la vía de las pentosas fosfato. Así, una actividad incrementada en el enzima G6PDH cuando se emplean carbohidratos para la alimentación de los peces, como mencionábamos anteriormente, podría suministrar NADPH no solamente para la síntesis lipídica, sino también para la necesaria regeneración del glutatión oxidado a reducido (Lygren y Hemre, 2002). Esta conexión entre la actividad G6PDH y la reducción del glutatión ha sido indicada en varios estudios para mamíferos y peces (Winston y Di Giulio, 1991; Fynn-Aikins et al., 1992; Pandolfi et al., 1995; Salvemini et al., 1999; Tian et al., 1999; Leopold y Loscalzo, 2000; Morales et al., 2004). Adicionalmente, Sagone et al. (1983) indicaron que la glucosa puede actuar como “capturador” de radicales hidroxilo (OH) en células fagocíticas humanas, por lo que podría constituir por sí misma un mecanismo de defensa antioxidante.

## 2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 2.2.1. Dietas experimentales y alimentación

Para llevar a cabo los objetivos de este ensayo, se formularon y fabricaron 9 dietas experimentales que combinaban el uso de tres tipos (almidón pregelatinizado, dextrina y maltodextrina) y tres niveles (12%, 18% y 24%) de hidratos de carbono. El contenido en proteína (43%) se mantuvo constante, mientras que la proporción de lípidos dietarios varió en función del contenido en carbohidratos (% lípidos / % H.C.: 25.1/12; 22.5/18; 19.9/24), con el fin de mantener constante la energía bruta de la dieta (22 MJ kg<sup>-1</sup>). En consecuencia, la relación proteína/energía (19.5 g MJ<sup>-1</sup>) también se mantuvo constante. El tamaño de grano empleado en la fabricación de las dietas fue de 1.9 mm. Se tomaron muestras de los piensos elaborados para determinar su composición analítica, incluyendo el contenido en cromo. El sistema de elaboración, almacenamiento y técnicas analíticas de composición de los piensos se encuentran descritos en el apartado de material y métodos. La formulación y composición analítica de las dietas se encuentran reflejadas en la Tabla IV-9. Las dietas experimentales se suministraron manualmente hasta saciedad aparente en tres tomas diarias.

### 2.2.2. Animales y mantenimiento

Los animales objeto de experimentación fueron juveniles de *Dentex dentex*, con un peso medio inicial de  $9.76 \pm 0.05$  g. Los peces se distribuyeron al azar, en 9 lotes triplicados (25 individuos/lote) a los que se les asignaron cada una de las 9 dietas formuladas. Cada lote se alojó en tanques cilíndricos de fibra de vidrio gris, de 230 litros de capacidad, abastecidos con agua de mar (37 % de salinidad), en circuito abierto y con un flujo continuo de 6.5 l min<sup>-1</sup>. El fotoperiodo fue de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. La temperatura media del agua fue de  $25.3 \pm 2.0$  °C y los niveles medios de oxígeno disuelto nunca fueron inferiores al 80% del nivel de saturación.

Tabla IV-9. Formulación y composición analítica de las dietas experimentales del ensayo de utilización de distintos tipos y niveles de carbohidratos.

	DIETAS																	
	Al <sub>2</sub>		Al <sub>18</sub>		Al <sub>24</sub>		Dx <sub>12</sub>		Dx <sub>18</sub>		Dx <sub>24</sub>		Mx <sub>12</sub>		Mx <sub>18</sub>		Mx <sub>24</sub>	
	25.1 / 12	22.5 / 18	19.9 / 24	25.1 / 12	22.5 / 18	19.9 / 24	25.1 / 12	22.5 / 18	19.9 / 24	25.1 / 12	22.5 / 18	19.9 / 24	25.1 / 12	22.5 / 18	19.9 / 24	25.1 / 12	22.5 / 18	19.9 / 24
<i>Ingredientes (g 100 g dieta ss<sup>-1</sup>)</i>																		
Harina de pescado	58.34	58.34	58.34	58.34	58.34	58.34	58.34	58.34	58.34	58.34	58.34	58.34	58.34	58.34	58.34	58.34	58.34	58.34
Aceite de pescado	18.78	16.17	13.56	18.78	16.17	13.56	18.78	16.17	13.56	18.78	16.17	13.56	18.78	16.17	13.56	18.78	16.17	13.56
Lecitina	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Almidón pregelatinizado	12.00	18.00	24.00															
Dextrina				12.00	18.00	24.00												
Maltodextrina							12.00	18.00	24.00									
Complemento mineral <sup>1</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Complemento vitamínico <sup>1</sup>	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Cloruro de colina	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Ascorbil palmitato	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Cromo	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Hidroxipropil-metil celulosa	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Celulosa microcristalina	6.98	3.59	0.20	6.98	3.59	0.20	6.98	3.59	0.20	6.98	3.59	0.20	6.98	3.59	0.20	6.98	3.59	0.20
<i>Análisis de las dietas</i>																		
Humedad (%)	4.61	3.73	4.54	5.14	5.76	6.25	5.14	5.76	6.25	6.17	6.37	6.17	6.17	6.37	6.17	6.17	6.37	6.17
Proteína (% ss)	42.77	42.23	42.96	43.14	43.07	43.66	43.14	43.07	43.66	44.54	44.58	44.54	44.54	44.58	44.54	44.54	44.58	44.30
Lípidos (% ss)	25.94	23.24	20.01	25.65	23.27	20.70	25.65	23.27	20.70	26.76	22.23	26.76	26.76	22.23	26.76	26.76	22.23	19.76
Ceniza (% ss)	10.22	10.17	10.16	10.14	10.22	10.17	10.14	10.22	10.17	10.19	10.54	10.17	10.19	10.54	10.17	10.19	10.54	10.15
MELN (% ss)	21.06	24.36	26.87	21.06	23.44	25.48	21.06	23.44	25.48	18.51	24.65	18.51	18.51	24.65	18.51	18.51	24.65	25.79

<sup>1</sup> Composición de los complementos vitamínico y mineral indicada en Tabla III-I.

Una vez alojados en los tanques, los peces fueron sometidos a una fase de adaptación a las condiciones del ensayo (1 semana). Posteriormente, comenzó la fase experimental, cuya duración fue de 9 semanas. Transcurrido este tiempo, y una vez realizado el muestreo, los animales restantes pertenecientes a las dietas con mayor y menor contenido en carbohidratos de cada una de las fuentes, fueron realojados en tanques cilíndricos de fibra de vidrio gris, de 500 litros de capacidad, especialmente preparados para ensayos de digestibilidad. El tiempo de adaptación en este caso fue de 4 días, mientras que la duración de esta nueva fase experimental fue de al menos 4 semanas, prolongándose en algunos casos, hasta que las muestras de heces recogidas fueron suficientes para realizar los análisis. Durante este tiempo, cada uno de los 6 lotes fue alimentado con las mismas 6 dietas experimentales que les habían sido suministradas en la fase previa. Las condiciones de salinidad, flujo, temperatura, oxígeno y fotoperiodo fueron similares a las descritas anteriormente.

### 2.2.3. Toma de muestras, parámetros calculados y análisis realizados

Tanto la ingesta como la mortalidad fueron registradas diariamente en cada uno de los lotes experimentales. El peso individual de los animales fue obtenido al inicio del experimento, mientras que al final se pesaron los lotes completos. Durante la fase experimental de digestibilidad se recogió la cantidad de heces necesaria para realizar análisis de composición y contenido en cromo de las mismas. Un total de 10 peces al inicio del experimento y de 3 peces por lote (9 por dieta) al término de éste, fueron muestreados para determinar su composición corporal. Transcurridas las 9 semanas de experimentación, se tomaron muestras de sangre, hígado y músculo blanco de otros 3 peces por lote (9 peces por dieta). Los hígados muestreados fueron pesados en el momento de la extracción. Tanto los peces destinados a análisis de composición como a extracción de sangre y tejidos fueron medidos (longitud total) y pesados individualmente.

La metodología empleada para la toma de muestras, así como para su procesamiento y análisis, y la descripción de los índices determinados se encuentran detalladas en el apartado de material y métodos general, así como en el Anexo I.

Se calcularon el incremento de peso y se valoraron los índices IC, TCI, CEC, VPP, VPL, IN, RHS así como los coeficientes de digestibilidad aparente CDA-P, CDA-L, CDA-MS y CDA-MO.

De las muestras de sangre se extrajo el plasma, en el que se determinó el contenido en glucosa, colesterol total, colesterol HDL y LDL, triglicéridos, lípidos totales, aminoácidos y proteína plasmática. Las muestras hepáticas y musculares fueron empleadas en el análisis de su contenido en lípidos y glucógeno, así como para la determinación de las actividades de los enzimas del metabolismo intermediario HK, HK-IV, PK, FBPasa, GK, GDH, GOT, GPT, CS, G6PDH, EM, HOAD, ACoAT y  $\beta$ -OHBDH. Sobre ambas muestras, también se llevó a cabo una valoración del posible daño oxidativo (MDA y grupos carbonilo, estos últimos sólo en hígado) producido por las especies de oxígeno reactivo y de las actividades de los enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPX y GR. Por último, tanto el patrón isoenzimático hepático como muscular de la SOD fue analizado mediante técnicas electroforéticas.

Para poner de manifiesto el efecto general y combinado de los distintos tipos y niveles de hidratos de carbono empleados sobre los parámetros medidos se aplicó el Análisis de la Varianza de dos vías. Los niveles de confianza considerados en las comparaciones fueron del 95% ( $P < 0.05$ ), 99% ( $P < 0.01$ ) y 99.9% ( $P < 0.001$ ). En los casos en los que el análisis de la varianza confirmó la existencia de diferencias significativas producidas por el tipo o por el nivel de carbohidratos utilizados, se aplicó el test de Tukey HSD.



## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Crecimiento e índices biométricos

Los resultados de crecimiento e índices biométricos en juveniles de dentón alimentados con los distintos tratamientos dietarios se encuentran reflejados en la Tabla IV-10. Se puede observar que ninguno de los valores de crecimiento (peso final, incremento de peso y TCI) mostró influencia significativa alguna del tipo o del nivel de carbohidratos utilizados en los distintos tratamientos, ni de ambos parámetros en conjunto. Por su parte, el IN no se vio afectado por el tipo de carbohidratos empleados en la alimentación de los juveniles de dentón, aunque sí por el nivel. También se observaron diferencias significativas en el IN cuando los datos fueron analizados considerando la interacción conjunta de tipo y nivel de carbohidratos. En cuanto a la RHS, aunque la estadística no mostró influencia debido al tipo o al nivel de carbohidratos, considerados aisladamente, la combinación de ambos generó diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

Tabla IV-10. Crecimiento e índices biométricos en juveniles de dentón alimentados con distintos tipos y niveles de carbohidratos.

<b>Dieta</b>	<b>Peso Medio Inicial (g)</b>	<b>Peso Medio Final (g)</b>	<b>Δ Peso (%)</b>	<b>TCI (%)</b>	<b>IN (g cm<sup>-3</sup>)</b>	<b>RHS (%)</b>
<b>Al<sub>12</sub></b>	9.86 ± 0.16	53.23 ± 3.39	440.9 ± 41.6	2.76 ± 0.12	1.59 ± 0.03	2.03 ± 0.13
<b>Al<sub>18</sub></b>	9.49 ± 0.05	50.44 ± 1.32	431.4 ± 12.3	2.74 ± 0.04	1.52 ± 0.02	1.83 ± 0.06
<b>Al<sub>24</sub></b>	9.98 ± 0.03	57.91 ± 4.79	480.5 ± 49.5	2.87 ± 0.14	1.91 ± 0.09	1.61 ± 0.05
<b>Dx<sub>12</sub></b>	9.62 ± 0.13	53.95 ± 0.44	461.1 ± 12.1	2.83 ± 0.04	1.61 ± 0.05	1.75 ± 0.06
<b>Dx<sub>18</sub></b>	9.71 ± 0.05	64.04 ± 6.72	560.2 ± 72.0	3.07 ± 0.19	1.79 ± 0.07	1.90 ± 0.08
<b>Dx<sub>24</sub></b>	9.80 ± 0.13	59.35 ± 2.05	505.1 ± 13.0	2.95 ± 0.03	1.76 ± 0.10	1.76 ± 0.07
<b>Mx<sub>12</sub></b>	9.87 ± 0.02	52.02 ± 1.98	427.3 ± 18.9	2.72 ± 0.06	1.70 ± 0.09	1.62 ± 0.06
<b>Mx<sub>18</sub></b>	9.60 ± 0.03	64.96 ± 4.90	576.6 ± 51.8	3.12 ± 0.12	1.75 ± 0.08	1.71 ± 0.08
<b>Mx<sub>24</sub></b>	9.91 ± 0.17	57.91 ± 1.93	484.2 ± 9.7	2.89 ± 0.03	1.73 ± 0.07	1.82 ± 0.08
<b>Tipo (Al-Dx-Mx)</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Nivel (12-18-24)</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	a-ab-b *	n.s.
<b>Tipo×Nivel</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	**

Los resultados son media ± E.S. de tres lotes experimentales, excepto en IN (n = 18) y RHS (n = 9). En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.

### 2.3.2. Ingesta, utilización nutritiva del alimento y supervivencia

En la Tabla IV-11 se muestran los resultados de ingesta, utilización nutritiva del alimento y supervivencia de los distintos tratamientos dietarios en juveniles de dentón. Como se puede observar, tan sólo el nivel de carbohidratos dietarios mostró efectos significativos sobre la ingesta, IC y CEC, de forma que mientras que la mayor ingesta fue registrada en los animales alimentados con el mayor nivel de carbohidratos dietarios (24%), a este nivel, los índices IC y CEC presentaron los valores más bajos, siendo los más altos los registrados para el tratamiento dietario con un contenido en carbohidratos del 18%. Por otro lado, no se observó influencia alguna del tipo, nivel o de la interacción de ambos parámetros sobre los índices VPP y VPL, ni sobre la supervivencia de los animales.

Tabla IV-11. Ingesta, utilización nutritiva de la dieta y supervivencia en juveniles de dentón alimentados con distintos tipos y niveles de carbohidratos.

<b>Dieta</b>	<b>Ingesta</b> (g 100 g pez <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	<b>IC</b>	<b>CEC</b>	<b>VPP</b> (%)	<b>VPL</b> (%)	<b>Supervivencia</b> (%)
<b>Al<sub>12</sub></b>	2.41 ± 0.16	0.94 ± 0.03	2.18 ± 0.08	31.85 ± 5.26	33.98 ± 3.31	74.00 ± 1.15
<b>Al<sub>18</sub></b>	2.32 ± 0.03	0.97 ± 0.02	2.25 ± 0.04	30.04 ± 0.14	32.90 ± 3.98	76.00 ± 4.62
<b>Al<sub>24</sub></b>	2.51 ± 0.08	0.92 ± 0.01	2.14 ± 0.01	20.77 ± 1.95	19.25 ± 3.97	78.67 ± 7.42
<b>Dx<sub>12</sub></b>	2.23 ± 0.02	1.02 ± 0.01	2.38 ± 0.03	26.75 ± 3.74	30.42 ± 2.24	57.33 ± 11.39
<b>Dx<sub>18</sub></b>	2.49 ± 0.15	0.97 ± 0.08	2.26 ± 0.19	29.64 ± 1.77	25.79 ± 3.65	60.00 ± 11.55
<b>Dx<sub>24</sub></b>	2.54 ± 0.08	0.93 ± 0.03	2.16 ± 0.07	35.13 ± 4.29	39.93 ± 11.97	66.67 ± 10.41
<b>Mx<sub>12</sub></b>	2.31 ± 0.09	0.97 ± 0.03	2.25 ± 0.08	35.24 ± 3.66	27.18 ± 9.25	61.33 ± 5.81
<b>Mx<sub>18</sub></b>	2.21 ± 0.07	1.10 ± 0.06	2.56 ± 0.14	36.19 ± 1.63	31.88 ± 3.74	72.00 ± 9.24
<b>Mx<sub>24</sub></b>	2.63 ± 0.05	0.88 ± 0.01	2.05 ± 0.03	30.73 ± 2.07	29.35 ± 2.65	80.00 ± 4.00
<b>Tipo (Al-Dx-Mx)</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Nivel (12-18-24)</b>	a-a-b **	ab-b-a *	ab-b-a *	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Tipo×Nivel</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Los resultados son media ± E.S. de tres lotes experimentales. En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.

### 2.3.3. Coeficientes de digestibilidad aparente

Los coeficientes de digestibilidad aparente de los principales macronutrientes de las dietas experimentales empleadas en la alimentación de juveniles de dentón se muestran en la Tabla IV-12.

El CDA de la proteína se vio influenciado tanto por el tipo como por el nivel de carbohidratos, a la vez que también mostró diferencias significativas en la combinación de estos factores. En este sentido, la maltodextrina fue la fuente que desveló los mayores valores de digestibilidad para la proteína, mientras que la dextrina generó los más bajos, encontrándose el almidón en un nivel intermedio. Asimismo, un nivel del 12% promovió los CDA proteicos más elevados.

Por el contrario, el CDA de los lípidos y de la materia seca no reflejaron ninguna diferencia significativa entre tratamientos como consecuencia del tipo o nivel de carbohidratos, ni de la interacción entre ambos parámetros.

En cuanto al CDA de la materia orgánica, aunque cuando se consideraron tipo y nivel conjuntamente no se observó ningún tipo de efecto, sí se reflejó cuando estos parámetros se analizaron aisladamente. Así, fue de nuevo la maltodextrina la fuente que promovió los mayores valores de digestibilidad de la materia orgánica. Por su parte, los grupos alimentados con almidón y dextrina mostraron los valores significativamente más bajos. En cuanto al nivel, al contrario que en el caso de la proteína, la inclusión del 12% en las dietas, generó los CDA de materia orgánica más bajos.

Tabla IV-12. Coeficientes de digestibilidad aparente de los principales macronutrientes en juveniles de dentón alimentados con distintos tipos y niveles de carbohidratos. Los datos se expresan como % ss.

<b>Dieta</b>	<b>CDA-P</b>	<b>CDA-L</b>	<b>CDA-MS</b>	<b>CDA-MO</b>
<b>Al<sub>12</sub></b>	79.56 ± 0.63	87.53 ± 0.37	53.75 ± 1.36	64.51 ± 1.04
<b>Al<sub>24</sub></b>	80.55 ± 0.62	91.04 ± 0.29	55.93 ± 1.41	68.75 ± 1.00
<b>Dx<sub>12</sub></b>	78.54 ± 1.25	87.42 ± 0.76	53.80 ± 2.80	68.88 ± 1.89
<b>Dx<sub>24</sub></b>	77.53 ± 0.19	89.02 ± 0.09	56.45 ± 0.37	69.64 ± 0.26
<b>Mx<sub>12</sub></b>	84.90 ± 0.57	91.01 ± 0.32	60.27 ± 1.43	74.95 ± 0.90
<b>Mx<sub>24</sub></b>	77.56 ± 1.64	85.87 ± 1.03	58.82 ± 3.00	77.49 ± 1.64
<b>Tipo (Al-Dx-Mx)</b>	ab-a-b *	n.s.	n.s.	a-a-b ***
<b>Nivel (12-24)</b>	b-a **	n.s.	n.s.	a-b *
<b>Tipo×Nivel</b>	**	n.s.	n.s.	n.s.

Los resultados son media ± E.S. de tres lotes experimentales. En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.

#### 2.3.4. Composición corporal

En la Tabla IV-13 se muestran los resultados de composición corporal de los juveniles de dentón alimentados con las distintas dietas. Como se puede observar, el nivel de carbohidratos incluidos en la dieta no tuvo ningún efecto sobre la composición corporal de los dentones alimentados con los distintos tratamientos dietarios. Sin embargo, el tipo de carbohidratos utilizados, así como la combinación de tipo y nivel, sí produjeron diferencias significativas en todos los parámetros de composición corporal determinados. Así, mientras que la maltodextrina generó los mayores niveles de humedad, ceniza y proteína de los dentones alimentados con este tipo de carbohidratos, la dextrina reflejó los niveles más bajos, encontrándose el almidón en un punto intermedio entre ambos tipos de carbohidratos. Inversamente, la mayor concentración de proteína corporal fue la originada por el tratamiento con maltodextrina, mientras que la más baja fue el de la dextrina, volviendo a localizar al almidón en un nivel intermedio sin diferencias significativas respecto a las otras dos fuentes.

Tabla IV-13. Composición corporal de juveniles de dentón alimentados con distintos tipos y niveles de carbohidratos.

<b>Dieta</b>	<b>Humedad</b> (%)	<b>Ceniza</b> (% ss)	<b>Grasa</b> (% ss)	<b>Proteína</b> (% ss)
<b>Al<sub>12</sub></b>	68.40 ± 0.36	15.09 ± 0.30	23.81 ± 0.94	52.73 ± 0.74
<b>Al<sub>18</sub></b>	69.31 ± 0.39	15.41 ± 0.30	23.10 ± 1.02	54.61 ± 0.58
<b>Al<sub>24</sub></b>	72.31 ± 0.58	19.45 ± 0.83	17.47 ± 1.72	59.25 ± 1.27
<b>Dx<sub>12</sub></b>	68.97 ± 0.36	15.65 ± 0.46	21.74 ± 0.74	53.22 ± 0.72
<b>Dx<sub>18</sub></b>	69.77 ± 0.54	16.03 ± 0.39	20.55 ± 0.95	53.81 ± 0.82
<b>Dx<sub>24</sub></b>	68.55 ± 0.85	15.48 ± 0.89	24.61 ± 2.26	53.49 ± 1.45
<b>Mx<sub>12</sub></b>	71.21 ± 0.82	18.48 ± 1.11	19.22 ± 1.42	57.59 ± 1.45
<b>Mx<sub>18</sub></b>	70.19 ± 0.70	16.94 ± 0.83	19.17 ± 1.02	55.81 ± 1.41
<b>Mx<sub>24</sub></b>	69.61 ± 0.54	16.36 ± 0.46	20.17 ± 1.48	55.45 ± 1.06
<b>Tipo (Al-Dx-Mx)</b>	ab-a-b *	ab-a-b *	ab-b-a *	ab-a-b **
<b>Nivel (12-18-24)</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Tipo×Nivel</b>	***	***	**	**

Los resultados son media ± E.S. (n = 9). En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.

### 2.3.5. Contenido de glucógeno y lípidos en hígado y músculo blanco

La interacción del tipo y del nivel de carbohidratos utilizados en las distintas dietas tuvo efectos significativos en el contenido de glucógeno y lípidos, tanto en el tejido hepático como en el muscular (Tabla IV-14). Sin embargo, cuando fueron considerados aisladamente, mientras que el glucógeno hepático no se vio influenciado ni por el tipo ni por el nivel de carbohidratos, el glucógeno muscular mostró diferencias significativas como consecuencia de la influencia de ambos parámetros. Así, el almidón y la dextrina generaron los niveles más elevados de glucógeno muscular. Por su parte, niveles de inclusión del 12% o del 24% dieron lugar a los contenidos más bajos de glucógeno en el músculo blanco. En cuanto a los lípidos, mientras que en músculo blanco, ni el tipo ni el nivel modificaron significativamente su contenido, en hígado, los valores más bajos fueron los presentados en los tratamientos con almidón y maltodextrina, y con los niveles al 18% y al 24%.

Tabla IV-14. Efecto de la alimentación con distintos tipos y niveles de carbohidratos en el contenido en lípidos y glucógeno en hígado y músculo blanco de juveniles de dentón.

Dieta	Glucógeno (mg glucosa g tejido <sup>-1</sup> )		Lípidos (mg g tejido <sup>-1</sup> )	
	Hígado	Músculo	Hígado	Músculo
<b>Al<sub>12</sub></b>	131.0 ± 7.5	0.29 ± 0.03	51.20 ± 2.68	17.97 ± 1.59
<b>Al<sub>18</sub></b>	122.2 ± 2.6	0.49 ± 0.04	36.53 ± 1.42	19.18 ± 1.95
<b>Al<sub>24</sub></b>	99.3 ± 3.9	0.33 ± 0.04	50.91 ± 3.91	20.70 ± 2.01
<b>Dx<sub>12</sub></b>	131.2 ± 4.8	0.29 ± 0.02	56.17 ± 2.87	15.46 ± 0.66
<b>Dx<sub>18</sub></b>	128.7 ± 5.2	0.43 ± 0.04	58.11 ± 4.50	20.16 ± 1.82
<b>Dx<sub>24</sub></b>	111.0 ± 4.3	0.31 ± 0.03	57.95 ± 1.57	14.86 ± 0.54
<b>Mx<sub>12</sub></b>	106.7 ± 3.0	0.18 ± 0.02	59.94 ± 2.08	19.53 ± 0.86
<b>Mx<sub>18</sub></b>	116.2 ± 4.6	0.20 ± 0.01	42.28 ± 3.15	13.78 ± 0.36
<b>Mx<sub>24</sub></b>	133.5 ± 5.9	0.26 ± 0.01	37.22 ± 2.46	17.02 ± 1.44
<b>Tipo (Al-Dx-Mx)</b>	n.s.	b-b-a ***	a-b-a ***	n.s.
<b>Nivel (12-18-24)</b>	n.s.	a-b-a ***	b-a-a ***	n.s.
<b>Tipo×Nivel</b>	***	**	***	**

Los resultados son media ± E.S. (n = 9). En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.

### 2.3.6. Metabolitos plasmáticos

La Tabla IV-15 muestra los efectos de los distintos tratamientos dietarios sobre los niveles de metabolitos plasmáticos en los dentones sometidos a experimentación.

En todos los casos, excepto en la glucosa y en el colesterol HDL, la interacción tipo y nivel produjeron efectos significativos sobre los distintos metabolitos plasmáticos analizados. En cuanto al efecto aislado del tipo de carbohidratos a emplear, no se mostraron diferencias significativas, ni en la concentración de las proteínas plasmáticas ni en las del colesterol HDL, como consecuencia de este factor. Por el contrario, en el caso de la glucosa, triglicéridos, colesterol total y colesterol LDL se observó que, los menores niveles de dichos metabolitos en plasma fueron aquellos pertenecientes a los dentones alimentados con maltodextrina, frente a los grupos alimentados con almidón y dextrina que reportaron las concentraciones más elevadas de estos metabolitos en plasma sin presentar diferencias significativas entre ambos. Igualmente, también los

aminoácidos y los lípidos totales reflejaron efectos significativos como consecuencia del tipo de carbohidratos empleados. Así, tanto en los aminoácidos como en los lípidos totales, la maltodextrina fue la fuente que causó las concentraciones más bajas de estos metabolitos en plasma, seguidos por la dextrina y finalmente por el almidón, el cual no fue significativamente diferente de la dextrina ni de la maltodextrina en el caso de los aminoácidos totales, pero sí en los lípidos totales, en cuyo caso fue la fuente responsable de los niveles más elevados de este metabolito en plasma.

Respecto a la influencia del nivel de carbohidratos incluidos en las dietas, las únicas influencias significativas se presentaron en las concentraciones de proteína, lípidos totales y colesterol total. En el caso de la proteína, fueron los tratamientos dietarios con los niveles de inclusión del 12% y 24% los que mostraron los valores más bajos de este metabolito en plasma. Para los lípidos totales, el empleo del 24% de carbohidratos en la dieta supuso la concentración más baja de este metabolito en plasma. Finalmente, niveles del 18% y 24% promovieron las concentraciones más bajas de colesterol total plasmático.

### 2.3.7. Metabolismo intermediario

#### *Hígado*

En la Tabla IV-16 se recogen las actividades específicas de los enzimas del metabolismo intermediario en hígado de juveniles de dentón alimentados con distintos tipos y niveles de carbohidratos. La interacción tipo y nivel de carbohidratos generó diferencias significativas en los enzimas HK, PK, FBPasa, GDH, GPT, CS, G6PDH, HOAD, ACoAT y  $\beta$ -OHBDH. Por su parte, la consideración aislada del tipo de carbohidrato utilizado generó distintos efectos en función de los enzimas a considerar, excepto en las actividades HK-IV, FBPasa, GK, GDH, GOT, CS, HOAD y ACoAT, en las que no se observó ninguna influencia de este factor. Respecto a los enzimas glucolíticos sobre las que sí se observaron efectos significativos del tipo de carbohidratos dietarios utilizados, tanto los enzimas HK como PK presentaron los niveles de actividad más elevados en aquellos tratamientos en los que se empleó almidón como fuente carbohidratada.

Tabla IV-15. Efecto sobre los niveles de metabolitos plasmáticos en juveniles de dentón alimentados con distintos tipos y niveles de carbohidratos. Los datos se expresan como mg dl<sup>-1</sup>.

<b>Dieta</b>	<b>Glucosa</b>	<b>Aminoácidos totales</b>	<b>Proteína</b>	<b>Lípidos totales</b>	<b>Triglicéridos</b>	<b>Colesterol total</b>	<b>Colesterol HDL</b>	<b>Colesterol LDL</b>
<b>Al<sub>12</sub></b>	80.80 ± 1.76	409.3 ± 19.9	6700.4 ± 374.0	2792.0 ± 127.4	301.1 ± 22.3	1041.8 ± 80.5	393.2 ± 18.4	404.6 ± 14.3
<b>Al<sub>18</sub></b>	85.39 ± 1.21	403.3 ± 14.5	6620.4 ± 424.6	2735.9 ± 109.0	316.2 ± 19.1	862.7 ± 35.8	354.7 ± 9.5	431.6 ± 25.9
<b>Al<sub>24</sub></b>	77.80 ± 2.02	286.7 ± 18.5	4165.2 ± 143.7	2291.0 ± 7.5	257.6 ± 22.6	767.3 ± 22.2	347.2 ± 11.9	437.1 ± 15.9
<b>Dx<sub>12</sub></b>	82.20 ± 1.80	403.9 ± 16.9	5298.5 ± 417.8	2064.0 ± 168.0	281.7 ± 21.4	921.0 ± 19.4	357.7 ± 15.4	438.1 ± 28.4
<b>Dx<sub>18</sub></b>	84.33 ± 0.71	405.4 ± 12.1	6280.6 ± 179.9	2389.4 ± 57.6	369.1 ± 20.3	844.1 ± 20.8	362.3 ± 6.3	472.3 ± 14.1
<b>Dx<sub>24</sub></b>	78.53 ± 3.64	361.1 ± 30.6	5523.7 ± 253.2	1669.0 ± 63.1	247.9 ± 14.3	692.0 ± 22.7	337.2 ± 6.5	402.3 ± 13.1
<b>Mx<sub>12</sub></b>	74.82 ± 1.83	319.1 ± 14.9	4558.8 ± 419.6	1999.6 ± 80.6	293.7 ± 43.0	739.6 ± 45.4	352.1 ± 17.8	317.3 ± 17.2
<b>Mx<sub>18</sub></b>	72.87 ± 1.87	291.9 ± 26.4	5927.2 ± 395.3	1661.8 ± 82.6	170.7 ± 28.7	604.4 ± 31.5	327.7 ± 14.7	292.1 ± 11.3
<b>Mx<sub>24</sub></b>	75.50 ± 2.33	386.5 ± 21.0	5515.0 ± 463.3	1687.5 ± 28.3	241.6 ± 28.3	698.2 ± 25.3	345.7 ± 12.1	345.6 ± 15.0
<b>Tipo (Al-Dx-Mx)</b>	b-b-a ***	ab-b-a **	n.s.	c-b-a ***	b-b-a **	b-b-a ***	n.s.	b-b-a ***
<b>Nivel (12-18-24)</b>	n.s.	n.s.	a-b-a ***	b-b-a ***	n.s.	b-a-a ***	n.s.	n.s.
<b>Tipo×Nivel</b>	n.s.	***	***	**	**	**	n.s.	*

Los resultados son media ± E.S. (n = 9). En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.



En cuanto al metabolismo proteico, la actividad GPT, único enzima que se vio afectado por el tipo de carbohidratos empleados, fueron las fuentes dextrina y maltodextrina las que generaron los niveles más bajos y altos de actividad, respectivamente, mientras que el almidón produjo valores de actividad situados entre esas dos fuentes sin diferir estadísticamente con ninguna de ellas.

Por su parte, los enzimas productores de NADPH, G6PDH y EM, presentaron los valores de actividad más bajos cuando la fuente empleada fue la maltodextrina, aunque en el caso de la G6PDH, el almidón no difirió significativamente ni de la maltodextrina ni de la dextrina, siendo esta última la que generó la mayor actividad para este enzima. En el caso del EM, los mayores niveles de actividad fueron producidos tanto por el almidón como por la dextrina indistintamente. Por otra parte, los niveles más elevados de actividad el enzima  $\beta$ -OHBDH, perteneciente al metabolismo de cuerpos cetónicos, fueron promovidos por el empleo de dextrina, frente al almidón que produjo los valores más bajos, encontrándose la maltodextrina en un punto intermedio sin diferir significativamente de los resultados observados para las otras dos fuentes dietarias.

En cuanto a la consideración aislada del nivel de carbohidratos empleados en los distintos tratamientos dietarios, no se observaron efectos sobre las actividades de los enzimas HK-IV, GOT, GPT, CS y HOAD. En cuanto al resto de enzimas, las respuestas a los distintos niveles de carbohidratos utilizados fueron muy dispares en función del enzima a considerar. Así, para el enzima HK, el 12% y el 18% de inclusión generaron los valores más bajos y altos de actividad, respectivamente, localizándose los resultados del nivel del 24% en una posición intermedia sin diferencias significativas con respecto a los otros dos niveles.

En el caso de la PK, 18%, 24% y 12% dieron lugar a los niveles más bajos, medios y altos de actividad para este enzima, respectivamente. Respecto a la FBPasa, los niveles de 24% y 12% generaron las actividades más altas y bajas respectivamente, situándose el grupo del 18% en un punto central sin diferir estadísticamente con los otros dos niveles. El enzima GK presentó los mismos efectos que los comentados para el enzima HK.

En cuanto a la GDH, las actividades más bajas y altas fueron aquellas presentadas por los niveles 18% y 24%, respectivamente, mientras que aquel correspondiente al 12% fue significativamente similar a estos dos niveles, generando por tanto valores intermedios.

Para la G6PDH, 24%, 12% y 18% fueron los niveles que produjeron las actividades significativamente más bajas, medias y altas, respectivamente. En el caso del EM, tanto 12% como 24% dieron lugar a los valores más bajos de actividad. Para el enzima ACoAT, un nivel del 12% dio lugar a la actividad más baja presentada por este enzima.

Finalmente, el enzima  $\beta$ -OHBDH, mostró los valores más bajos y altos en aquellos grupos que incluían un 18% y 12% de carbohidratos dietarios, respectivamente, situándose en un punto intermedio, sin diferencias significativas respecto a esos dos niveles, el grupo correspondiente al nivel del 24% de carbohidratos.

#### *Músculo blanco*

Los resultados presentados en la Tabla IV-17, correspondientes a músculo blanco, revelan un claro efecto de la interacción tipo y nivel de carbohidratos sobre todos los enzimas ensayados, excepto HK y FBPasa.

Cuando se atiende aisladamente a la influencia del tipo de carbohidratos, las respuestas vuelven a ser muy diversas en función del enzima a considerar. Así, el almidón indujo los valores de actividad significativamente más elevados en los enzimas HK, GPT y EM. Por su parte, PK y GK presentaron los valores de actividad más bajos en aquellos tratamientos cuya fuente carbohidratada fue la maltodextrina.

En cuanto a los enzimas FBPasa, GOT, G6PDH y HOAD, niveles crecientes de complejidad en la fuente carbohidratada produjeron actividades enzimáticas significativamente mayores. El enzima GDH mostró la menor actividad para el tratamiento dietario con dextrina, frente a la maltodextrina y al almidón, que produjeron los niveles más elevados sin diferencias significativas entre ambas fuentes.

Tabla IV-16. Actividad específica de enzimas hepáticos relacionados con el metabolismo intermediario en juveniles de dentón alimentados con distintos tipos y niveles de carbohidratos. Los datos se expresan como mU mg proteína<sup>-1</sup>.

Dieta	HK	HK-IV	PK	FBDPasa	GK	GDH	GOT	GPT	CS	G6PDH	EM	HOAD	ACoAT	$\beta$ -OHBPDH
Al <sub>12</sub>	2.09	1.50	16.95	35.08	12.48	229.8	570.3	239.0	21.90	41.77	9.74	17.96	22.43	4.69
	±0.12	±0.20	±0.91	±2.23	±0.77	±10.7	±37.0	±18.6	±1.29	±3.50	±0.63	±0.79	±1.10	±0.50
Al <sub>18</sub>	3.39	0.62	23.29	55.05	15.34	244.4	578.6	279.8	30.89	51.81	12.88	31.80	43.00	5.96
	±0.32	±0.15	±1.48	±3.53	±0.71	±13.6	±43.0	±19.1	±1.41	±2.43	±1.62	±2.82	±3.62	±0.54
Al <sub>24</sub>	2.82	1.40	34.86	59.99	13.16	219.9	519.7	335.1	31.69	52.83	10.93	28.41	31.72	2.53
	±0.28	±0.35	±0.90	±2.36	±0.99	±14.2	±76.8	±16.9	±1.69	±1.97	±1.03	±2.57	±2.67	±0.27
Dx <sub>12</sub>	2.12	1.24	27.61	38.61	12.77	289.1	539.6	256.0	31.16	64.79	8.65	28.31	29.42	7.69
	±0.13	±0.44	±1.48	±3.57	±0.49	±16.7	±25.7	±12.5	±1.71	±4.05	±1.04	±1.32	±2.26	±0.69
Dx <sub>18</sub>	2.32	0.84	18.39	38.37	17.93	213.5	565.7	252.1	24.63	55.05	13.09	18.44	23.21	4.10
	±0.13	±0.09	±1.05	±1.36	±0.97	±5.4	±25.3	±13.3	±0.50	±3.11	±1.10	±0.49	±0.79	±0.23
Dx <sub>24</sub>	2.40	0.98	19.13	54.95	14.73	237.3	555.2	260.0	33.84	43.31	7.90	31.39	38.62	5.79
	±0.18	±0.19	±0.56	±3.22	±1.23	±15.3	±39.7	±12.4	±1.19	±2.98	±0.64	±2.09	±3.12	±0.84
Mx <sub>12</sub>	2.06	1.25	32.08	55.03	14.07	211.1	547.4	339.8	33.93	46.59	8.12	28.65	29.18	4.82
	±0.17	±0.32	±2.29	±4.22	±1.14	±15.9	±41.5	±20.2	±1.48	±2.86	±1.28	±2.44	±2.94	±0.35
Mx <sub>18</sub>	2.30	1.33	14.29	48.68	13.73	321.0	565.8	319.4	31.86	64.91	7.17	26.25	35.13	3.34
	±0.21	±0.37	±0.67	±2.52	±1.37	±15.3	±20.8	±16.5	±0.98	±3.61	±0.84	±1.91	±1.62	±0.27
Mx <sub>24</sub>	1.75	0.62	13.49	35.38	13.79	225.6	567.6	211.1	23.75	32.75	6.15	17.43	26.04	6.25
	±0.14	±0.21	±0.52	±3.39	±0.84	±13.1	±41.2	±8.2	±1.25	±3.06	±0.69	±1.07	±2.55	±0.99
Tipo (Al-Dx-Mx)	b-a-a***	n.s.	b-a-a***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	ab-a-b*	n.s.	ab-b-a*	n.s.	ab-b-a*	n.s.	ab-b-a*
	a-b-ab**	n.s.	c-a-b***	a-ab-b*	a-b-ab**	ab-b-a*	n.s.	n.s.	n.s.	ab-b-a*	n.s.	ab-b-a*	n.s.	n.s.
Tipo×Nivel	*	n.s.	***	***	n.s.	***	n.s.	***	***	***	n.s.	***	***	***
	n.s.	n.s.	***	***	n.s.	***	n.s.	***	***	***	n.s.	***	***	***

Los resultados son media ± E.S. (n = 9). En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.

Respecto a la CS, maltodextrina, almidón y dextrina produjeron significativamente las menores, medias y mayores actividades, respectivamente. En el enzima ACoAT, este orden creciente de actividad fue establecido por las diferencias significativas observadas en las fuentes, dextrina, maltodextrina y almidón. La única actividad que no se vio afectada por la fuente carbohidratada empleada fue el enzima HK-IV.

En cuanto a la consideración del efecto aislado del nivel de carbohidratos incluidos en las dietas, solamente los enzimas FBPasa, GK, GOT, CS, G6PDH y ACoAT se vieron afectados por este factor. Así, la inclusión del 12% y el 18% indujeron las actividades más bajas y más altas para el enzima FBPasa, respectivamente, situándose el grupo con un 24% de carbohidratos dietarios en un punto intermedio entre los dos anteriores niveles, sin mostrar diferencias significativas respecto a ellos.

En el caso del enzima GK, los tratamientos con el 12% y 24% de carbohidratos produjeron los menores y mayores valores de actividad respectivamente. De nuevo, el grupo perteneciente al 18% quedó en un punto intermedio entre los dos anteriores niveles sin mostrar diferencias con ellos.

Respecto a los enzimas GOT y G6PDH, un nivel del 12% de inclusión indujo los menores valores de actividad para estos enzimas. Para la CS, los tratamientos 12%, 24% y 18% generaron actividades crecientes para este enzima.

Finalmente, el enzima ACoAT presentó los valores de actividad más bajos y más altos para los tratamientos 18% y 24%, respectivamente, quedando el grupo perteneciente al 12% en un lugar intermedio, sin diferencias significativas respecto de los dos anteriores niveles.

No se detectó actividad  $\beta$ -OHBDH en el músculo blanco de los juveniles de dentón analizados.

Tabla IV-17. Actividad específica de enzimas relacionados con el metabolismo intermediario en músculo blanco de juveniles de dentón alimentados con distintos tipos y niveles de carbohidratos. Los datos se expresan como mU mg proteína<sup>-1</sup>.

Dieta	HK	HK-IV	PK	FBPasa	GK	GDH	GOT	GPT	CS	G6PDH	EM	HOAD	ACoAT	$\beta$ -OHB <sub>2</sub> DH
<b>Al<sub>12</sub></b>	0.96 ± 0.09	0.67 ± 0.21	3532.5 ± 192.2	14.73 ± 0.91	161.7 ± 9.2	22.58 ± 2.70	335.9 ± 14.2	18.66 ± 1.90	39.16 ± 2.34	0.66 ± 0.06	9.18 ± 0.45	10.20 ± 0.75	3.28 ± 0.24	No detectada
<b>Al<sub>18</sub></b>	1.09 ± 0.10	0.04 ± 0.04	2832.1 ± 134.4	15.69 ± 0.71	151.0 ± 11.3	20.71 ± 2.40	464.0 ± 33.1	23.37 ± 1.40	57.78 ± 1.93	0.74 ± 0.05	9.90 ± 0.29	10.26 ± 0.37	2.94 ± 0.17	"
<b>Al<sub>24</sub></b>	0.98 ± 0.08	0.35 ± 0.13	3597.5 ± 336.0	16.60 ± 1.83	145.5 ± 9.6	22.89 ± 2.69	301.9 ± 14.7	20.09 ± 1.63	18.95 ± 0.93	0.66 ± 0.05	9.83 ± 0.48	10.01 ± 0.99	3.77 ± 0.13	"
<b>Dx<sub>12</sub></b>	0.64 ± 0.04	0.09 ± 0.03	2504.0 ± 245.1	11.29 ± 0.92	112.8 ± 7.8	16.00 ± 1.87	196.8 ± 12.3	11.44 ± 0.78	35.07 ± 1.89	0.32 ± 0.03	6.28 ± 0.25	5.88 ± 0.40	2.10 ± 0.13	"
<b>Dx<sub>18</sub></b>	0.92 ± 0.09	0.72 ± 0.36	3896.2 ± 232.9	14.55 ± 0.67	166.7 ± 15.9	9.10 ± 0.74	303.3 ± 23.0	11.77 ± 0.50	44.42 ± 1.38	0.70 ± 0.06	6.89 ± 0.20	7.68 ± 0.36	2.23 ± 0.07	"
<b>Dx<sub>24</sub></b>	0.78 ± 0.07	0.28 ± 0.09	2821.6 ± 193.0	12.44 ± 0.72	161.2 ± 8.8	16.77 ± 1.69	354.1 ± 33.3	19.77 ± 1.98	50.82 ± 1.42	0.78 ± 0.05	9.39 ± 0.42	10.60 ± 0.64	2.88 ± 0.16	"
<b>Mx<sub>12</sub></b>	0.65 ± 0.08	0.15 ± 0.03	2268.3 ± 239.3	8.81 ± 0.74	95.6 ± 7.7	24.94 ± 2.36	232.9 ± 13.3	16.77 ± 1.18	16.71 ± 0.96	0.52 ± 0.04	8.04 ± 0.48	7.83 ± 0.61	3.18 ± 0.19	"
<b>Mx<sub>18</sub></b>	0.69 ± 0.06	0.14 ± 0.09	2438.2 ± 171.5	10.30 ± 0.49	106.6 ± 7.0	22.65 ± 1.13	248.9 ± 4.4	15.33 ± 0.81	40.51 ± 1.38	0.40 ± 0.03	7.00 ± 0.21	6.37 ± 0.43	2.59 ± 0.08	"
<b>Mx<sub>24</sub></b>	0.63 ± 0.04	0.39 ± 0.14	2433.3 ± 214.3	10.50 ± 0.66	125.3 ± 7.0	13.14 ± 0.87	247.0 ± 13.1	14.03 ± 1.05	31.08 ± 1.18	0.40 ± 0.02	6.07 ± 0.32	5.76 ± 0.24	2.49 ± 0.12	"

Tipo (Al-Dx-Mx)	b-a-a***	n.s.	b-b-a***	c-b-a***	b-b-a***	b-a-b***	b-a-a***	b-a-a***	b-c-a***	c-b-a***	b-a-a***	c-b-a***	c-a-b***
Nivel (12-18-24)	n.s.	n.s.	n.s.	a-b-ab*	a-ab-b*	n.s.	a-b-b***	n.s.	a-c-b***	a-b-b**	n.s.	n.s.	ab-a-b**
Tipo×Nivel	n.s.	*	***	n.s.	**	***	***	***	***	***	***	***	***

Los resultados son media ± E.S. (n = 9). En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.

## 2.3.8. Estado redox

*Hígado*

Las actividades específicas de los enzimas hepáticos SOD y CAT no presentaron ningún efecto del tipo, del nivel o de la interacción entre tipo y nivel de carbohidratos. Sin embargo, sí se observó influencia de todos estos factores tanto en el enzima GPX como en el enzima GR (Tabla IV-18). Así, atendiendo al efecto del tipo de carbohidratos sobre la actividad de estos enzimas se observó que, para la GPX, dextrina y maltodextrina indujeron los niveles más bajos de actividad, frente al tratamiento con almidón que mostró las actividades más elevadas. Por su parte, las actividades significativamente más bajas del enzima GR fueron provocadas por los tratamientos dietarios maltodextrina y almidón, frente a la dextrina que generó los niveles más altos. En cuanto al efecto del nivel, tanto en GPX como en GR, los valores más bajos de actividad fueron aquellos inducidos por los niveles del 12% y 18%, frente a la mayor actividad provocada por las dietas con un 24% de carbohidratos.

Tabla IV-18. Actividad específica de enzimas antioxidantes en hígado de juveniles de dentón alimentados con distintos tipos y niveles de carbohidratos.

<b>Dieta</b>	<b>SOD</b> (U mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>CAT</b> (U mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>GPX</b> (mU mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>GR</b> (mU mg proteína <sup>-1</sup> )
<b>Al<sub>12</sub></b>	169.9 ± 11.0	283.8 ± 23.5	182.7 ± 12.0	6.06 ± 0.42
<b>Al<sub>18</sub></b>	151.1 ± 5.1	304.6 ± 23.0	197.3 ± 10.8	6.76 ± 0.41
<b>Al<sub>24</sub></b>	189.4 ± 10.5	339.6 ± 19.6	248.8 ± 9.6	8.25 ± 0.53
<b>Dx<sub>12</sub></b>	153.9 ± 13.0	343.7 ± 26.8	181.9 ± 4.2	8.56 ± 0.44
<b>Dx<sub>18</sub></b>	142.7 ± 8.3	285.8 ± 16.2	176.5 ± 5.9	7.30 ± 0.42
<b>Dx<sub>24</sub></b>	191.1 ± 11.3	332.4 ± 15.2	189.4 ± 9.6	12.53 ± 1.23
<b>Mx<sub>12</sub></b>	196.9 ± 22.3	361.2 ± 28.6	184.2 ± 4.6	7.09 ± 0.23
<b>Mx<sub>18</sub></b>	184.4 ± 17.6	311.9 ± 10.6	176.0 ± 3.8	7.95 ± 0.51
<b>Mx<sub>24</sub></b>	178.3 ± 11.3	325.4 ± 17.4	189.4 ± 6.5	6.42 ± 0.48
<b>Tipo (Al-Dx-Mx)</b>	n.s.	n.s.	b-a-a ***	a-b-a ***
<b>Nivel (12-18-24)</b>	n.s.	n.s.	a-a-b ***	a-a-b ***
<b>Tipo×Nivel</b>	n.s.	n.s.	**	***

Los resultados son media ± E.S. (n = 9). En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.

En relación con el daño oxidativo a lípidos y proteínas en hígado, los resultados reflejados en la Tabla IV-19 muestran que, tan sólo en el contenido en grupos carbonilo, la interacción tipo y nivel de carbohidratos generó efectos. Aisladamente, el tipo de carbohidratos empleados influyó únicamente en los niveles de peroxidación lipídica, de tal forma que los valores más bajos fueron los presentados en los grupos alimentados con maltodextrina y almidón, frente a los mayores niveles de MDA de la dextrina. En cuanto al nivel, se observaron efectos tanto en los niveles de peroxidación lipídica como en el contenido en grupos carbonilo. Así, el valor más bajo de peroxidación lipídica fue inducido por un contenido en 24% de carbohidratos. Por su parte, el contenido en grupos carbonilo fue menor para los niveles 18% y 24% de carbohidratos dietarios.

Tabla IV-19. Indicadores de daño oxidativo a lípidos y proteínas hepáticas de juveniles de dentón alimentados con distintos tipos y niveles de carbohidratos.

<b>Dieta</b>	<b>Peroxidación lipídica</b> (nmol MDA g tejido <sup>-1</sup> )	<b>Grupos carbonilo</b> (nmol C=O mg proteína <sup>-1</sup> )
<b>Al<sub>12</sub></b>	40.33 ± 0.90	3.60 ± 0.20
<b>Al<sub>18</sub></b>	40.37 ± 2.14	2.75 ± 0.27
<b>Al<sub>24</sub></b>	27.91 ± 2.67	4.35 ± 0.74
<b>Dx<sub>12</sub></b>	51.79 ± 5.63	4.53 ± 0.50
<b>Dx<sub>18</sub></b>	47.26 ± 1.96	2.96 ± 0.18
<b>Dx<sub>24</sub></b>	37.78 ± 2.23	1.86 ± 0.17
<b>Mx<sub>12</sub></b>	38.06 ± 1.24	4.16 ± 0.65
<b>Mx<sub>18</sub></b>	39.28 ± 3.39	3.35 ± 0.43
<b>Mx<sub>24</sub></b>	39.21 ± 3.29	2.30 ± 0.41
<b>Tipo (Al-Dx-Mx)</b>	a-b-a ***	n.s.
<b>Nivel (12-18-24)</b>	b-b-a **	b-a-a **
<b>Tipo×Nivel</b>	n.s.	**

Los resultados son media ± E.S. (n = 9). En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.

*Músculo blanco*

Los resultados de los enzimas antioxidantes y del daño oxidativo a lípidos en músculo blanco de juveniles de dentón alimentados con los distintos tratamientos dietarios se encuentran reflejados en la Tabla IV-20. En ningún caso se detectó actividad CAT. La interacción tipo y nivel de carbohidratos indujo diferencias significativas en todos los parámetros analizados. Por su parte, la influencia del tipo de carbohidratos sólo fue observada en los enzimas GPX y GR. Así, para la GPX, la dextrina, maltodextrina y almidón indujeron las actividades menores, medias y mayores, respectivamente. En la GR, el almidón fue el responsable de los mayores niveles de actividad. En cuanto a la influencia del nivel de carbohidratos empleados en los distintos tratamientos, tan sólo se pudieron observar efectos en el enzima GR y en los niveles de peroxidación lipídica. De este modo, los niveles del 12% y 18% generaron los valores de actividad más bajos en GR. Los menores niveles de peroxidación lipídica fueron aquellos mostrados por los niveles 18% y 24% de carbohidratos dietarios.

Tabla IV-20. Actividad específica de enzimas antioxidantes e indicador de daño oxidativo a lípidos en músculo de juveniles de dentón alimentados con distintos tipos y niveles de carbohidratos.

<b>Dieta</b>	<b>SOD</b> (U mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>CAT</b> (U mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>GPX</b> (mU mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>GR</b> (mU mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>Peroxidación lipídica</b> (nmol MDA g tejido <sup>-1</sup> )
<b>Al<sub>12</sub></b>	118.9 ± 7.6	No detectada	6.79 ± 0.43	0.92 ± 0.09	33.40 ± 2.50
<b>Al<sub>18</sub></b>	115.4 ± 4.9	"	7.11 ± 0.37	0.63 ± 0.07	24.37 ± 2.06
<b>Al<sub>24</sub></b>	118.3 ± 3.5	"	8.00 ± 0.22	1.16 ± 0.16	34.74 ± 3.86
<b>Dx<sub>12</sub></b>	102.5 ± 4.7	"	5.42 ± 0.30	0.44 ± 0.03	31.10 ± 1.75
<b>Dx<sub>18</sub></b>	95.5 ± 7.0	"	5.67 ± 0.33	0.53 ± 0.06	26.78 ± 1.00
<b>Dx<sub>24</sub></b>	126.3 ± 5.6	"	6.47 ± 0.27	0.78 ± 0.03	27.83 ± 2.35
<b>Mx<sub>12</sub></b>	122.5 ± 8.0	"	6.67 ± 0.26	0.52 ± 0.06	38.21 ± 2.17
<b>Mx<sub>18</sub></b>	104.7 ± 6.1	"	6.97 ± 0.40	0.47 ± 0.03	28.64 ± 1.92
<b>Mx<sub>24</sub></b>	105.3 ± 4.9	"	5.90 ± 0.22	0.47 ± 0.03	26.29 ± 0.73
<b>Tipo (Al-Dx-Mx)</b>	n.s.		c-a-b ***	b-a-a ***	n.s.
<b>Nivel (12-18-24)</b>	n.s.		n.s.	a-a-b ***	b-a-a ***
<b>Tipo×Nivel</b>	*		**	**	*

Los resultados son media ± E.S. (n = 9). En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.



### 2.3.9. Patrón isoenzimático de la SOD

Los resultados obtenidos tras la determinación del patrón isoenzimático de la SOD en hígado y músculo blanco de dentón, se muestran en la Figura IV-12. Como se puede observar, existen dos isoenzimas SOD, ambos constitutivos, correspondiendo uno de ellos a la isoforma CuZn-SOD I y el otro, puesto de manifiesto tras inhibición con cianuro, a la isoforma Mn-SOD. Este patrón está presente en todos los grupos experimentales sin existir distinción entre dietas.

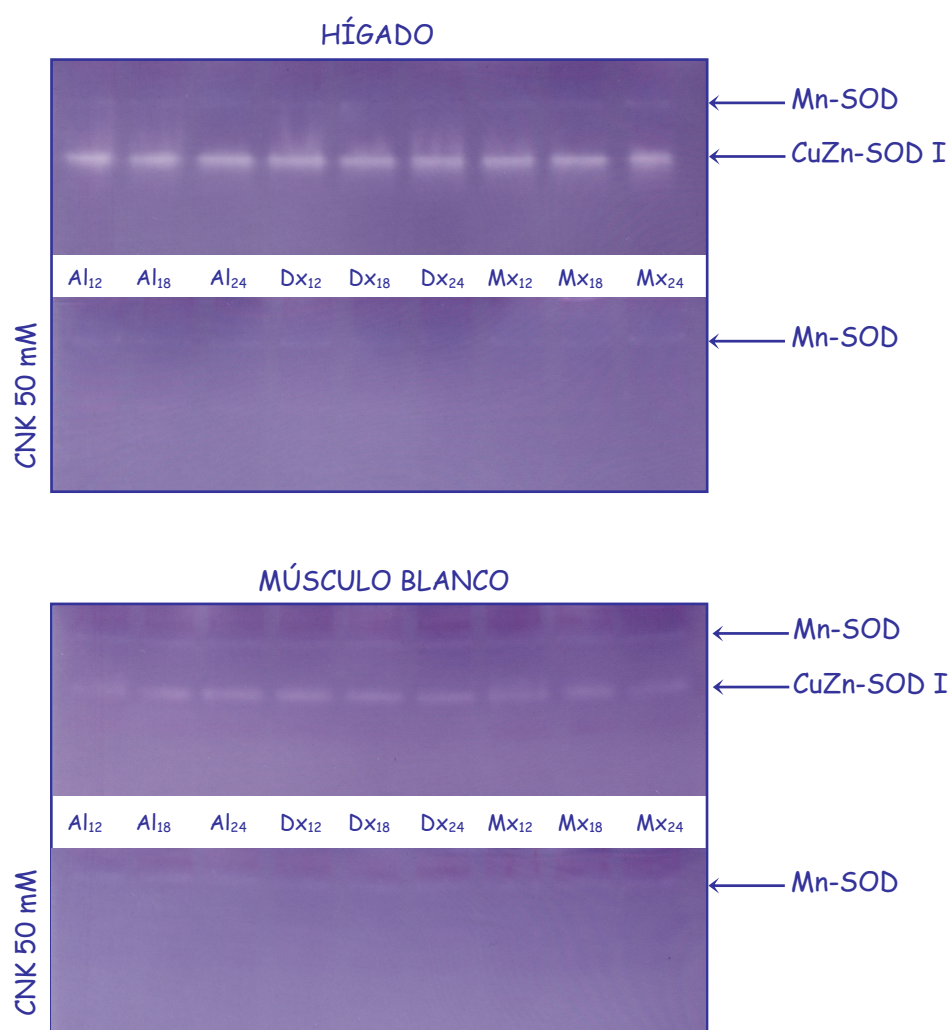


Figura IV-12. Patrón isoenzimático de la SOD generado por las diferentes dietas experimentales, en los tejidos de hígado y músculo blanco de juveniles de dentón. La fotografía inferior en cada uno de los tejidos correspondería al gel incubado para inhibición en solución 50 mM CNK.

## 2.4. DISCUSIÓN

En la mayoría de los estudios que evalúan la eficacia de la inclusión de distintas fuentes y/o niveles de carbohidratos para la alimentación de peces de tamaños similares al del presente estudio, la supervivencia no es un factor que se vea afectado por estos parámetros, manteniéndose, en general, por encima del 85% (Erfanullah y Jafri, 1995, 1998; Pérez et al., 1997; Arockiaraj et al., 1999; Yamamoto et al., 2001; Johnston et al., 2003; Mohopatra et al., 2003; Wang et al., 2005b). En el presente estudio la supervivencia de los dentones alimentados con los distintos tratamientos dietarios osciló entre 57% y 80%. Como en los estudios previos, tampoco se observan efectos producidos por el tipo, nivel o la interacción entre tipo y nivel de carbohidratos suministrados. Las dispares tasas de supervivencia obtenidas en el presente ensayo podrían ser atribuidas, no tanto a efectos dietarios, sino más bien a la actuación de agentes patógenos. En este sentido, los meses durante los cuales se desarrolló el estudio, especialmente agosto y septiembre aunque también octubre, se caracterizan por la elevación de la temperatura del agua de cultivo (en torno a los 24-26 °C), lo que hace del medio un lugar ideal para la reproducción y ataque de distintos patógenos, incrementando el número de episodios de infección (Company et al., 1999b).

Por otro lado, el papel que ejercen los carbohidratos, tanto el tipo como el nivel de inclusión, en la promoción del crecimiento de los peces es aún un punto ambiguo, debido a la multitud de respuestas observadas en los distintos estudios realizados. En el presente ensayo, a pesar de que los valores más elevados para incremento de peso y TCI fueron aquellos obtenidos en los grupos correspondientes a carbohidratos menos complejos (maltodextrina) para niveles de inclusión intermedios (18%), no existió ningún efecto claramente definido producido por la alimentación con niveles crecientes de carbohidratos o con fuentes más o menos complejas, y ni siquiera por la interacción que pudiera producirse entre ambos factores. Esta ausencia de efectos ha sido previamente indicada por otros autores en especies como *Pagrus major* (Furuichi y Yone, 1982); *Dicentrarchus labrax* (Gouveia et al., 1995; Russell et al., 2001; Enes et al., 2006), *O. mykiss* (Yamamoto et al., 2001), *Solea senegalensis* (Rueda-Jasso et al., 2004), *Pseudoplatystoma coruscans* (Martino et al., 2005) e incluso en dentón (Skalli, 2001). No obstante, otros autores han obtenido notables mejoras en el crecimiento con el empleo de niveles crecientes de carbohidratos dietarios (Hidalgo et al., 1993; Sanz et

al., 1993; Suárez et al., 1995; Catacutan y Coloso, 1997; Erfanullah y Jafri, 1998; Peragón et al., 1999; Barroso et al., 2001; Mohopatra et al., 2003; Wang et al., 2005b). De igual modo, fuentes menos complejas o pretratadas de este macronutriente parecen promover el crecimiento en distintas especies (Rawles y Gatlin, 1998; Peres y Oliva-Teles, 2002; Venou et al., 2003). Sin embargo, en otros estudios se obtuvieron las mejores respuestas de crecimiento cuando los peces fueron alimentados con fuentes más complejas (Erfanullah y Jafri, 1995; Shiau y Chuang, 1995; Hutchins et al., 1998; Tan et al., 2006). Toda esta diversidad de respuestas se debe no sólo a diferencias interespecíficas, sino también a la combinación entre fuentes y niveles de carbohidratos en las dietas (Shiau y Peng, 1993; Hutchins et al., 1998; Arockiaraj et al. 1999; Fu, 2005).

La ausencia de efectos evidentes sobre el crecimiento de los dentones podría ser consecuencia de una compensación producida por distintos niveles de ingesta, de modo que los peces alimentados con las dietas que producirían un menor crecimiento, podrían ingerir mayores cantidades de alimento para compensar las necesidades energéticas que precisan, llegándose a equiparar los resultados finales de crecimiento de los distintos tratamientos (Hemre et al., 2002). Ya que en el presente estudio no se observaron diferencias generadas en los niveles de ingesta por las distintas fuentes de carbohidratos ni por la interacción fuente y nivel, es difícil corroborar esta teoría. No obstante, la aparición de efectos producidos cuando se consideran aisladamente los niveles de inclusión, indicó que, además de para el nivel 12%, para un nivel del 18% la ingesta fue menor. Esta menor ingesta en los peces alimentados con un 18% de carbohidratos se correspondió con la tendencia general de mayores tasas de crecimiento observadas a este nivel de inclusión, fundamentalmente en el caso de la maltodextrina.

Una evidencia de la mejor utilización del alimento para crecimiento y, en consecuencia, de la necesidad de ingerir menores cantidades de comida, la podemos encontrar en los resultados del IC. Así, los mejores índices fueron aquellos obtenidos en las dietas con un nivel de inclusión del 18%, volviendo a ser el valor más elevado el correspondiente al grupo  $Mx_{18}$ . Además, a pesar de que no se encontraron efectos de los tratamientos dietarios sobre el valor productivo de la proteína, al igual que en el caso del IC, los resultados del CEC indicaron un mejor aprovechamiento de la proteína para el crecimiento en las dietas con un 18% de carbohidratos, siendo aún mayor en  $Mx_{18}$ . Este

hecho podría ser indicativo de un efecto de ahorro proteico derivado de una adecuada combinación entre carbohidratos y lípidos, ya que con una menor ingesta proteica a estos niveles, se consiguió el mismo crecimiento que el obtenido en los otros grupos alimentados con los distintos tratamientos dietarios y que ingirieron más proteína (Hemre et al., 2002; Stone, 2003).

Por otra parte, los resultados para ambos índices, IC y CEC, podrían indicar que niveles de inclusión de carbohidratos del 24% o superiores no serían beneficiosos para la utilización del alimento. Además, un nivel inferior y próximo al 12%, podría ser insuficiente para reflejar los efectos beneficiosos de la inclusión de carbohidratos en las dietas para dentones, ya que los resultados indican que para este nivel, los valores de IC y CEC se situaron a medio camino entre los efectos beneficiosos del 18% y los valores más bajos similares a los obtenidos en los grupos alimentados con un 24% de carbohidratos. Al igual que en el presente estudio, especímenes de *Channa striatus* también presentaron efectos beneficiosos por la incorporación de niveles intermedios de carbohidratos, en su caso dextrina, sobre los índices IC y CEC (Arockiaraj et al., 1999), cuando fueron utilizadas dietas isoproteicas con niveles variables de lípidos y carbohidratos. Así, dichos índices disminuyeron cuando niveles de carbohidratos dietarios superiores al 30% e inferiores al 8% fueron utilizados en la alimentación de los individuos de esa especie. De forma similar, Erfanullah y Jafri (1998) observaron que el empleo de niveles superiores al 36% de dextrina dietaria reducía el IC y el CEC en especímenes de *Clarias batrachus*. También en trucha arcoiris, Yamamoto et al. (2001) observaron que los valores de IC y CEC, aunque este último con variaciones no significativas estadísticamente, eran menores en los grupos alimentados con dietas que contenían almidón a niveles de inclusión inferiores al 9% y superiores al 36%.

A pesar de los resultados observados para estas especies, la tendencia generalizada que presentan la mayoría de los estudios en los que los peces emplean eficientemente los carbohidratos dietarios, indica una relación directa entre IC, CEC, e incluso VPP y el nivel de este macronutriente incluido en las dietas (Hidalgo et al., 1993; Sanz et al., 1993; Peragón et al., 1999; Capilla et al., 2003; Mohopatra et al., 2003; Wang et al., 2005b). Posiblemente, los niveles de inclusión ensayados en muchos de estos estudios no llegaron a alcanzar el límite superior de utilización efectiva de carbohidratos para estas especies, lo cual podría justificar que en el presente estudio no exista esa tendencia

general manifestada por estos otros autores. Además, no se puede olvidar que las diferencias interespecíficas son fundamentales para marcar la pauta de utilización de los hidratos de carbono en la alimentación de los peces. Contrariamente a todos estos resultados, otros estudios no observaron influencia alguna del nivel de carbohidratos sobre los índices IC, CEC o VPP (Russell et al., 2001; Skalli, 2001; Johnston et al., 2003; Lee y Lee, 2004; Martino et al., 2005) o bien los efectos observados fueron negativos (Hillestad et al., 2001; Suárez et al., 2002).

Por otro lado, a pesar de los mejores resultados obtenidos para los grupos alimentados con la dieta  $Mx_{18}$ , desde un punto de vista global, en el presente estudio, ni la ingesta ni los índices IC, CEC o VPP, se vieron significativamente afectados por la fuente de carbohidratos empleada en la alimentación de los dentones. Similares resultados fueron obtenidos por Russell et al. (2001) en lubina. Sin embargo, otros muchos estudios sí han observado tal influencia, de modo que, en general, niveles más complejos de carbohidratos promueven mejores resultados en estos índices (Shiau y Peng, 1993; Erfanullah y Jafri, 1995; Shiau y Chuang, 1995; Hutchins et al., 1998; Lee y Lee, 2004). En cualquier caso, si atendemos a los resultados obtenidos en el presente ensayo, independientemente de la existencia de influencia o no del empleo de los distintos tipos y niveles de carbohidratos, se puede comprobar que los valores de TCI, IC y CEC son comparables, y en algunos casos superiores, a los observados por otros autores utilizando niveles de proteína más elevados (46-57%) a los empleados en este ensayo para dentones de tamaño similar (Tibaldi et al., 1996; Cardenete et al., 1997b,d; Company et al., 1994a; Skalli et al., 2004). Igualmente, los resultados de VPP (20.77%-36.19%) obtenidos en el presente estudio también se encontraron dentro del rango observado previamente por Skalli et al. (2004), entre 23.83% y 29.78%, llegando a ser incluso mejores para algunas de las dietas experimentales, hecho que confirmaría el efecto de ahorro proteico que promueve la utilización de carbohidratos en el alimento para dentón.

Por otro lado, diversos estudios indican que la inclusión de carbohidratos en las dietas para peces podría modificar los CDA de los distintos macronutrientes dietarios, en función tanto de la complejidad o tratamiento físico de los carbohidratos empleados como del nivel de inclusión de los mismos (Wilson, 1994; Shiau, 1997; Stone, 2003; Krogdahl et al., 2005).

En este sentido, distintos autores han obtenido que para salmón o trucha arcoiris, la inclusión de mayores niveles de carbohidratos en las dietas, especialmente de baja digestibilidad, disminuyen los CDA de los lípidos (Spannhof y Plantikow, 1983; Kim y Kaushik, 1992; Aksnes, 1995; Hemre et al., 1995; Grisdale-Helland y Helland, 1997; Storebakken et al., 1998). Sin embargo, en otros trabajos, incluyendo el presente ensayo, se ha observado que el empleo de distintos tipos o niveles de carbohidratos, así como la interacción de ambos factores, no indujo modificaciones en el CDA lipídico (Storebakken et al., 1998; Yamamoto et al., 2001; Hillestad et al., 2001; Russell et al., 2001). Igualmente, en el presente estudio tampoco se encontraron efectos de los distintos tratamientos dietarios sobre el CDA de la materia seca. No obstante, en el caso de la lubina, Peres y Oliva-Teles (2002) y Enes et al. (2006) obtuvieron una relación directa entre los CDA de materia seca y el contenido en carbohidratos. Por su parte, Tan et al. (2006) observaron que en *Carassius auratus gibelii* alimentados con dietas formuladas con distintas fuentes carbohidratadas (almidón, celulosa, dextrina, sacarosa y glucosa) a un nivel de inclusión del 20%, existía una relación inversa entre el grado de complejidad y los valores de CDA de la materia seca, exceptuando el caso del almidón cuyos valores eran elevados.

En el caso de la digestibilidad de las proteínas son muchos los estudios que no encuentran efecto alguno de la fuente y/o del nivel de carbohidratos sobre el CDA de este macronutriente en distintas especies (Hidalgo et al., 1993; Sanz et al., 1993; Russell et al., 2001; Yamamoto et al., 2001; Peres y Oliva-Teles, 2002; Stone et al., 2003; Mohopatra et al., 2003; Tan et al., 2006). Sin embargo, en un trabajo previo en dentones de similar peso a los del presente ensayo, Skalli (2001) obtuvo que para niveles de incorporación del 18% y 22% de dextrina, el CDA de la proteína era significativamente inferior al presentado cuando los niveles de inclusión fueron del 10% y 14%. De igual forma, nuestros resultados indican que un contenido del 24% de carbohidratos resultó en CDA proteicos inferiores a los presentados en los grupos alimentados con un 12% de inclusión de este macronutriente. Una de las posibles razones que justifican esta tendencia podría ser el papel que ejercen los lípidos en la velocidad de paso de los nutrientes por el tracto gastrointestinal. Así, existen indicios de que un incremento en el contenido de lípidos dietarios, coincidente en este caso con la reducción del nivel de carbohidratos, disminuye la velocidad de paso del alimento, lo que proporciona a las enzimas más tiempo para su actuación (Buddington et al., 1987). Desafortunadamente,

y a pesar de estos resultados, no nos atrevemos a confirmar la existencia de una relación inversa entre digestibilidad de la proteína y nivel de carbohidratos, ya que debido a las limitaciones logísticas no se pudieron obtener datos para el nivel del 18%. Por su parte, aunque algunos estudios han observado digestibilidades proteicas más elevadas cuando se utilizan carbohidratos más complejos (Rawles y Gatlin, 1998), los resultados del presente trabajo indican que los valores más elevados de CDA de proteína fueron aquellos obtenidos para la maltodextrina, siendo los más bajos para la dextrina y situándose en una posición intermedia, sin diferencias con respecto a ninguna de las dos fuentes, el almidón.

Respecto a la materia orgánica, estudios previos en dentón observaron que los valores de CDA disminuyeron al aumentar el nivel de carbohidratos dietarios (Skalli, 2001), hecho que se encuentra en desacuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde niveles del 24% resultaron en los mayores valores de CDA de materia orgánica. Además, también en este caso, vuelve a ser la maltodextrina la fuente carbohidratada que proporciona los mejores resultados, aunque no se observaron efectos de la interacción fuente y nivel.

En otras especies se ha descrito la influencia del nivel de carbohidratos utilizados en los alimentos sobre la composición corporal de los animales (Hidalgo et al., 1993; Suárez et al., 2002; Johnston et al., 2003; Lee y Lee, 2004; Mokoginta et al., 2004; Wang et al., 2005b). Sin embargo, en el presente estudio no se observaron tales efectos sobre ninguno de los parámetros estudiados. De igual forma, en especies como *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*, *Pseudoplatystoma coruscans* y *Dicentrarchus labrax*, tampoco se mostró influencia del contenido de carbohidratos de las dietas sobre la composición corporal de estos animales (Shiau y Peng, 1993; Martino et al., 2005; Peres y Oliva-Teles, 2002; Enes et al., 2006). Por el contrario, los dentones de este trabajo sí parecieron verse afectados tanto por la fuente carbohidratada como por la interacción entre el tipo de fuente y el nivel utilizado. Así, mientras que el uso del almidón no mostró diferencias significativas respecto a las otras dos fuentes, situando los valores a un nivel intermedio, la maltodextrina generó los valores más altos de humedad, ceniza y proteínas, y los más bajos de grasa, frente a los resultados obtenidos para la dextrina. No obstante, y continuando con la disparidad de respuestas de los peces a la alimentación con dietas enriquecidas en carbohidratos, otros muchos autores no

observan efecto alguno de la fuente utilizada sobre los distintos parámetros de composición corporal (Shiau y Peng, 1993; Yamamoto et al., 2001; Peres y Oliva-Teles, 2002; Lee y Lee, 2004; Enes et al., 2006).

En base a estos resultados, un enriquecimiento en el contenido corporal de la proteína en los dentones alimentados con maltodextrina vendría a confirmar el efecto de ahorro proteico dietario para fines estructurales en lugar de energéticos, tal y como ya se había indicado previamente a través del índice CEC, pese a que en ese caso las diferencias no fueron significativas. Aunque, en este caso, serían los carbohidratos de menor complejidad los que promueven la mayor concentración proteica corporal, otros estudios han observado que son aquellos más complejos los que conducen a este resultado. Así, Erfanullah y Jafri (1995) obtuvieron una relación directa entre los niveles de proteína corporal y la complejidad de los carbohidratos (dextrina, sacarosa y glucosa) utilizados en las dietas para la alimentación de *Labeo rohita*, siendo también observada para el contenido en lípidos y humedad, mientras que la proporción de cenizas no se vio afectada.

En cuanto a los lípidos corporales, los mayores niveles observados en dentones alimentados con fuentes más complejas están en consonancia con los resultados obtenidos en *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*, por Shiau y Chuang (1995) y Hsieh y Shiau (2000). Como se discutirá más adelante, este mayor contenido lipídico para el grupo del almidón y la dextrina se corresponde con una mayor actividad del enzima hepático G6PDH, clave en el suministro de NADPH para la síntesis de lípidos. Además, si atendemos a los resultados de contenido de lípidos hepáticos y musculares, se podría afirmar que el origen de las diferencias en los lípidos corporales entre tratamientos sería el principal reservorio lipídico constituido por la grasa perivisceral. En este sentido, aunque en músculo blanco no existieron diferencias significativas producidas por el tipo o el nivel de carbohidratos utilizados, en el hígado la tendencia observada fue contraria a la encontrada para los lípidos corporales. Así, el menor contenido de lípidos hepáticos correspondió a los animales alimentados con almidón, además de maltodextrina, frente a valores más altos en dextrina. En otros estudios, sin embargo, no se observaron efectos generados por el tipo de fuente carbohidratada sobre el contenido de lípidos en el hígado (Hutchins et al., 1998; Lee y Lee, 2004). En cuanto al nivel de inclusión, y al igual que fue observado en estudios previos realizados en otras especies (Hutchins et al.,



1998; Yamamoto et al., 2001; Lee y Lee, 2004), los valores más elevados de lípidos hepáticos correspondieron al nivel de inclusión más bajo de carbohidratos dietarios (12%) y, consecuentemente, más elevado en lípidos de la dieta. No obstante, en otras especies estudiadas el nivel de carbohidratos incluidos en las dietas no ejerce efectos sobre este parámetro (Mokoginta et al., 2004; Martino et al., 2005). Por otro lado, al igual que en el músculo blanco, también en el hígado la interacción entre tipo y nivel condiciona su contenido lipídico.

Respecto al contenido en glucógeno, aunque en el presente estudio no se observaron efectos aislados del tipo o del nivel de carbohidratos utilizados en las dietas para alimentar a los distintos grupos de dentones sobre el glucógeno hepático, en la mayoría de los trabajos realizados sobre la utilización de hidratos de carbono en peces se ha indicado una relación lineal dosis-respuesta como consecuencia del incremento en la disponibilidad de glucosa (Aksnes, 1995; Hutchins et al., 1998; Rawles y Gatlin, 1998; Hsieh y Shiau, 2000; Peres y Oliva-Teles, 2002; Suárez et al., 2002; Capilla et al., 2003; Lee y Lee, 2004; Hatlen et al., 2005; Enes et al., 2006). En este sentido, mayores niveles de inclusión y fuentes más complejas de carbohidratos en las dietas conllevan un aumento de glucógeno hepático. En consonancia con los resultados de glucógeno, tampoco se observaron efectos significativos del tipo o del nivel de carbohidratos dietarios sobre la RHS. Adicionalmente, si analizamos la relación existente entre glucógeno hepático y RHS, se puede comprobar la existencia de una relación lineal entre ellos (Figura IV-13A), de forma que el incremento en la RHS parece estar estrechamente relacionado con la acumulación de glucógeno hepático ( $R^2 = 0.62$ ), y no con el contenido lipídico ( $R^2 = 0.03$ ) (Figura IV-13B). Esta tendencia es similar a los resultados observados en otras especies de peces (Fynn-Aikins et al., 1992; Hutchins et al., 1998; Lee y Lee, 2004).

Por su parte, al contrario que en hígado, sí se obtuvieron efectos inducidos por el tipo (menores para maltodextrina) y el nivel (mayores para un 18%) de carbohidratos sobre el contenido en glucógeno muscular. No obstante, Stone et al. (2003) no observaron modificaciones en este metabolito a nivel muscular en especímenes de *Bidyanus bidyanus* alimentados con distintos tipos de carbohidratos.

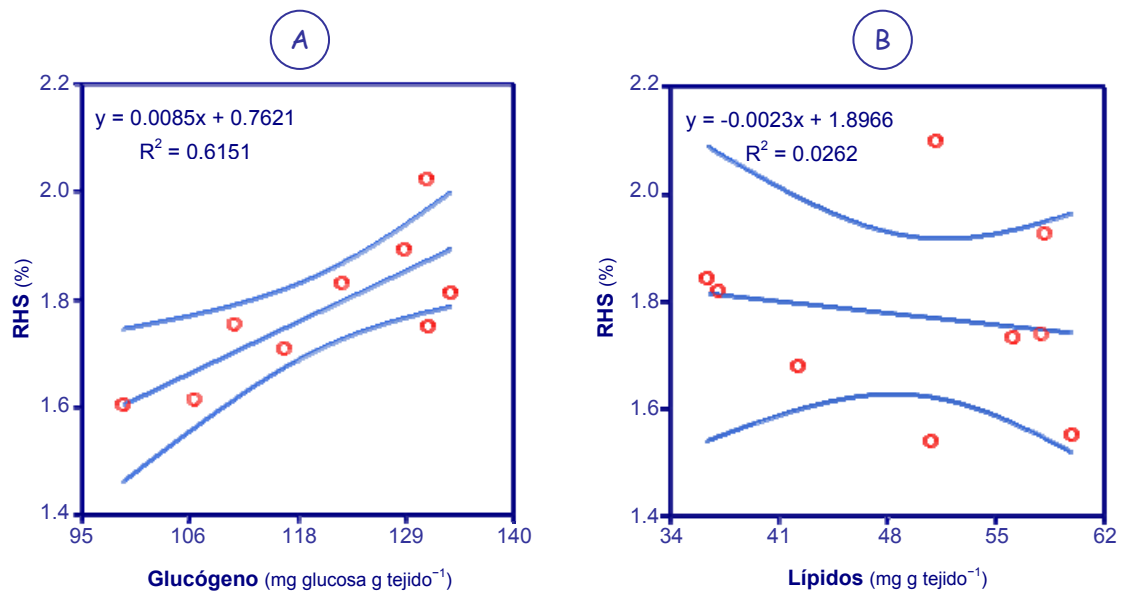


Figura IV-13. Regresión lineal entre las variables RSH y glucógeno hepático (A) o lípidos hepáticos (B), donde se muestra el intervalo de predicción de la media con un 95% de confianza.

Por lo que se refiere al metabolismo intermediario, tanto hepático como muscular, no existe un patrón evidente que vincule la actividad de las principales rutas metabólicas con la utilización de carbohidratos de un determinado tipo, a un nivel concreto o por la interacción de ambos parámetros. Por el contrario, numerosos estudios sí han observado evidencias de la influencia de la alimentación con dietas enriquecidas en carbohidratos en las principales rutas del metabolismo intermediario. Así, mientras que niveles crecientes de carbohidratos parecen inducir un incremento en la vía glucolítica a nivel hepático en distintas especies (Borrebaek et al., 1993; Caseras et al., 2000; Panserat et al. 2000, 2001; Borrebaek y Christophersen, 2001; Capilla et al., 2003), en dentón, tan sólo en la actividad HK se podría asumir dicha correlación, ya que los valores más elevados fueron aquellos observados en los grupos alimentados con niveles de inclusión de carbohidratos del 18% y 24%. Sin embargo, esta relación no fue mantenida para la PK, cuya actividad más elevada se observó en el nivel del 12%. En músculo blanco tampoco se mostraron tales efectos. No obstante, si atendemos al tipo de carbohidratos empleados, la complejidad de los mismos sí parece influir en la regulación de la vía glucolítica. En este sentido, el almidón parece inducir niveles más elevados de glucosa plasmática, además de una mayor actividad en los enzimas HK y PK tanto en el hígado como en el músculo blanco, frente a los valores más bajos observados para la maltodextrina. En cualquier caso, y considerando el debate persistente sobre la

presencia del enzima HK-IV en peces (Hemre et al., 2002), es importante resaltar que, al igual que en otros estudios (Borrebaek et al., 1993; Tranulis et al., 1996; Blin et al., 1999; Caseras et al., 2000, 2002; Panserat et al., 2000, 2001; Capilla et al., 2003; Enes et al., 2006), también en el caso del dentón se confirma la existencia de actividad HK-IV en hígado y músculo blanco. Aunque los niveles de actividad observados en dentón fueron más bajos que aquellos encontrados en trucha arcoiris (Panserat et al., 2000; Capilla et al., 2003), no difirieron de los mostrados en estudios con dorada (Caseras et al., 2002) y lubina (Enes et al., 2006).

Por otra parte, la lipogénesis es otra de las rutas del metabolismo intermediario que se modifica por el contenido en carbohidratos dietarios. En general, la mayoría de los estudios indican que la inclusión de niveles elevados de carbohidratos y de fuentes más complejas generan un incremento en la actividad de las principales enzimas generadoras del NADPH, necesario para la síntesis de lípidos (Likimani y Wilson, 1982; Borrebaek et al., 1993; Hemre et al., 1995; Lin y Shiau, 1995; Suárez et al., 1995; Álvarez et al., 1999; Barroso et al., 2001; Shiau y Lin, 2002). Al igual que en estos estudios, en el caso del dentón, el empleo de una fuente carbohidratada menos compleja, como es la maltodextrina, generó, tanto en hígado como en músculo blanco, niveles de actividad más bajos para los enzimas G6PDH y EM, productores del NADPH utilizado en la síntesis lipídica, frente a aquellos valores más elevados observados en los grupos alimentados con dextrina o almidón. Aparentemente, un exceso de glucosa en los grupos alimentados con este tipo de carbohidratos sería empleado en la lipogénesis, principalmente a nivel hepático, de forma que los productos derivados de este proceso podrían ser reubicados en otros reservorios corporales. En este sentido, el paralelismo observado entre la actividad G6PDH y EM, los niveles de lípidos circulantes a nivel plasmático y los resultados de composición corporal y hepática, discutidos con anterioridad, podrían respaldar esta teoría. Por otro lado, al igual que ocurría con la glucólisis, la influencia del nivel de carbohidratos empleados en las dietas sobre la regulación de la vía lipogénica no manifiesta un patrón tan evidente como el de la influencia de la fuente. Desde un punto de vista general, un nivel de inclusión del 18% podría promover una mayor actividad lipogénica a nivel hepático. No obstante, no se observaron diferencias significativas en el contenido de lípidos corporales generados por los distintos niveles de carbohidratos utilizados.

Por otro lado, un posible ahorro proteico en aquellos grupos de peces alimentados con maltodextrina, reflejado en el mayor contenido en proteína corporal observada para esos tratamientos, podría estar justificado por la actividad de los enzimas implicados tanto en la síntesis de glucosa como en la degradación proteica de los dentones alimentados con esta fuente carbohidratada. Así, aunque en el presente ensayo no se observaron efectos a nivel hepático como consecuencia del tipo de carbohidratos utilizados, a nivel muscular se corrobora esta teoría, es decir, menor actividad de los enzimas FBPasa, GOT y GPT observados para los tratamientos con maltodextrina se corresponden con un aumento paralelo del contenido de proteína corporal para esta fuente. No obstante, al considerar el nivel de inclusión, una vez más se puede observar que no existe un patrón claro de actuación, aunque, desde un punto de vista global, el empleo del 12% de carbohidratos en las dietas resultaría en los niveles más bajos de actividad gluconeogénica hepática y muscular. Estos resultados serían opuestos a aquellos indicados para otras especies, en las que un mayor nivel de inclusión de carbohidratos induce un descenso generalizado en la actividad FBPasa (Walton y Cowey, 1982; Shimeno et al., 1993; Suárez et al., 1995, 2002; Borrebaek y Christophersen, 2001; Panserat et al., 2002). En cualquier caso, las diferencias observadas entre niveles, aunque significativas, podrían ser discutibles, ya que sucesivamente se alternaron los niveles 18% y 24% para presentar valores más altos de actividad o similares a los observados para el nivel de inclusión del 12%.

En cuanto al estado oxidativo de los peces, es un hecho reconocido que la composición dietaria puede tener influencia sobre el mismo. En este sentido, los lípidos y los carbohidratos, como alternativas energéticas a la proteína, pueden generar un desequilibrio metabólico que conduciría a la generación de agentes oxidantes potencialmente peligrosos para la integridad celular. Aunque existen muy pocos datos en bibliografía sobre las consecuencias del uso de los carbohidratos sobre el estado oxidativo, los resultados observados indican que éste no se ve afectado negativamente por la inclusión de mayores niveles de carbohidratos e incluso los índices de daño oxidativo pueden disminuirse por su utilización (Álvarez et al., 1999; Lygren y Hemre, 2002; Rueda-Jasso et al., 2004). En este sentido, Sagone et al. (1983) indicaron que la glucosa puede actuar como “capturador” de radicales hidroxilo (OH) en células fagocíticas humanas, lo cual podría justificar, al menos en parte, los menores niveles de peroxidación lipídica observados tanto a nivel hepático como muscular, en aquellos

dentones alimentados con dietas que contenían mayor nivel de inclusión de carbohidratos, 24% y/o 18%. De igual forma, el contenido hepático en grupos carbonilo, indicativos del daño oxidativo a proteínas, también fue inferior en los tratamientos dietarios con 24% y 18% de carbohidratos. Adicionalmente, aunque no se observaron cambios en las actividades enzimáticas SOD y CAT, ni en hígado ni en músculo blanco, como consecuencia del nivel de carbohidratos dietarios, las actividades GPX (sólo en hígado) y GR (en ambos tejidos) fueron mayores a mayor nivel de inclusión (24%), lo que, junto a la capacidad “capturadora” de la glucosa que acabamos de indicar, también justificaría los menores daños oxidativos en lípidos y proteínas observados. No obstante, no se puede olvidar que, en el presente estudio, aquellas dietas con mayores niveles de carbohidratos poseen un menor contenido lipídico, lo que, además, hace que los peces alimentados con ellas sean menos susceptibles a la oxidación, tal y como ha sido indicado previamente por otros autores (Stéphan et al., 1995; Rueda-Jasso et al., 2004; Martínez-Álvarez et al., 2005). Similares respuestas a las presentadas en el presente trabajo para los enzimas CAT y SOD hepáticos, así como en el daño lipídico observado en hígado y músculo blanco fueron obtenidas en un estudio realizado con lenguado alimentado con distintos niveles de carbohidratos (Rueda-Jasso et al., 2004).

En cuanto a la influencia del tipo de carbohidratos utilizados, y al igual que ocurría con la respuesta al nivel de inclusión, la actividad SOD hepática y muscular así como la actividad CAT hepática no manifestaron diferencias entre tratamientos dietarios. Igualmente, tampoco Lygren y Hemre (2002) observaron diferencias significativas entre los resultados de las actividades CAT y SOD en hígado de salmón alimentado con glucosa o almidón, aunque la actividad GPX hepática fue mayor para los grupos alimentados con glucosa. Los resultados del presente ensayo también reflejan influencias del tipo de carbohidratos dietarios sobre la actividad GPX, además de en la actividad GR, tanto en hígado como en músculo blanco. Así, los niveles más bajos de actividad hepática de estas enzimas fueron los presentados para los grupos alimentos con maltodextrina. Esta respuesta coincidió en el caso de la GR muscular, aunque la actividad más baja para GPX en músculo blanco fue observada en las dietas que contenían dextrina, seguidas de maltodextrina y almidón. No obstante, sólo los niveles de peroxidación lipídica hepática reflejaron efectos del tipo de carbohidratos, siendo menores en la maltodextrina y el almidón. Estos resultados podrían justificarse por el

menor contenido en lípidos hepáticos que se presentaron en aquellos dentones alimentados con estas dos fuentes.

Por otra parte, los resultados indicaron la existencia de efectos producidos por la combinación de los distintos tipos y niveles de carbohidratos dietarios en todos los parámetros relacionados con el estado oxidativo analizados en músculo blanco y en la mayoría de los determinados en hígado, con la excepción de las actividades SOD y CAT, y de los grupos carbonilo.

En lo que respecta a las isoenzimas SOD diferenciadas electroforéticamente, los tratamientos con distintos tipos y niveles de carbohidratos, así como la combinación de ambos factores, no resultó en variaciones del patrón isoenzimático, observándose en todos los grupos experimentales la aparición de dos isoenzimas SOD constitutivos, CuZn-SOD y Mn-SOD, tanto en hígado como en músculo blanco.

En cualquier caso, finalmente hay que resaltar que, en general, los valores observados para los indicadores de daño oxidativo en el presente estudio son notablemente más bajos a los obtenidos en otros ensayos nutricionales para esta misma especie, aunque en individuos de mayor tamaño (Skalli, 2001). Además, estos valores se encuentran en el mismo intervalo que los observados en el resto de ensayos que conforman la presente tesis. Por tanto, se podría afirmar que, como previamente fue observado en otras especies (Álvarez et al., 1999; Lygren y Hemre, 2002; Rueda-Jasso et al., 2004), el uso de hidratos de carbono como fuente energética alternativa no produce efectos negativos sobre el estado oxidativo del dentón, contribuyendo incluso a su protección, al menos a los niveles de inclusión estudiados.

## 2.5. CONCLUSIONES

1. Por lo que se refiere a crecimiento y utilización nutritiva, el dentón utiliza bien los hidratos de carbono, aunque los niveles óptimos en dieta se sitúan por debajo del 24% para las condiciones experimentales y fuentes ensayadas.
2. El mayor efecto de ahorro proteico fue promovido por la fuente de carbohidratos menos compleja (maltodextrina) con la que, además, a niveles intermedios de inclusión (18%) se obtuvieron los mejores crecimientos e índices de utilización del alimento.
3. Aunque el tipo de fuente carbohidratada influye en la actividad de distintas enzimas del metabolismo intermediario, en conjunto, estas alteraciones no se ven reflejadas ni en los índices de utilización del alimento ni en el crecimiento de los animales.
4. El empleo de los distintos tipos y niveles de hidratos de carbono utilizados no derivan en una situación de estrés oxidativo.

## 2.6. CONCLUSIONS

1. Based on growth performance and nutritive utilization of the diet, common dentex uses efficiently carbohydrates, although the optimum dietary levels are below 24% for the experimental conditions and sources tested.
2. The highest protein sparing effect was promoted by the carbohydrate source of less complexity (maltodextrin) which, in addition, renders the best growth performance and feed utilization rates at intermediate level of inclusion (18%).
3. Although the kind of carbohydrate influenced the activity of different intermediary metabolism enzymes, their effects were not reflected either in food utilization or in animal growth.
4. Using different types and levels of carbohydrates does not induce oxidative stress.





### **3. BLOQUE EXPERIMENTAL IV-3. Formulación dietaria con distintas combinaciones de macronutrientes para dentón: consecuencias sobre el crecimiento, utilización nutritiva, metabolismo y estado redox.**

#### **3.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

Uno de los requisitos más importantes para la introducción de una nueva especie en acuicultura pasa por establecer una alimentación específica que cubra todas las necesidades nutricionales en cada fase de su desarrollo. Los peces, como el resto de los animales, utilizan los macronutrientes (proteína, lípidos y carbohidratos) contenidos en el alimento para obtener la energía que precisan para su mantenimiento y crecimiento, por lo que la determinación del correcto balance entre esos macronutrientes es fundamental para garantizar el éxito de la producción.

Si consideramos que el componente más importante que determina el crecimiento de los peces es la proteína dietaria, incorporada a nivel muscular (Lovell, 1989), el empleo de altos niveles de este nutriente puede conducir, especialmente en peces carnívoros, a una mejora de la producción. Sin embargo, este incremento proteico implicaría un conjunto de desventajas. Así, al ser la proteína el componente más costoso, este hecho conduciría a un encarecimiento del alimento. Además, los peces utilizan los aminoácidos que componen las proteínas como fuentes preferenciales de energía (Cowey y Walton, 1989; Cho y Kaushik, 1990), por lo que la inclusión de elevados niveles de proteína en relación con pequeñas cantidades de lípidos o carbohidratos, supondría el desvío del empleo de este nutriente para fines energéticos y no tanto para estructurales, con la consecuente liberación al medio de mayores cantidades de desechos nitrogenados derivados del catabolismo proteico. Por todo ello, es importante que los primeros pasos en la obtención de un adecuado alimento para una nueva especie para la acuicultura estén dirigidos inicialmente a la determinación de las necesidades proteicas que permitan asegurar un crecimiento máximo, con el menor coste económico y ambiental.

En el caso del dentón, los estudios realizados durante las fases de preengorde y engorde, revelan que el porcentaje de proteínas para alcanzar un óptimo crecimiento oscila entre el 43% y el 59% de la dieta (Riera et al., 1993; Efthimiou et al., 1994; Tibaldi et al., 1996; Cardenete et al., 1997a,b,d; Company et al., 1999a, Jover et al., 1999; Espinós et al., 2003; Skalli et al., 2004). No obstante, el empleo de niveles de proteína más bajos (43-45%) dentro de estos límites, sin que se vieran afectados negativamente los parámetros de crecimiento y utilización del alimento, sería posible, siempre y cuando sea establecido un correcto balance entre los macronutrientes (Company et al., 1999a; Espinós et al., 2003; Skalli et al., 2004).

En este sentido, cabe destacar que la determinación de la concentración óptima de proteína dietaria para una determinada especie está condicionada por la posibilidad de incluir otras fuentes energéticas en la dieta (NRC, 1993). Así, y como indicábamos anteriormente, aunque la proteína es la fuente preferencial de energía para los peces, también es el componente más caro de la dieta. Este hecho, unido a la creciente dificultad actual para la obtención de la cantidad necesaria de harina de pescado como materia prima en la elaboración de alimentos para la acuicultura, ha hecho que numerosos investigadores orienten sus estudios hacia la consecución de la sustitución parcial de esta proteína por otras fuentes proteicas alternativas, o bien por un mayor nivel de lípidos o carbohidratos (Tidwell y Allan 2001; Tacon, 2003). Esta utilización de lípidos o carbohidratos, permitiría reducir el catabolismo proteico, destinando este componente a fines plásticos en lugar de energéticos, con las consecuentes ventajas económicas y ambientales (Kaushik y Oliva-Teles, 1985).

Los lípidos han sido tradicionalmente la primera opción utilizada en la sustitución parcial de la proteína para obtención de energía, ya que, además de ser una fuente fundamental de ácidos grasos esenciales y vehículo transportador de vitaminas y micronutrientes liposolubles, son fácilmente digeridos y metabolizados por los peces (Cowey y Sargent, 1977; Watanabe, 1982; Kaushik, 1990; Sargent et al., 1999, 2002; Oliva-Teles, 2000). Muchas especies han mostrado la eficiencia de este nutriente en el efecto de ahorro de la proteína dietaria. Así, Dias et al. (1998) observó que en lubina el contenido proteico podía ser disminuido del 52% al 43%, elevando el nivel de lípidos hasta 18%, sin afectar negativamente los parámetros de crecimiento y utilización del alimento. Otros estudios realizados en lubina muestran este mismo efecto de ahorro

proteico por los lípidos, aunque los niveles recomendados por cada autor difieren ligeramente en función de las condiciones experimentales (Pérez et al., 1997; Lanari et al., 1999; Peres y Oliva-Teles, 1999a; Dias et al., 2003). En el caso de la dorada, Vergara et al. (1996) estimaron que el nivel de proteína podía reducirse del 58% al 46% incrementando los lípidos dietarios desde 9 al 15%. Asimismo, García-Alcázar et al. (1995) y Vergara et al. (1999) propusieron una elevación del contenido lipídico hasta el 22% para esta misma especie, sin que se vieran afectados los parámetros de crecimiento, utilización del alimento o contenido en grasa corporal. Otros estudios en dorada respaldan el uso eficaz que esta especie hace de los lípidos dietarios para ahorro proteico (Santinha et al., 1999).

En el caso del dentón, Tibaldi et al. (1996) sugirieron que, considerando la eficiencia y retención proteica, el contenido lipídico podía elevarse hasta el 17.2%, siendo este nivel el más adecuado para individuos de un peso de alrededor de 20 g, pudiendo utilizar eficazmente dietas con un nivel del 49.5% en proteína en comparación a las que contenían un 58.9%. De igual forma, Company et al. (1999a) citaron similares crecimientos en dentones de 8 g, utilizando dietas cuyos niveles de proteína/lípidos eran 55/9 y 46/17, demostrando de nuevo la posibilidad de reducir la proteína mediante el incremento del nivel lipídico hasta un 17%. Jover et al. (1999) y Espinós et al. (2003) recomendaron niveles de lípidos en torno al 12-17% para dentones de 1 g y 2.5 g de peso inicial, respectivamente, incluyendo niveles de proteína entre el 45% y el 50%. Asimismo, otros autores indicaron que un incremento de lípidos dietarios de 10.6% a 19.7% permite disminuir los niveles de proteína desde el 57% al 50% sin afectar la TCI o el IC en dentones con un peso inicial de 10 g, e incluso, para dentones de 92 g, los niveles de lípidos dietarios pueden ser elevados hasta un 24%, reduciendo la proteína hasta el 43% (Skalli et al., 2004).

Sin embargo, si se considera que el principal origen de los lípidos dietarios es el aceite de pescado, posiblemente su utilización se enfrenta al mismo inconveniente que en el caso de la proteína. Así, aunque algunos estudios se han dirigido a la posibilidad de sustituirlo por otros aceites de origen vegetal (Tacon, 1994; Watanabe, 2002), el hecho de que los carbohidratos sean un recurso fácilmente accesible y barato, los ha convertido en uno de los componentes energéticos más atractivos para su utilización en alimentación acuícola. A pesar de ello, la bibliografía nos muestra que, en general, los

peces tienen una capacidad limitada de utilización de los carbohidratos, especialmente las especies carnívoras (Wilson, 1994). No obstante, los tratamientos tecnológicos y la combinación apropiada de fuente y nivel de carbohidratos para una determinada especie, posibilita el uso eficaz de estos nutrientes por los peces, sin que se afecten negativamente ni crecimiento ni utilización del alimento y ha sido demostrado en multitud de especies (para una revisión en profundidad remitimos a la información bibliográfica expuesta en el capítulo anterior).

Por otra parte, el suministro de energía digestible en las dietas a través de lípidos y carbohidratos debe ser establecido dentro de una limitación. Así, aquellos casos en los que la relación P/E es muy baja y por tanto existe un exceso de energía no proteica, podría tener como consecuencia una prematura saciedad de las necesidades energéticas de los peces, generando una interrupción voluntaria de la ingesta antes de consumir la proteína y otros nutrientes necesarios para cubrir las mínimas necesidades para el correcto desarrollo (Lovell, 1979; Watanabe, 1982; Alsted y Jokumsen, 1989; Ellis y Reigh, 1991). Además, altos niveles de lípidos dietarios pueden afectar la composición corporal de los peces debido a un incremento en la acumulación lipídica, con las consecuencias generadas sobre la calidad del producto (Reinitz et al., 1978; Hillestad y Johnsen, 1994; Einen y Skrede, 1988; Company et al., 1999c; Vergara et al., 1999). Por el contrario, y como ya hemos indicado, una alta relación P/E, es decir, insuficiente energía no proteica, supondría un uso de las proteínas dietarias para la obtención de energía comprometiendo el crecimiento y aumentando la liberación de compuestos nitrogenados al medio (Ballestrazzi et al., 1994; Shyong et al., 1998). Por tanto, la determinación precisa de las necesidades de proteína para una especie estará marcada por el delicado balance entre proteína y energía, siendo necesaria la optimización de esta relación con el aporte adecuado de lípidos y/o carbohidratos.

Diversos estudios indican que los peces capaces de utilizar altos niveles de lípidos dietarios como fuente de energía, requieren bajas relaciones P/E. Así, Lee y Putnam (1980) establecieron que la óptima relación P/E para la trucha arcoiris era de 22 g MJ<sup>-1</sup>. En el caso del salmón y la lubina, 18 g MJ<sup>-1</sup> y 20.5 g MJ<sup>-1</sup> eran los niveles adecuados, respectivamente (Hillestad y Johnsen, 1994; Dias et al., 1998). Sin embargo, en otras especies, la relación P/E es relativamente más elevada, como es el caso de *Epinephelus*

*malabaricus* con un valor de 31 g MJ<sup>-1</sup> (Shiau y Lan, 1996), *Sciaenops ocellatus* con valores de 28 g MJ<sup>-1</sup> (McGoogan y Gatlin, 1999) o *Nibea miichthioides* con 25 g MJ<sup>-1</sup> (Wang et al., 2006a). Tibaldi et al. (1996) proponen que la óptima relación P/E para dentones de 20 g sería 24 g MJ<sup>-1</sup>, mientras que Espinós et al. (2003) la establecieron en 22 g MJ<sup>-1</sup> para animales de 2.5 g. Skalli et al. (2004) observaron que la mejor relación P/E fue de 23.7 g MJ<sup>-1</sup> en dentones cuyo peso inicial fue de 10 g, y de 19.5 g MJ<sup>-1</sup> para animales más grandes (92 g). De cualquier modo, no se debe olvidar que para estas relaciones, así como para las necesidades nutricionales, además del tamaño de los peces, la calidad de los ingredientes es un factor determinante. Por ejemplo, Hidalgo et al. (1993) obtuvieron que la óptima relación P/E para anguila era de 14.3 g MJ<sup>-1</sup> utilizando almidón pretratado como fuente de carbohidratos, mientras que García-Gallego et al. (1993) reportaron un valor de 23.9 g MJ<sup>-1</sup> empleando harina de maíz.

Igualmente, cuando se formula una dieta con un adecuado balance de macronutrientes, la digestibilidad es un factor que debe ser considerado, no sólo por la influencia que ejerce la naturaleza de las materias utilizadas, sino también por el posible efecto de las proporciones de los componentes dietarios utilizados. Así por ejemplo, un incremento en el contenido de hidratos de carbono, parece disminuir los coeficientes de digestibilidad aparente de los lípidos en especies como el salmón (Aksnes, 1995; Hemre et al., 1995; Grisdale-Helland y Helland, 1997) o la trucha arcoiris (Spannhof y Plantikow, 1983; Kim y Kaushik, 1992; Storebakken et al., 1998), mientras que por el contrario, parece aumentar los de las proteínas, tal y como se ha observado en trucha arcoiris (Storebakken et al., 1998), aunque distintos autores no reflejan tal efecto (Aksnes, 1995; Hemre et al., 1995; Grisdale-Helland y Helland, 1997, 1998). Por otro lado, un incremento del nivel de carbohidratos parece afectar negativamente la digestibilidad de los mismos (Aksnes, 1995; Hemre et al., 1995; Grisdale-Helland y Helland, 1997, 1998). En cuanto al contenido proteico, otros autores observaron que un aumento del nivel de este nutriente conlleva una mayor digestibilidad del mismo, probablemente por la disminución relativa del resto de componentes dietarios (lípidos o carbohidratos) (De Silva y Perera, 1984; Machielis y Henken, 1985; Hajen et al., 1993). Por su parte, un incremento en el contenido de lípidos dietarios no afectó significativamente su digestibilidad en especies como *Hippoglossus hippoglossus* (Berge y Storebakken, 1991; Grisdale-Helland y Helland, 1998) o en salmón (Johnsen

et al., 1993). Adicionalmente, aunque en algunos casos no se muestra efecto del nivel de lípidos sobre la digestibilidad de los carbohidratos (Grisdale-Helland y Helland, 1998), en otros se observó una disminución en los coeficientes de digestibilidad aparente de este nutriente cuando el contenido lipídico dietario era elevado (24-30%) (Grisdale-Helland y Helland, 1997).

Respecto a la influencia del balance de macronutrientes dietarios sobre el metabolismo intermediario, distintos estudios han observado que los peces son capaces de adaptarse a las nuevas situaciones nutricionales adaptando su perfil metabólico (Walton y Cowey, 1982; Metón et al., 1999; Lundstedt et al., 2004). En términos muy generales, las principales modulaciones metabólicas generadas por el estado nutricional de los peces implicarían que, dietas ricas en proteína estimularían las vías proteolíticas y gluconeogénicas. Por otro lado, la sustitución parcial de las proteínas por lípidos inhibirían las vías lipogénicas, mientras que el uso de carbohidratos estimularía la glucólisis, glucogénesis y lipogénesis, disminuyendo la actividad de catálisis de las proteínas y la gluconeogénesis.

Los principales efectos de dietas con alto contenido en proteína son un incremento en la actividad hepática de los enzimas GOT, GPT, GDH, representativas del catabolismo aminoacídico (Suárez et al., 1995; Sánchez-Muros et al., 1998; Gallagher, 1999; Stone et al., 2003; Bibiano Melo et al., 2006). Sin embargo, otros autores indican que la actividad de estos enzimas no se ve afectada por el nivel de proteína dietaria (Cowey y Walton, 1989; Kirchner et al., 2003). En cuanto a la sustitución parcial de proteína por carbohidratos o lípidos parece producir una disminución en la actividad de estas enzimas (Suárez et al., 1995). Como indicábamos anteriormente, este aumento en las actividades de los enzimas degradativos de aminoácidos, consecuencia de un mayor nivel de proteína dietaria, suele ser paralelo a un descenso en la actividad de la vía glucolítica y al incremento de la vía gluconeogénica, como se observa por el incremento en la actividad FBPasa hepática en especies como la trucha arcoiris (De la Higuera y Cárdenas, 1985; Kirchner et al., 2003, 2005), anguila (Suárez et al., 1995, 2002) y dorada (Caseras et al., 2002). En este mismo sentido, la sustitución parcial de la proteína por carbohidratos en la dieta induce una disminución en la actividad de este enzima (Suárez et al., 1995, 2002; Panserat et al., 2002). Sin embargo, a un mismo nivel de proteína y carbohidratos, niveles crecientes de lípidos no muestran variaciones

significativas en la actividad de este enzima (Suárez et al., 1995). En cuanto a los enzimas HK, HK-IV o PFK en hígado, reguladores de la glucólisis, se ha observado que sus actividades aumentan cuando los niveles de proteína son bajos, fundamentalmente cuando la sustitución parcial de la proteína se realiza con carbohidratos (Metón et al., 1999, 2000; Caseras et al., 2002; Suárez et al., 2002; Kirchner et al., 2005). Igualmente, el uso de dietas bajas en proteína también parece disminuir la actividad de los enzimas hepáticos generadores de NADPH (Walton, 1986; Barroso et al., 1994), aunque la ausencia de tal efecto también ha sido observada (Lupiáñez et al., 1989).

Por otro lado, en distintas especies de salmón se ha observado que un alimento rico en lípidos hace decrecer la actividad de los enzimas lipogénicos (Lin et al., 1977; Arnesen et al., 1993). Igualmente, Suárez et al. (1995) encontraron una relación inversa entre la actividad G6PDH hepática y el nivel de lípidos dietarios cuando el contenido en carbohidratos y proteína se mantenía constante en dietas suministradas a anguilas. Similares resultados fueron obtenidos en trucha arcoiris (Jürss et al., 1985; Gélinau et al., 2001; Suárez et al., 2002), cuando las proteínas dietarias eran sustituidas por lípidos. Asimismo, Boujard et al. (2004) y Wang et al. (2005a) reportaron que para lubina y *Rachycentron canadum*, respectivamente, las actividades hepáticas de G6PDH y EM disminuían al aumentar el contenido de lípidos en la dieta. Por otro lado, altos niveles de carbohidratos en la dieta estimulan la actividad de los enzimas implicados en la síntesis de lípidos (Likimani y Wilson, 1982; Fynn-Aikins et al., 1992; Suárez et al., 1995; Barroso et al., 2001).

Por su parte, son muy pocos los estudios dirigidos a determinar el efecto de las distintas fuentes de energía dietaria sobre el estado oxidativo de los peces. Radi et al. (1985) observaron que las actividades GPX y CAT en peces de hábito herbívoro, fueron relativamente más bajas que en aquellas especies omnívoras, aunque por el contrario, la actividad del isoenzima SOD manganeso fue más elevada en las herbívoras que en las omnívoras. Al comparar las especies carnívoras con aquellas que presentan los otros dos hábitos alimenticios, Radi et al. (1987) observaron una menor actividad GPX, mientras que la actividad CAT y SOD eran mucho mayores. En cuanto a los niveles de peroxidación lipídica, las especies herbívoras parecen presentar mayores daños que las omnívoras (Radi et al., 1985), aunque en otros estudios no se mostraron diferencias entre los tres grupos de especies (herbívoras, omnívoras y carnívoras) (Radi et al.,



1987). Por otro lado, se ha observado que altos niveles de proteína están asociados con una mayor susceptibilidad del músculo de la trucha arcoiris y la lubina a la oxidación (Álvarez et al., 1998). Respecto a la influencia de los lípidos, Rueda-Jasso et al. (2004) encontraron que en *Solea senegalensis*, la actividad hepática de las enzimas CAT y SOD fue más alta en aquellos peces alimentados con dietas de alto contenido lipídico. Por otro lado, Álvarez et al. (1998) observaron que tanto en trucha arcoiris como en lubina alimentadas con dietas con altos niveles de lípidos, existía una mayor susceptibilidad a la oxidación muscular.

Finalmente, tanto la fuente como el nivel de los carbohidratos dietarios, también intervienen en el estado oxidativo de los peces, no sólo directamente sobre la eliminación de los agentes oxidantes, sino indirectamente a través del papel de este nutriente en la generación de NADPH necesario para la regeneración del glutatión oxidado (Sagone et al., 1983; Álvarez et al., 1999; Lygren y Hemre, 2002; Morales et al., 2004; Rueda-Jasso et al., 2004). Para una revisión más detallada remitimos al capítulo anterior.

## 3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 3.2.1. Dietas experimentales y alimentación

En base a los resultados obtenidos en el ensayo anterior, referentes a la digestibilidad aparente de los macronutrientes de aquellas dietas donde la fuente de carbohidratos parecía ser la más apropiada para ser utilizada en la alimentación para dentón, se formularon y fabricaron 4 dietas experimentales. En la formulación se combinaron niveles altos y bajos de los distintos macronutrientes y se estableció un contenido en energía digestible ( $18 \text{ MJ kg}^{-1}$ ) constante para todas ellas. En dos de las dietas el contenido en proteína se estableció en un 43%, mientras que en las otras dos fue del 38%, siendo por tanto las relaciones proteína/energía de  $23.9 \text{ g MJ}^{-1}$  y  $21.1 \text{ g MJ}^{-1}$ , respectivamente. Dentro de cada par de dietas, con el contenido proteico prefijado, se estableció un nivel de lípidos (24%) para una de ellas, y uno de carbohidratos (28%) para la otra dieta, ajustando en cada caso el macronutriente restante, con el fin de conseguir que todas las dietas mantuvieran constante el contenido energético. El tamaño de grano empleado en la fabricación de las dietas fue de 3 mm y 4.5 mm, suministrando el más pequeño al inicio del experimento, pasándose a usar el de mayor diámetro, más apropiado, cuando el tamaño de los peces lo precisó. Se tomaron muestras de los piensos elaborados para determinar su composición analítica, incluyendo el contenido en cromo. El sistema de elaboración, almacenamiento y técnicas analíticas de composición de los piensos se encuentran descritos en el apartado de material y métodos. La formulación y composición analítica de las dietas se encuentran reflejadas en la Tabla IV-21. Las dietas experimentales se suministraron manualmente hasta saciedad aparente en tres tomas diarias.

### 3.2.2. Animales y mantenimiento

Se emplearon 288 dentones (*Dentex dentex*) de un peso medio inicial de  $91.7 \pm 1.4 \text{ g}$ , distribuidos al azar en 4 lotes triplicados (24 individuos/lote), correspondientes a cada una de las dietas formuladas. Los animales de dos de los tres lotes asignados a cada dieta fueron alojados en tanques cilíndricos grises de fibra de vidrio, mientras que el tercer lote de cada dieta se alojó en tanques cilindrocónicos grises de fibra de vidrio

especialmente preparados para ensayos de digestibilidad. En ambos casos, el volumen de los tanques fue de 500 litros de capacidad y el sistema de abastecimiento basado en un circuito abierto abastecido por agua de mar (37 ‰ de salinidad) y con un flujo continuo de 15 l min<sup>-1</sup>. El fotoperiodo fue 12 horas luz y 12 horas oscuridad. La temperatura media del agua fue de 18.0 ± 1.0 °C y los niveles medios de oxígeno disuelto superiores al 85% del nivel saturación. Los peces fueron sometidos a una fase de adaptación a las condiciones del ensayo durante 1 semana. Tras este periodo, el ensayo tuvo una duración de 13 semanas.

Tabla IV-21. Formulación y composición analítica de las dietas experimentales del ensayo de diferentes niveles de macronutrientes.

	DIETAS			
	P <sub>43</sub> C <sub>28</sub>	P <sub>43</sub> L <sub>24</sub>	P <sub>38</sub> C <sub>28</sub>	P <sub>38</sub> L <sub>24</sub>
<b>% P / % L / % H.C.</b>	<b>43 / 16.7 / 28</b>	<b>43 / 24 / 4.1</b>	<b>38 / 19.5 / 28</b>	<b>38 / 24 / 13.4</b>
<i>Ingredientes (g 100 g dieta ss<sup>-1</sup>)</i>				
Harina de pescado	58.89	58.89	52.04	52.04
Aceite de pescado	9.68	16.97	13.28	17.73
Lecitina	0.50	0.50	0.50	0.50
Maltodextrina	28.00	4.15	28.00	13.42
Complemento mineral <sup>1</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00
Complemento vitamínico <sup>1</sup>	0.50	0.50	0.50	0.50
Cloruro de colina	0.30	0.30	0.30	0.30
Ascorbil palmitato	0.10	0.10	0.10	0.10
Cromo	0.50	0.50	0.50	0.50
Hidroxipropil-metil celulosa	0.50	0.50	0.50	0.50
Celulosa microcristalina	0.03	16.59	3.28	13.41
<i>Análisis de las dietas</i>				
Humedad (%)	12.12	4.46	11.06	3.99
Proteína (% ss)	44.68	42.80	39.11	38.67
Lípidos (% ss)	16.34	23.36	19.84	24.10
Ceniza (% ss)	10.78	10.38	9.47	9.39
MELN (% ss)	28.20	23.47	31.58	27.83

<sup>1</sup> Composición de los complementos vitamínico y mineral indicada en Tabla III-1.

### 3.2.3. Toma de muestras, parámetros calculados y análisis realizados

Al igual que en los experimentos anteriores, tanto la ingesta como la mortalidad fueron registradas diariamente en cada uno de los lotes experimentales. La longitud total y el peso de los animales de cada lote fueron registrados individualmente al inicio, durante (cada mes) y al final del experimento. En el transcurso de las 10 primeras semanas se recogió la cantidad de heces necesaria para realizar análisis de composición y contenido en cromo de las mismas. Tanto al inicio (10 peces en total) como al final del experimento (3 peces por lote, 9 por dieta) se tomaron muestras de los animales con el fin de determinar su composición corporal. Además, transcurrida la totalidad del periodo experimental, otros 3 peces por lote (9 peces por dieta) fueron muestreados para extracción de sangre, hígado, corazón y músculo blanco. Los hígados fueron pesados en el momento de la extracción.

La metodología empleada para la toma de muestras, así como para su procesamiento y análisis, y la descripción de los índices determinados se encuentran detalladas en el apartado de material y métodos general, así como en el Anexo I.

Se calcularon el incremento de peso y los índices IC, TCI, CEC, VPP, VPL, IN, RHS, así como los coeficientes de digestibilidad aparente CDA-P, CDA-L, CDA-MS y CDA-MO.

En las muestras de sangre se determinaron el contenido en hemoglobina, el hematocrito y la concentración de hemoglobina corpuscular media. Asimismo, se separó la fracción plasmática, para análisis de contenido en glucosa, colesterol total, colesterol HDL y LDL, triglicéridos, lípidos totales, aminoácidos y proteína plasmática; y el hemolisado, sobre el que se determinaron las actividades de los enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPX y GR, así como el nivel de peroxidación lipídica como indicador de daño oxidativo.

Las muestras hepáticas y musculares se emplearon en el análisis de su contenido en lípidos y glucógeno, y junto con las de corazón (3 pooles para cada dieta de 3 corazones cada uno) se utilizaron para la determinación de las actividades de enzimas del metabolismo intermediario HK, HK-IV, PK, FBPasa, GK, GDH, GOT, GPT, CS, G6PDH, EM, HOAD, ACoAT y  $\beta$ -OHBDH. Sobre estos tres tejidos, también se realizó una valoración del posible daño oxidativo (MDA y grupos carbonilo (estos últimos sólo en hígado y corazón)) producido por las especies de oxígeno reactivo y de las actividades de los enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPX y GR. Además, se analizó el patrón isoenzimático de la SOD en hígado, músculo blanco y corazón mediante técnicas electroforéticas.

Para poner de manifiesto el efecto general y combinado de los distintos niveles de macronutrientes empleados sobre los parámetros medidos se aplicó el Análisis de la Varianza de dos vías. Los niveles de confianza considerados en las comparaciones fueron del 95% ( $P < 0.05$ ), 99% ( $P < 0.01$ ) y 99.9% ( $P < 0.001$ ).

### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1. Crecimiento e índices biométricos

En la Tabla IV-22 se reflejan los resultados de crecimiento e índices biométricos en dentones alimentados con los distintos tratamientos dietarios. Como se puede observar, en ningún caso los valores obtenidos para crecimiento indican la existencia de diferencias significativas producidas por la utilización de los distintos niveles de macronutrientes. Asimismo, tampoco el IN reflejó un claro efecto del uso de diferentes proporciones de proteína, lípidos o carbohidratos en los dentones alimentados con las diferentes dietas. En cuanto a la RHS, aunque la estadística no mostró influencia debido al nivel de proteínas ni a la interacción entre la proteína y el nivel de lípidos o carbohidratos, sí aparecieron diferencias significativas como consecuencia de la utilización de diferentes niveles extremos de lípidos o carbohidratos.

Tabla IV-22. Crecimiento e índices biométricos en dentón alimentado con distintos niveles de macronutrientes.

<b>Dieta</b>	<b>Peso Medio Inicial (g)</b>	<b>Peso Medio Final (g)</b>	<b>Δ Peso (%)</b>	<b>TCI (%)</b>	<b>IN (g cm<sup>-3</sup>)</b>	<b>RHS (%)</b>
<b>P<sub>43</sub>C<sub>28</sub></b>	87.89 ± 5.45	186.2 ± 8.4	112.86 ± 12.02	0.85 ± 0.06	1.81 ± 0.02	1.68 ± 0.08
<b>P<sub>43</sub>L<sub>24</sub></b>	91.76 ± 5.31	169.4 ± 1.0	85.80 ± 10.02	0.70 ± 0.06	1.82 ± 0.03	2.00 ± 0.16
<b>P<sub>38</sub>C<sub>28</sub></b>	93.10 ± 1.09	173.2 ± 5.5	86.08 ± 5.98	0.70 ± 0.04	1.77 ± 0.02	1.64 ± 0.09
<b>P<sub>38</sub>L<sub>24</sub></b>	94.21 ± 5.44	162.9 ± 17.8	71.94 ± 9.65	0.61 ± 0.06	1.76 ± 0.03	1.90 ± 0.09
<b>P</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>C-L</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*
<b>P×C-L</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Los resultados son media ± E.S. de tres lotes experimentales, excepto en IN (n = supervivientes) y RHS (n = 9). En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde los asteriscos indican diferencias significativas, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.

### 3.3.2. Ingesta, utilización nutritiva del alimento y supervivencia

Los resultados de ingesta, utilización nutritiva del alimento y supervivencia de los distintos tratamientos dietarios en juveniles de dentón se encuentran reflejados en la Tabla IV-23. En relación a la ingesta, los únicos efectos observados fueron aquellos promovidos por los distintos niveles de inclusión de carbohidratos o lípidos. Así, los valores más elevados de ingesta correspondieron a los grupos alimentados con las dietas que contenían mayor nivel de carbohidratos, independientemente del nivel proteico. Por otra parte, los valores del IC y CEC no difirieron entre tratamientos como consecuencia del distinto contenido en proteína, lípidos o carbohidratos o de la combinación de estos macronutrientes. En cuanto a los valores VPP y VPL, tampoco se vieron afectados por el nivel proteico dietario. No obstante, aunque el empleo de distintos niveles de carbohidratos o lípidos no reflejó un claro efecto sobre el VPL, en el caso del VPP se pudo observar que la utilización de un mayor nivel de lípidos frente al empleo de carbohidratos generó los índices más elevados de VPP. Por su parte, la interacción de las diferentes proporciones de macronutrientes dietarios indujo diferencias significativas en los valores VPL, pero no en los del VPP. Así, los grupos alimentados con las dietas P<sub>38</sub>L<sub>24</sub> y P<sub>43</sub>L<sub>24</sub> presentaron los valores de VPL más elevados y más bajos, respectivamente. En ningún caso se observaron efectos sobre la supervivencia causados por los distintos tratamientos dietarios.

Tabla IV-23. Ingesta, utilización nutritiva de la dieta y supervivencia en dentón alimentado con distintos niveles de macronutrientes.

<b>Dieta</b>	<b>Ingesta</b> (g 100 g pez <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	<b>IC</b>	<b>CEC</b>	<b>VPP</b> (%)	<b>VPL</b> (%)	<b>Supervivencia</b> (%)
<b>P<sub>43</sub>C<sub>28</sub></b>	1.39 ± 0.04	0.59 ± 0.02	1.36 ± 0.05	25.28 ± 0.96	42.34 ± 2.60	90.28 ± 8.45
<b>P<sub>43</sub>L<sub>24</sub></b>	1.03 ± 0.08	0.66 ± 0.02	1.53 ± 0.04	26.64 ± 1.60	28.36 ± 3.84	88.89 ± 1.39
<b>P<sub>38</sub>C<sub>28</sub></b>	1.29 ± 0.02	0.53 ± 0.02	1.40 ± 0.05	22.91 ± 2.94	32.05 ± 6.67	90.28 ± 2.78
<b>P<sub>38</sub>L<sub>24</sub></b>	0.97 ± 0.02	0.61 ± 0.06	1.62 ± 0.15	34.29 ± 4.13	48.28 ± 6.17	87.50 ± 6.36
<b>P</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>C-L</b>	***	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.
<b>P×C-L</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.

Los resultados son media ± E.S. de tres lotes experimentales. En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías, donde los asteriscos indican diferencias significativas siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.

### 3.3.3. Coeficientes de digestibilidad aparente

Los coeficientes de digestibilidad aparente de los principales macronutrientes de las dietas experimentales empleadas en la alimentación de dentón se muestran en la Tabla IV-24. Las únicas diferencias significativas observadas fueron aquellas inducidas por los distintos niveles de proteína sobre los coeficientes de digestibilidad aparente de los lípidos y las proteínas. Así, los mayores niveles de digestibilidad correspondieron a aquellas dietas con un nivel de inclusión del 43% proteico.

Tabla IV-24. Coeficientes de digestibilidad aparente de los principales macronutrientes en dentón alimentado con distintos niveles de los mismos. Los datos se expresan como % ss.

<b>Dieta</b>	<b>CDA-P</b>	<b>CDA-L</b>	<b>CDA-MS</b>	<b>CDA-MO</b>
<b>P<sub>43</sub>C<sub>28</sub></b>	87.64 ± 0.57	93.15 ± 0.20	51.26 ± 1.11	63.00 ± 0.49
<b>P<sub>43</sub>L<sub>24</sub></b>	86.98 ± 0.88	95.40 ± 0.39	49.62 ± 4.27	60.74 ± 3.33
<b>P<sub>38</sub>C<sub>28</sub></b>	82.68 ± 1.38	92.17 ± 0.66	50.50 ± 4.15	66.02 ± 2.85
<b>P<sub>38</sub>L<sub>24</sub></b>	83.86 ± 1.02	92.59 ± 0.42	55.21 ± 2.54	68.19 ± 1.80
<b>P</b>	**	**	n.s.	n.s.
<b>C-L</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>P×C-L</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Los resultados son media ± E.S. de tres lotes experimentales. En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde los asteriscos indican diferencias significativas, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.



### 3.3.4. Composición corporal

El empleo de los distintos niveles de proteína, lípidos o carbohidratos, así como de la interacción entre estos macronutrientes, no indujo ningún efecto sobre la composición corporal de los dentones alimentados con los distintos tratamientos dietarios (Tabla IV-25).

Tabla IV-25. Composición corporal de dentón alimentado con distintos niveles de macronutrientes.

<b>Dieta</b>	<b>Humedad</b> (%)	<b>Ceniza</b> (% ss)	<b>Grasa</b> (% ss)	<b>Proteína</b> (% ss)
<b>P<sub>43</sub>C<sub>28</sub></b>	67.83 ± 0.49	14.29 ± 0.46	23.77 ± 1.68	53.83 ± 1.25
<b>P<sub>43</sub>L<sub>24</sub></b>	68.26 ± 0.78	15.15 ± 0.60	21.16 ± 1.81	53.16 ± 1.34
<b>P<sub>38</sub>C<sub>28</sub></b>	68.22 ± 0.73	15.88 ± 0.42	24.21 ± 1.63	55.66 ± 0.98
<b>P<sub>38</sub>L<sub>24</sub></b>	67.80 ± 0.63	15.82 ± 0.92	25.23 ± 2.14	53.18 ± 1.05
<b>P</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>C-L</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>P×C-L</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Los resultados son media ± E.S. (n = 9). En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde los asteriscos indican diferencias significativas, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.

### 3.3.5. Contenido de glucógeno y lípidos en hígado y músculo blanco

Los resultados del contenido en glucógeno y lípidos tanto hepático como muscular de los dentones alimentados con dietas conteniendo diferentes niveles de macronutrientes se encuentran reflejados en la Tabla IV-26.

En relación con el glucógeno, se puede observar que, considerando aisladamente el nivel de proteína dietaria, o bien los niveles de lípidos o carbohidratos, éstos no influyeron significativamente en los niveles de este metabolito ni en hígado ni en músculo blanco. Sin embargo, la interacción de los distintos macronutrientes dietarios generó cambios significativos en el contenido de glucógeno de ambos tejidos. Así, tanto para el hígado como para el músculo blanco, los niveles más bajos de glucógeno correspondieron a los grupos de dentones alimentados con la dieta P<sub>38</sub>C<sub>28</sub>.

En cuanto a la concentración de lípidos, ésta no presentó cambios significativos como consecuencia de la alimentación con distintos niveles de carbohidratos o lípidos, así como de la combinación de estos macronutrientes con diferentes niveles de proteínas en las dietas, ni en el hígado ni en el músculo blanco de los dentones analizados. No obstante, aisladamente, la inclusión de niveles de proteína del 43% dietario, frente a los tratamientos con niveles más bajos (38%), indujo la acumulación de un mayor contenido lipídico en ambos tejidos.

Tabla IV-26. Efecto de la alimentación con distintos niveles de macronutrientes en el contenido en lípidos y glucógeno en hígado y músculo blanco de dentón.

Dieta	Glucógeno (mg glucosa g tejido <sup>-1</sup> )		Lípidos (mg g tejido <sup>-1</sup> )	
	Hígado	Músculo	Hígado	Músculo
<b>P<sub>43</sub>C<sub>28</sub></b>	120.0 ± 1.6	0.87 ± 0.06	48.91 ± 2.28	17.74 ± 1.19
<b>P<sub>43</sub>L<sub>24</sub></b>	112.3 ± 6.8	0.80 ± 0.09	41.36 ± 3.05	18.35 ± 0.88
<b>P<sub>38</sub>C<sub>28</sub></b>	101.0 ± 3.5	0.55 ± 0.04	35.26 ± 2.12	11.08 ± 0.68
<b>P<sub>38</sub>L<sub>24</sub></b>	117.7 ± 2.3	0.92 ± 0.09	35.94 ± 1.74	14.01 ± 0.84
<b>P</b>	n.s.	n.s.	***	***
<b>C-L</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>P×C-L</b>	**	**	n.s.	n.s.

Los resultados son media ± E.S. (n = 9). En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías, donde los asteriscos indican diferencias significativas siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.

### 3.3.6. Constantes eritrocitarias

En la Tabla IV-27 se reflejan los resultados de las constantes eritrocitarias determinadas en dentón alimentado con los distintos tratamientos dietarios. Como se puede observar, no se reflejaron cambios sobre el hematocrito, la hemoglobina o el índice CHCM en los dentones analizados, como consecuencia de las distintas composiciones dietarias, con la única excepción del efecto producido por la interacción entre proteína y lípidos o carbohidratos presentada en el hematocrito, donde los valores más altos y bajos fueron aquellos que correspondieron a las dietas P<sub>38</sub>C<sub>28</sub> y P<sub>38</sub>L<sub>24</sub>, respectivamente.

Tabla IV-27. Constantes eritrocitarias en dentón alimentado con distintos niveles de macronutrientes.

<b>Dieta</b>	<b>Hcto</b> (%)	<b>Hb</b> (g dl <sup>-1</sup> )	<b>CHCM</b> (g dl <sup>-1</sup> )
<b>P<sub>43</sub>C<sub>28</sub></b>	40.26 ± 1.88	10.66 ± 0.29	25.87 ± 0.46
<b>P<sub>43</sub>L<sub>24</sub></b>	42.49 ± 1.09	10.66 ± 0.24	26.45 ± 0.86
<b>P<sub>38</sub>C<sub>28</sub></b>	44.77 ± 1.71	10.90 ± 0.27	24.54 ± 0.87
<b>P<sub>38</sub>L<sub>24</sub></b>	39.59 ± 1.54	10.41 ± 0.28	26.39 ± 0.35
<b>P</b>	n.s.	n.s.	n.s.
<b>C-L</b>	n.s.	n.s.	n.s.
<b>P×C-L</b>	*	n.s.	n.s.

Los resultados son media ± E.S. (n = 9). En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde los asteriscos indican diferencias significativas, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.

### 3.3.7. Metabolitos plasmáticos

La Tabla IV-28 muestra los efectos de los distintos tratamientos dietarios sobre los niveles de metabolitos plasmáticos en los dentones sometidos a experimentación. En ningún caso se observaron influencias significativas de la composición dietaria sobre los niveles plasmáticos de glucosa, aminoácidos totales, triglicéridos y colesterol LDL. Por su parte, la proteína plasmática solamente se vio afectada por el contenido en proteína, de forma que un 38% de proteína dietaria promovió los niveles más elevados de este metabolito en plasma. Los lípidos totales únicamente reflejaron efectos significativos como consecuencia de los niveles de inclusión de lípidos o carbohidratos. Así, las concentraciones más elevadas de lípidos totales en plasma se observaron en los dentones alimentados con las dietas que poseían un mayor nivel de inclusión de lípidos. Por otro lado, la alimentación con un 43% de proteína promovió los niveles más bajos de colesterol total y HDL en el plasma de los dentones alimentados con estas dietas. Además, estos dos metabolitos también se vieron significativamente afectados por los niveles de lípidos o carbohidratos, observándose valores más elevados en los grupos experimentales alimentados con las dietas de mayor contenido en lípidos (24%). Igualmente, la interacción entre los niveles de proteína y carbohidratos o lípidos generaron diferencias significativas en el contenido de colesterol total y HDL, encontrándose los niveles más altos y bajos de estos metabolitos en las dietas P<sub>38</sub>L<sub>24</sub> y P<sub>43</sub>C<sub>28</sub>, respectivamente.

Tabla IV-28. Efecto sobre los niveles de metabolitos plasmáticos en dentón alimentado con distintos niveles de macronutrientes. Los datos se expresan como  $\text{mg dl}^{-1}$ .

<b>Dieta</b>	<b>Glucosa</b>	<b>Aminoácidos totales</b>	<b>Proteína</b>	<b>Lípidos totales</b>	<b>Triglicéridos</b>	<b>Colesterol total</b>	<b>Colesterol HDL</b>	<b>Colesterol LDL</b>
<b>P<sub>43</sub>C<sub>28</sub></b>	52.60 ± 2.24	382.6 ± 19.4	5519.3 ± 316.1	1378.9 ± 62.9	246.9 ± 26.8	408.0 ± 9.7	218.1 ± 7.4	252.3 ± 16.3
<b>P<sub>43</sub>L<sub>24</sub></b>	52.59 ± 1.58	378.0 ± 17.9	5035.2 ± 168.5	1760.2 ± 118.3	252.3 ± 13.0	502.8 ± 18.1	264.0 ± 4.8	295.0 ± 14.7
<b>P<sub>38</sub>C<sub>28</sub></b>	55.91 ± 2.36	374.6 ± 15.4	5650.1 ± 286.2	1632.1 ± 131.7	254.8 ± 18.7	526.0 ± 16.3	268.4 ± 7.1	270.5 ± 9.4
<b>P<sub>38</sub>L<sub>24</sub></b>	52.10 ± 2.60	361.4 ± 14.5	6197.6 ± 277.6	1985.4 ± 140.8	284.3 ± 23.5	531.0 ± 26.7	283.7 ± 7.3	273.2 ± 12.6
<b>P</b>	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	***	***	n.s.
<b>C-L</b>	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	*	***	n.s.
<b>P×C-L</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	*	n.s.

Los resultados son media ± E.S. (n = 9). En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde los asteriscos indican diferencias significativas, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.

### 3.3.8. Metabolismo intermediario

#### *Hígado*

Los resultados presentados en la Tabla IV-29, correspondientes a hígado, revelan que las actividades específicas de los enzimas HK, PK, GDH, GOT, CS, EM y  $\beta$ -OHBDH no fueron influenciadas en ningún caso por la composición de las dietas experimentales. No obstante, la utilización de niveles más elevados de proteína, 43% de inclusión dietaria, estimuló la actividad hepática de los enzimas FBPasa, GPT, G6PDH, HOAD y ACoAT, generando diferencias significativas, independientemente del nivel de carbohidratos o lípidos. Por otro lado, los resultados revelaron que un mayor contenido en carbohidratos dietarios, con independencia del contenido en proteína, indujo niveles de actividad hepática más elevados en los enzimas FBPasa, GK y GPT. Finalmente, sólo en el caso del enzima ACoAT, la interacción entre el nivel de proteína y carbohidratos o lípidos reflejó efectos significativos sobre su actividad, presentándose los valores más elevados en el hígado de aquellos dentones alimentados con la dieta P<sub>43</sub>C<sub>28</sub>. No se detectó actividad HK-IV en el hígado de los dentones analizados.

#### *Músculo blanco*

En la Tabla IV-30 se recogen las actividades específicas de los enzimas del metabolismo intermediario en músculo blanco de dentón alimentado con distintos niveles de macronutrientes dietarios. Como se puede observar, la composición de las dietas empleadas en la alimentación de los distintos grupos de dentones, no generó en ningún caso cambios significativos en la actividad de los enzimas glucolíticos HK y PK del músculo blanco. En cuanto a la consideración del efecto aislado del nivel de proteína incluido en las dietas, excepto en el caso del enzima GDH donde las actividades más elevadas se registraron en aquellos animales alimentados con un nivel proteico del 38%, para los enzimas GOT, CS y ACoAT, niveles de un 43% de proteína dietaria estimularon significativamente la actividad. Por su parte, altos niveles de carbohidratos dietarios (28%), indujeron un aumento de las actividades FBPasa, GK y G6PDH en el músculo blanco de dentón.

Tabla IV-29. Actividad específica de enzimas relacionados con el metabolismo intermediario en hígado de dentón alimentado con distintos niveles de macronutrientes. Los datos se expresan como mU mg proteína<sup>-1</sup>.

<b>Dieta</b>	<b>HK</b>	<b>HK-IV</b>	<b>PK</b>	<b>FBPasa</b>	<b>GK</b>	<b>GDH</b>	<b>GOT</b>	<b>GPT</b>	<b>CS</b>	<b>G6PDH</b>	<b>EM</b>	<b>HOAD</b>	<b>ACoAT</b>	<b><math>\beta</math>-OHBDH</b>
<b>P<sub>43</sub>C<sub>28</sub></b>	2.15 ± 0.11	No detectada	26.34 ± 1.84	54.63 ± 2.99	23.20 ± 1.81	155.6 ± 8.6	502.3 ± 28.2	323.3 ± 10.9	21.07 ± 1.19	63.63 ± 2.24	9.41 ± 0.62	22.39 ± 1.24	46.72 ± 2.42	3.54 ± 0.34
<b>P<sub>43</sub>L<sub>24</sub></b>	2.06 ± 0.16	"	29.66 ± 2.16	47.53 ± 2.32	17.20 ± 1.07	141.1 ± 3.7	487.0 ± 20.9	284.2 ± 14.2	19.63 ± 0.59	60.45 ± 1.45	7.80 ± 0.63	21.42 ± 1.02	32.22 ± 1.95	3.40 ± 0.24
<b>P<sub>38</sub>C<sub>28</sub></b>	2.21 ± 0.16	"	27.82 ± 1.46	43.06 ± 1.74	20.84 ± 1.27	149.7 ± 3.9	480.7 ± 22.0	285.8 ± 10.4	20.52 ± 0.70	54.16 ± 2.10	8.10 ± 0.69	19.87 ± 1.51	31.31 ± 3.16	2.65 ± 0.18
<b>P<sub>38</sub>L<sub>24</sub></b>	2.07 ± 0.14	"	29.79 ± 1.79	38.93 ± 3.00	17.99 ± 1.19	155.3 ± 8.9	466.7 ± 23.3	262.1 ± 12.0	22.57 ± 0.91	55.08 ± 5.02	8.06 ± 0.40	18.25 ± 1.16	33.12 ± 3.30	3.32 ± 0.29
<b>P</b>	n.s.		n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	*	n.s.	*	*	n.s.
<b>C-L</b>	n.s.		n.s.	*	**	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>P×C-L</b>	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.

Los resultados son media ± E.S. (n = 9). En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde los asteriscos indican diferencias significativas, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.

Finalmente, la interacción entre los distintos macronutrientes dietarios generó diferencias significativas en la actividad muscular de los enzimas GDH, GPT, CS y HOAD. En este sentido, los mayores niveles de actividad para GDH y CS se observaron en aquellos grupos alimentados con la dieta P<sub>38</sub>C<sub>28</sub>. En el caso del enzima GPT, la actividad más baja fue la observada para el tratamiento dietario P<sub>38</sub>L<sub>24</sub>. Por su parte, la actividad HOAD más elevada perteneció al grupo alimentado con la dieta P<sub>43</sub>L<sub>24</sub>. No se detectó actividad HK-IV ni β-OHBDH en el músculo blanco de los juveniles de dentón analizados.

### *Corazón*

La Tabla IV-31 refleja los efectos de los distintos tratamientos dietarios sobre las actividades específicas de los enzimas del metabolismo intermediario en el corazón de los dentones analizados. Los resultados muestran que la alimentación del dentón con las distintas dietas experimentales utilizadas en el presente ensayo, no generó ningún cambio en la actividad coronaria de los enzimas HK, FBPassa, GOT y CS. Sin embargo, el nivel de proteína empleado reflejó un claro efecto sobre la actividad de los enzimas HK-IV, PK, GK, GDH, GPT, EM, HOAD, ACoAT y β-OHBDH en corazón. Así, a excepción de β-OHBDH, en todas ellas la actividad fue estimulada cuando los animales fueron alimentados con el menor nivel de proteína dietaria (38%). Por su parte, el nivel de carbohidratos o lípidos también provocó cambios de actividad coronaria de los enzimas GK, GDH, G6PDH y β-OHBDH, de tal forma que los mayores niveles de actividad fueron aquellos generados por los tratamientos dietarios con mayor nivel de lípidos dietarios, a excepción de nuevo del enzima β-OHBDH cuya actividad más elevada perteneció a las dietas con mayor contenido en carbohidratos. Por último, los resultados muestran que la actividad enzimática GK, GDH y G6PDH en corazón, dependieron de la combinación realizada entre los distintos macronutrientes, encontrando en todos los casos que los niveles más bajos de actividad pertenecieron a aquellos dentones alimentados con la dieta P<sub>43</sub>C<sub>28</sub>.

Tabla IV-30. Actividad específica de enzimas relacionados con el metabolismo intermediario en músculo blanco de dentón alimentado con distintos niveles de macronutrientes. Los datos se expresan como mU mg proteína<sup>-1</sup>.

Dieta	HK	HK-IV	PK	FBPasa	GK	GDH	GOT	GPT	CS	G6PDH	EM	HOAD	ACoAT	$\beta$ -OHBDH
<b>P<sub>43</sub>C<sub>28</sub></b>	0.83 ± 0.07	No detectada	4570.7 ± 344.7	12.71 ± 1.00	180.4 ± 12.8	7.69 ± 0.33	163.7 ± 7.1	10.83 ± 0.53	21.59 ± 1.16	0.85 ± 0.13	9.76 ± 0.55	3.37 ± 0.18	2.48 ± 0.09	No detectada
<b>P<sub>43</sub>L<sub>24</sub></b>	1.05 ± 0.09	"	3847.9 ± 309.9	10.30 ± 0.50	176.4 ± 10.6	8.69 ± 0.32	149.9 ± 8.0	12.79 ± 1.16	25.85 ± 1.43	0.76 ± 0.05	9.82 ± 0.52	4.33 ± 0.11	2.69 ± 0.09	"
<b>P<sub>38</sub>C<sub>28</sub></b>	0.79 ± 0.07	"	3661.2 ± 244.1	11.89 ± 0.98	215.8 ± 19.2	11.18 ± 0.58	137.4 ± 9.3	12.80 ± 0.96	20.24 ± 0.75	1.00 ± 0.10	9.40 ± 0.41	3.98 ± 0.25	2.23 ± 0.16	"
<b>P<sub>38</sub>L<sub>24</sub></b>	0.84 ± 0.06	"	4069.7 ± 206.4	11.10 ± 0.17	206.0 ± 18.6	8.54 ± 0.46	126.9 ± 2.3	9.82 ± 0.30	19.18 ± 0.93	0.62 ± 0.05	8.21 ± 0.28	3.88 ± 0.24	2.04 ± 0.16	"
<b>P</b>	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	**	**	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	**	**
<b>C-L</b>	n.s.		n.s.	*	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>P×C-L</b>	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.	***	n.s.	**	*	n.s.	n.s.	*	*	n.s.

Los resultados son media ± E.S. (n = 9). En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde los asteriscos indican diferencias significativas, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.



Tabla IV-31. Actividad específica de enzimas relacionados con el metabolismo intermediario en corazón de dentón alimentado con distintos niveles de macronutrientes. Los datos se expresan como mU mg proteína<sup>-1</sup>.

<b>Dieta</b>	<b>HK</b>	<b>HK-IV</b>	<b>PK</b>	<b>FBPasa</b>	<b>GK</b>	<b>GDH</b>	<b>GOT</b>	<b>GPT</b>	<b>CS</b>	<b>G6PDH</b>	<b>EM</b>	<b>HOAD</b>	<b>ACoAT</b>	<b>β-OHBDH</b>
<b>P<sub>43</sub>C<sub>28</sub></b>	2.76	0.99	898.7	1.11	52.35	157.2	938.2	32.10	130.2	1.00	58.39	51.65	32.39	2.68
	±0.71	±0.14	±29.2	±0.46	±1.27	±0.9	±27.6	±0.64	±3.1	±0.01	±1.11	±3.65	±3.37	±0.18
<b>P<sub>43</sub>L<sub>24</sub></b>	2.44	0.86	1044.5	1.94	69.47	194.3	977.0	37.49	132.2	1.89	59.62	48.47	32.07	1.62
	±0.17	±0.35	±76.6	±0.51	±0.65	±2.0	±17.5	±0.56	±3.5	±0.02	±2.05	±3.60	±0.89	±0.04
<b>P<sub>38</sub>C<sub>28</sub></b>	2.42	1.48	1185.4	2.10	61.10	239.7	1149.3	39.07	149.9	1.28	76.72	71.07	39.65	2.13
	±0.17	±0.21	±73.3	±0.08	±0.79	±2.4	±68.4	±1.76	±10.3	±0.14	±4.79	±6.73	±0.13	±0.16
<b>P<sub>38</sub>L<sub>24</sub></b>	3.58	1.57	1140.8	2.60	86.14	328.2	1017.8	43.27	136.2	1.80	71.15	70.46	36.25	1.21
	±0.13	±0.03	±75.9	±0.34	±1.17	±8.1	±83.1	±3.66	±6.9	±0.03	±2.72	±2.11	±0.31	±0.06
<b>P</b>	n.s.	*	*	n.s.	***	***	n.s.	*	n.s.	n.s.	**	**	*	**
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***	***	n.s.	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.	***
<b>P×C-L</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	***	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	***	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Los resultados son media ± E.S. (n = 9). En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde los asteriscos indican diferencias significativas, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.

## 3.3.9. Estado redox

*Hígado*

Los resultados reflejados en la Tabla IV-32, referentes a las actividades específicas de los enzimas antioxidantes hepáticos muestran que un mayor nivel de lípidos dietarios generó una mayor actividad significativa de las actividades SOD y GPX hepáticas. Por otra parte, la interacción de los distintos macronutrientes ejerció influencias significativas sobre las actividades SOD y CAT, de tal forma que la dieta P<sub>43</sub>L<sub>24</sub> exhibió las actividades más elevadas de SOD y más bajas de CAT en el hígado de los dentones alimentados con este tratamiento.

Tabla IV-32. Actividad específica de enzimas antioxidantes en hígado de dentón alimentado con distintos niveles de macronutrientes.

Dieta	SOD	CAT	GPX	GR
	(U mg proteína <sup>-1</sup> )	(U mg proteína <sup>-1</sup> )	(mU mg proteína <sup>-1</sup> )	(mU mg proteína <sup>-1</sup> )
<b>P<sub>43</sub>C<sub>28</sub></b>	97.7 ± 7.1	226.7 ± 5.3	80.72 ± 1.60	6.68 ± 0.30
<b>P<sub>43</sub>L<sub>24</sub></b>	141.9 ± 7.7	190.4 ± 9.8	92.10 ± 5.60	6.71 ± 0.42
<b>P<sub>38</sub>C<sub>28</sub></b>	115.4 ± 5.2	213.9 ± 5.2	88.14 ± 3.04	6.45 ± 0.35
<b>P<sub>38</sub>L<sub>24</sub></b>	112.6 ± 6.5	223.5 ± 9.6	106.49 ± 7.98	6.57 ± 0.38
<b>P</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>C-L</b>	**	n.s.	**	n.s.
<b>P×C-L</b>	**	**	n.s.	n.s.

Los resultados son media ± E.S. (n = 9). En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde los asteriscos indican diferencias significativas, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.

En ningún caso se observaron efectos significativos sobre los niveles de MDA hepático, indicativos de peroxidación lipídica, producidos por las distintas combinaciones de macronutrientes en las dietas experimentales (Tabla IV-33). Por su parte, el daño oxidativo a proteínas sólo se vio influenciado por los niveles de proteínas en las dietas, siendo significativamente más elevados para una inclusión del 43% de proteína dietaria.

Tabla IV-33. Indicadores de daño oxidativo a lípidos y proteínas hepáticas de dentón alimentado con distintos niveles de macronutrientes.

<b>Dieta</b>	<b>Peroxidación lipídica</b> (nmol MDA g tejido <sup>-1</sup> )	<b>Grupos carbonilo</b> (nmol C=O mg proteína <sup>-1</sup> )
<b>P<sub>43</sub>C<sub>28</sub></b>	39.06 ± 1.44	2.37 ± 0.20
<b>P<sub>43</sub>L<sub>24</sub></b>	43.56 ± 2.40	2.08 ± 0.26
<b>P<sub>38</sub>C<sub>28</sub></b>	43.67 ± 1.66	1.25 ± 0.20
<b>P<sub>38</sub>L<sub>24</sub></b>	44.75 ± 0.61	1.79 ± 0.19
<b>P</b>	n.s.	**
<b>C-L</b>	n.s.	n.s.
<b>P×C-L</b>	n.s.	n.s.

Los resultados son media ± E.S. (n = 9). En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde los asteriscos indican diferencias significativas, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.

### *Músculo blanco*

Los resultados de las actividades específicas de los enzimas antioxidantes y del daño oxidativo a lípidos en músculo blanco de dentón alimentados con los distintos tratamientos dietarios se encuentran reflejados en la Tabla IV-34. Como se puede observar, las actividades enzimáticas SOD y GPX no se vieron en ningún caso significativamente influenciadas por la composición de las dietas. Además, no se detectó actividad CAT en el músculo blanco de los dentones analizados. No obstante, la actividad GR exhibió diferencias entre tratamientos aunque sólo como consecuencia de la interacción entre los distintos macronutrientes. En este sentido, la mayor actividad GR fue aquella detectada en el músculo blanco de los dentones alimentados con la dieta P<sub>38</sub>L<sub>24</sub>. En cuanto a la peroxidación lipídica, únicamente el nivel de lípidos o carbohidratos afectó a los valores de este indicador, de forma que aquellas dietas con mayor nivel de lípidos (24%) promovieron los valores más elevados de peroxidación lipídica en músculo blanco.

Tabla IV-34. Actividad específica de enzimas antioxidantes e indicador daño oxidativo a lípidos en músculo blanco de dentón alimentado con distintos niveles de macronutrientes.

<b>Dieta</b>	<b>SOD</b> (U mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>CAT</b> (U mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>GPX</b> (mU mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>GR</b> (mU mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>Peroxidación lipídica</b> (nmol MDA g tejido <sup>-1</sup> )
<b>P<sub>43</sub>C<sub>28</sub></b>	36.81 ± 2.14	No detectada	6.68 ± 0.08	0.93 ± 0.10	26.88 ± 2.10
<b>P<sub>43</sub>L<sub>24</sub></b>	34.32 ± 2.36	"	6.75 ± 0.30	0.87 ± 0.08	32.80 ± 2.46
<b>P<sub>38</sub>C<sub>28</sub></b>	33.75 ± 2.00	"	6.49 ± 0.27	0.65 ± 0.06	30.63 ± 1.81
<b>P<sub>38</sub>L<sub>24</sub></b>	32.99 ± 1.93	"	6.13 ± 0.27	1.34 ± 0.19	36.75 ± 2.35
<b>P</b>	n.s.		n.s.	n.s.	n.s.
<b>C-L</b>	n.s.		n.s.	n.s.	*
<b>P×C-L</b>	n.s.		n.s.	**	n.s.

Los resultados son media ± E.S. (n = 9). En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde los asteriscos indican diferencias significativas, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.

### Corazón

Los resultados de actividad específica de los enzimas antioxidantes coronarios (Tabla IV-35) reflejan que, a pesar de que no se observaron diferencias significativas promovidas por la interacción de los distintos niveles de macronutrientes, cuando se consideran aisladamente cada uno de ellos se ponen de manifiesto cambios en las actividades enzimáticas. Así, el nivel proteico 38% indujo una estimulación de la actividad de los enzimas CAT y GPX, aunque no de la actividad SOD y GR en corazón. En cuanto al contenido de los dos macronutrientes restantes, únicamente en el enzima SOD se observó una mayor actividad en aquellos corazones de dentones alimentados con los niveles más elevados de carbohidratos.

En relación con el daño oxidativo en corazón, los resultados reflejados en la Tabla IV-36 muestran que en ningún caso los niveles de peroxidación lipídica estuvieron afectados por la composición dietaria. Sin embargo, el daño oxidativo a proteínas se vio influenciado tanto por los niveles proteicos como por los de lípidos o carbohidratos, aunque no por la interacción entre ellos. Así, el contenido en grupos carbonilo fue significativamente superior en los corazones de dentones alimentados con niveles de proteína del 43%. Además, un mayor contenido en lípidos resultó igualmente, en un mayor daño oxidativo proteico.

Tabla IV-35. Actividad específica de enzimas antioxidantes en corazón de dentón alimentado con distintos niveles de macronutrientes.

Dieta	SOD	CAT	GPX	GR
	(U mg proteína <sup>-1</sup> )	(U mg proteína <sup>-1</sup> )	(mU mg proteína <sup>-1</sup> )	(mU mg proteína <sup>-1</sup> )
<b>P<sub>43</sub>C<sub>28</sub></b>	193.1 ± 19.3	5.91 ± 0.05	57.88 ± 3.13	6.34 ± 0.40
<b>P<sub>43</sub>L<sub>24</sub></b>	152.7 ± 2.9	5.55 ± 0.65	53.25 ± 3.47	6.05 ± 0.37
<b>P<sub>38</sub>C<sub>28</sub></b>	229.1 ± 10.8	8.53 ± 0.41	69.89 ± 1.91	6.92 ± 0.31
<b>P<sub>38</sub>L<sub>24</sub></b>	150.2 ± 1.7	8.61 ± 0.37	74.51 ± 2.33	7.00 ± 0.21
<b>P</b>	n.s.	***	***	n.s.
<b>C-L</b>	**	n.s.	n.s.	n.s.
<b>P×C-L</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Los resultados son media ± E.S. (n = 3). En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde los asteriscos indican diferencias significativas, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.

Tabla IV-36. Indicadores de daño oxidativo a lípidos y proteínas en corazón de dentón alimentado con distintos niveles de macronutrientes.

Dieta	Peroxidación lipídica	Grupos carbonilo
	(nmol MDA g tejido <sup>-1</sup> )	(nmol C=O mg proteína <sup>-1</sup> )
<b>P<sub>43</sub>C<sub>28</sub></b>	27.21 ± 2.91	2.26 ± 0.21
<b>P<sub>43</sub>L<sub>24</sub></b>	29.61 ± 4.29	3.17 ± 0.20
<b>P<sub>38</sub>C<sub>28</sub></b>	33.24 ± 5.39	1.56 ± 0.24
<b>P<sub>38</sub>L<sub>24</sub></b>	31.97 ± 3.31	1.93 ± 0.36
<b>P</b>	n.s.	**
<b>C-L</b>	n.s.	*
<b>P×C-L</b>	n.s.	n.s.

Los resultados son media ± E.S. (n = 3). En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde los asteriscos indican diferencias significativas, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.

*Hemolisado*

En la Tabla IV-37 se muestran los resultados de actividad específica de los enzimas antioxidantes y el daño oxidativo en hemolisado de dentón alimentado con distintos niveles de macronutrientes dietarios. La utilización de distintos niveles de proteína reflejó un claro efecto sobre el enzima GPX, cuya actividad más elevada fue promovida por un 38% de proteína dietaria. En cuanto al efecto del nivel de carbohidratos o lípidos, no se observaron cambios en la actividad de ninguno de los enzimas antioxidantes. Por su parte, los mayores niveles de MDA fueron observados en los dentones alimentados con mayor nivel de lípidos dietarios. Respecto a la influencia de la combinación de los distintos macronutrientes, sólo el enzima SOD manifestó diferencias significativas, de modo que los valores más altos correspondieron al tratamiento dietario P<sub>38</sub>C<sub>28</sub>.

Tabla IV-37. Actividad específica de enzimas antioxidantes e indicador de daño oxidativo a lípidos en hemolisado de dentón alimentado con distintos niveles de macronutrientes.

<b>Dieta</b>	<b>SOD</b> (U mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>CAT</b> (U mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>GPX</b> (mU mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>GR</b> (mU mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>Peroxidación lipídica</b> (nmol MDA g tejido <sup>-1</sup> )
<b>P<sub>43</sub>C<sub>28</sub></b>	9.48 ± 1.00	115.5 ± 5.6	398.7 ± 16.2	5.13 ± 0.53	19.74 ± 1.05
<b>P<sub>43</sub>L<sub>24</sub></b>	11.71 ± 1.09	98.6 ± 4.8	405.9 ± 10.2	3.21 ± 0.29	20.43 ± 1.01
<b>P<sub>38</sub>C<sub>28</sub></b>	16.07 ± 1.52	113.1 ± 5.7	447.7 ± 19.1	5.13 ± 0.64	17.84 ± 1.47
<b>P<sub>38</sub>L<sub>24</sub></b>	9.47 ± 0.48	121.8 ± 9.2	423.2 ± 12.2	5.07 ± 0.47	22.56 ± 1.42
<b>P</b>	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.
<b>C-L</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*
<b>P×C-L</b>	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Los resultados son media ± E.S. (n = 9). En la mitad inferior de la tabla se indican los resultados para ANOVA de dos vías donde los asteriscos indican diferencias significativas, siendo \* P<0.05, \*\* P<0.01 y \*\*\* P<0.001. Las siglas n.s. indican diferencias no significativas.

### 3.3.10. Patrón isoenzimático de la SOD

Los resultados obtenidos tras la determinación del patrón isoenzimático de la SOD en hígado, músculo blanco, corazón y hemolisado de dentón, se muestran en la Figura IV-14. Como se puede observar, tanto en hígado como en corazón existen dos isoenzimas SOD constitutivas, CuZn-SOD I y Mn-SOD, éste último puesto de manifiesto tras inhibición con cianuro. Este patrón está presente en todos los grupos experimentales sin existir distinción entre dietas.

En el caso del músculo blanco se observan, al igual que en el caso de los anteriores tejidos, dos isoenzimas SOD constitutivas. No obstante, en las dietas P<sub>43</sub>C<sub>28</sub> y P<sub>43</sub>L<sub>24</sub> se pueden observar la aparición de un tercer isoenzima SOD, en este caso regulable, CuZn-SOD II. Finalmente, en hemolisado y para todos los tratamientos dietarios se observa una única forma isoenzimática SOD, CuZn-SOD.

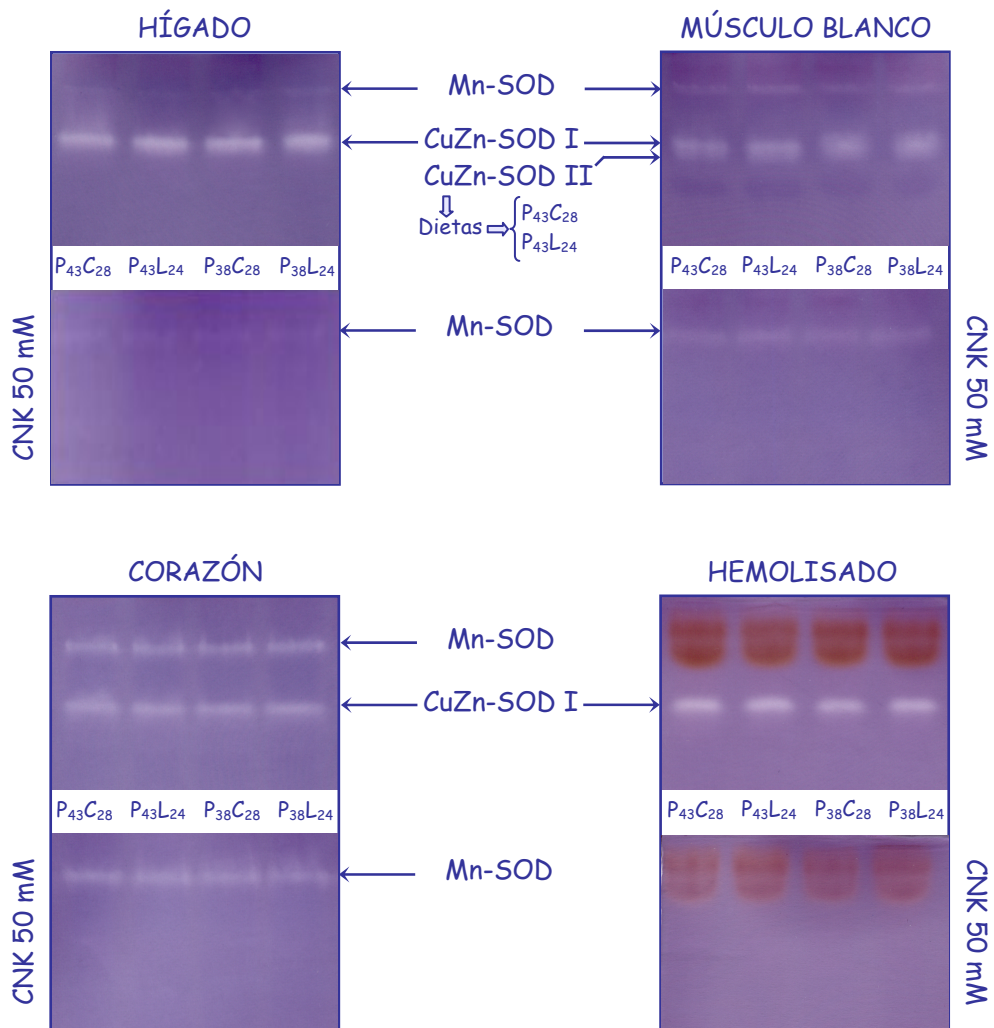


Figura IV-14. Patrón isoenzimático de la SOD generado por las diferentes dietas experimentales, en los tejidos de hígado, músculo blanco, corazón y hemolisado de dentón. La fotografía inferior en cada uno de los tejidos correspondería al gel incubado para inhibición en solución 50 mM CNK.

### 3.4. DISCUSIÓN

La información sobre las necesidades nutricionales de los principales componentes dietarios es un requisito fundamental para la formulación de alimentos económicos y equilibrados para la acuicultura, de forma que se consiga optimizar la rentabilidad de la producción. El conocimiento del nivel óptimo de proteína y de los efectos de ahorro proteico de nutrientes no proteicos, como carbohidratos o lípidos, puede ser usado efectivamente para reducir costes alimenticios. En el caso del dentón, existen numerosos estudios cuyo principal objetivo ha sido establecer un adecuado balance de macronutrientes. No obstante, en la mayoría de ellos se han empleado niveles “discretos” de lípidos y carbohidratos. Por esta razón, en el presente estudio se pretende establecer el límite superior de utilización de carbohidratos y lípidos, así como la determinación del macronutriente más adecuado para la sustitución parcial de la proteína como principal fuente energética. En este sentido, los resultados obtenidos en el presente ensayo apoyarían la posibilidad de disminuir el contenido proteico anteriormente establecido en otros estudios en torno al 43% (Company et al., 1999a; Espinós et al., 2003; Skalli et al., 2004) hasta un 38% dietario, sin que se vean afectados ninguno de los parámetros de crecimiento. No obstante, esta afirmación ha de ser considerada con suma precaución, ya que, en anteriores estudios, Skalli et al. (2004) concluyeron que niveles de un 38% de proteína eran insuficientes para el correcto crecimiento de animales del mismo tamaño inicial de esta especie. De hecho, en general, los valores obtenidos por estos autores para la TCI, entre 1.05% y 1.45%, fue notablemente superior a la observada en el presente ensayo. Sin embargo, estas diferencias en los valores de TCI, así como las opuestas conclusiones sobre el nivel mínimo de proteína necesaria para el óptimo crecimiento del dentón, podrían justificarse por las distintas condiciones experimentales en las que se desarrollaron ambos experimentos. Así, la temperatura es un factor fundamental del crecimiento en peces y, mientras que Skalli et al. (2004) mantuvieron a los animales con temperaturas que oscilaron entre 24 °C y 27 °C, el presente ensayo se realizó a una temperatura media de 18 °C. La temperatura más fría de este experimento produciría un crecimiento más lento en los animales y, como consecuencia, las necesidades de proteína para dicho crecimiento se verían reducidas (Tacon y Cowey, 1985), por lo que un nivel proteico del 38% dietario sería suficiente para cubrir dichas necesidades bajo estas condiciones.



Adicionalmente, en otros estudios realizados en dentón (100 g peso medio inicial) con una temperatura media del agua de 21 °C, y niveles de proteína dietaria superiores al 50%, los valores de TCI estuvieron comprendidos entre 0.58% y 0.72% (Skalli, 2001), siendo por tanto similares e incluso ligeramente inferiores a los del presente ensayo. Por otra parte, los resultados obtenidos muestran que, indistintamente, el dentón es capaz de utilizar eficazmente tanto los carbohidratos como los lípidos para obtener la energía necesaria para su desarrollo, así como para compensar efectivamente el “vacío” energético generado al disminuir el contenido en proteína en el alimento para dentón. En este sentido, distintos estudios previos han demostrado la capacidad del dentón para utilizar eficientemente los lípidos (Tibaldi et al., 1996; Company et al., 1999a; Jover et al., 1999; Espinós et al., 2003; Skalli et al., 2004) o los carbohidratos (Skalli, 2001) para sustituir parcialmente la proteína.

En cuanto a la ingesta, es un hecho demostrado que, cuando los peces son alimentados a saciedad, éstos son capaces de regularla en función de sus necesidades. Generalmente, esta regulación se establece en base a las propiedades organolépticas o la deficiencia de energía digestible o de determinados macro o micronutrientes (Santinha et al., 1999; Lupatsch et al., 2001; Yamamoto et al., 2002; Vivas et al., 2003; Andrew et al., 2004; Atienza et al., 2004; Boujard et al., 2004; Rubio et al., 2005). Si se considera el hecho de que todas las dietas contenían el mismo nivel de energía digestible y que los resultados en los CDA determinados no reflejaron efectos significativos de los distintos niveles de carbohidratos o lípidos, los dentones de los tratamientos P<sub>43</sub>C<sub>28</sub> y P<sub>38</sub>C<sub>28</sub> podrían haber aumentado sus niveles de ingesta diaria de alimento como consecuencia de las propiedades organolépticas generadas por el mayor contenido en carbohidratos. En cualquier caso y aunque no se obtuvieron efectos significativos entre los distintos tratamientos, parece existir una ligera tendencia de incremento en la TCI en los grupos P<sub>43</sub>C<sub>28</sub> y P<sub>38</sub>C<sub>28</sub>. No obstante, estos resultados son contrarios a los observados para otras especies, cuya ingesta se vio reducida cuando el contenido en carbohidratos se incrementaba en las dietas (Sanz et al., 1993; Lupatsch et al., 2001). De acuerdo con los resultados del presente estudio y con los obtenidos en otros realizados en dorada (Santinha et al., 1999), cuando los peces se alimentan a saciedad, el crecimiento podría no depender únicamente de la composición dietaria, sino también de la habilidad de los peces para regular su consumo, por lo que conocer la influencia de los distintos factores que determinan este hecho es fundamental para establecer una adecuada alimentación

en acuicultura. Por otra parte, si se comparan los resultados obtenidos en el IC del presente estudio (0.53-0.66), se puede comprobar que los valores observados, aunque ligeramente inferiores, son muy próximos al rango (0.66-0.86) de aquellos reportados por otros autores para dentones de tamaño similar, ensayando dietas experimentales con mayor contenido en proteína (Skalli et al., 2004).

Respecto a la utilización nutritiva de la proteína, los resultados indican que los valores del VPP fueron significativamente superiores en los tratamientos con mayor contenido en lípidos dietarios, mientras que el índice CEC mostró una ligera tendencia a incrementarse cuando el contenido en lípidos dietarios era mayor. En base a estos datos, aparentemente, los lípidos podrían jugar un papel más importante en el ahorro proteico que los carbohidratos. Este ahorro favorecido por los lípidos ha sido ampliamente reportado en estudios previos para dentón (Company et al., 1999a; Skalli et al., 2004) y otras especies, como la dorada (García-Alcázar et al., 1995; Santinha et al., 1999; Vergara et al., 1999) o la lubina (Pérez et al., 1997; Dias et al., 1998, 2003; Lanari et al., 1999). No obstante, este hecho no descartaría la importancia del empleo de un adecuado balance entre lípidos y carbohidratos, empleando estos últimos como fuente eficaz para un posible reemplazamiento parcial de la proteína. En este sentido, y como se vio en el ensayo anterior, la inclusión de carbohidratos por encima del 24% en la dieta, sería ineficaz para mejorar la utilización del alimento y de sus nutrientes para el crecimiento, por lo que la tendencia observada en el presente experimento, de un mejor empleo de los lípidos frente al de los carbohidratos podría en parte estar justificada por este hecho. En cualquier caso, los valores de CEC y VPP obtenidos para los distintos tratamientos dietarios, 1.36-1.62 y 22.91%-34.29%, respectivamente, se encuentran dentro del rango observado previamente por Skalli et al. (2004) para dentones con un tamaño inicial similar, entre 1.26 y 1.98 para el CEC y 24.51% y 31.07% para el VPP.

Aunque numerosos autores han indicado que un incremento en el contenido dietario de carbohidratos o lípidos puede tener consecuencias directas sobre la digestibilidad del alimento, así como sobre cada uno de los nutrientes que lo constituyen (Berge y Storebakken, 1991; Johnsen et al., 1993; Aksnes, 1995; Hemre et al., 1995; Grisdale-Helland y Helland, 1997, 1998; Fernández et al., 1998; Storebakken et al., 1998; Stone et al., 2003; Fountoulaki et al., 2005; Krogdahl et al., 2005), en el presente ensayo, y como adelantábamos anteriormente, este hecho no parece haber ejercido ninguna

influencia sobre los CDA determinados. No obstante, los resultados muestran que el nivel de inclusión de proteína dietaria afectaría los CDA lipídico y proteico. Así, un incremento en el contenido proteico produciría una mejora en la digestibilidad de los lípidos y las proteínas. Probablemente, y como ya indicaron anteriormente otros autores, la mejora en la digestibilidad proteica podría estar justificada por varios motivos. La explicación más común ofrecida en bibliografía ha sido que la proporción de nitrógeno metabólico endógeno desciende en las heces cuando se incrementa el contenido proteico en la dieta (Nose, 1967; Ogino y Chen, 1973; Jauncey, 1982). Sin embargo, también es posible que un mayor nivel de proteína dietario produzca una adaptación de los enzimas digestivos, que contribuya al incremento del CDA proteico (Kawai e Ikeda, 1972). Similares resultados fueron observados previamente en otras especies (De Silva y Perera, 1984; Machielis y Henken, 1985; Hajen et al., 1993; Fernández et al., 1998; Fountoulaki et al., 2005). En cualquier caso, tanto la mejora en la digestibilidad proteica como lipídica, producida por el aumento en el contenido de proteína dietaria, podría ser probablemente consecuencia directa de las proporciones relativas de carbohidratos o lípidos, indistintamente, utilizados para establecer un adecuado balance energético en las dietas. No obstante, el mecanismo por el cual un mayor contenido proteico favorece la digestibilidad lipídica no se encuentra reflejado en resultados de estudios previos, al menos para nuestro conocimiento, por lo que este hecho podría ser considerado en experimentos futuros. Por otra parte, los CDA determinados en el presente ensayo, se encuentran en el mismo rango de valores observados anteriormente en dentón, independientemente de la composición dietaria (Skalli, 2001).

A pesar del incremento en la digestibilidad de lípidos y proteínas al aumentar el contenido proteico en las dietas, así como del condicionamiento del VPP por el nivel de inclusión de lípidos en el alimento, la composición de los dentones analizados no reflejó ningún efecto significativo generado por los distintos tratamientos dietarios. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que distintas proporciones de macronutrientes en las dietas, dentro de límites dependientes de factores intra e interespecíficos, generan cambios en la composición proximal de los peces, ya sea por el mayor aporte de tales macronutrientes en el alimento, o por efectos de ahorro, principalmente de las proteínas por el resto de nutrientes (Lanari et al., 1999; Peres y Oliva-Teles, 1999b; De Silva et al., 2002; Lee et al., 2002a,b; Ruohonen et al., 2003; Boujard et al., 2004; Hatlen et al., 2005). No obstante, resultados similares a los del

presente estudio fueron encontrados por Dias et al. (1998) en lubina, donde los distintos tratamientos dietarios no generaron diferencias significativas en la composición corporal, aunque sí en la composición tisular. En este sentido, las lubinas alimentadas con menor contenido proteico reflejaron un menor contenido en lípidos hepáticos.

De igual modo, en este estudio, los dentones alimentados con un 38% de proteína dietaria presentaron un menor contenido en lípidos tanto a nivel hepático como muscular. Este hecho podría justificarse por dos motivos fundamentales. Así, y como es conocido, los peces tienden a utilizar la proteína como sustrato preferencial para la obtención de energía, por lo que un mayor aporte de este nutriente en la dieta podría producir un descenso en el uso de lípidos para este fin, con lo que éstos podrían acumularse a nivel tisular. Por otro lado, parte de los carbohidratos dietarios también dejarían de ser empleados para la obtención de energía, por lo que podrían ser desviados hacia las rutas lipogénicas. En este sentido, los resultados referentes a la actividad G6PDH en el hígado, principal enzima generador del NADPH necesario para la síntesis de lípidos, fue superior en aquellos grupos de dentones alimentados con el mayor nivel de proteína dietaria (43%), correspondiéndose por tanto con el acúmulo lipídico observado en hígado y músculo blanco (Figura IV-15, A y B) (Wang et al., 2005b).

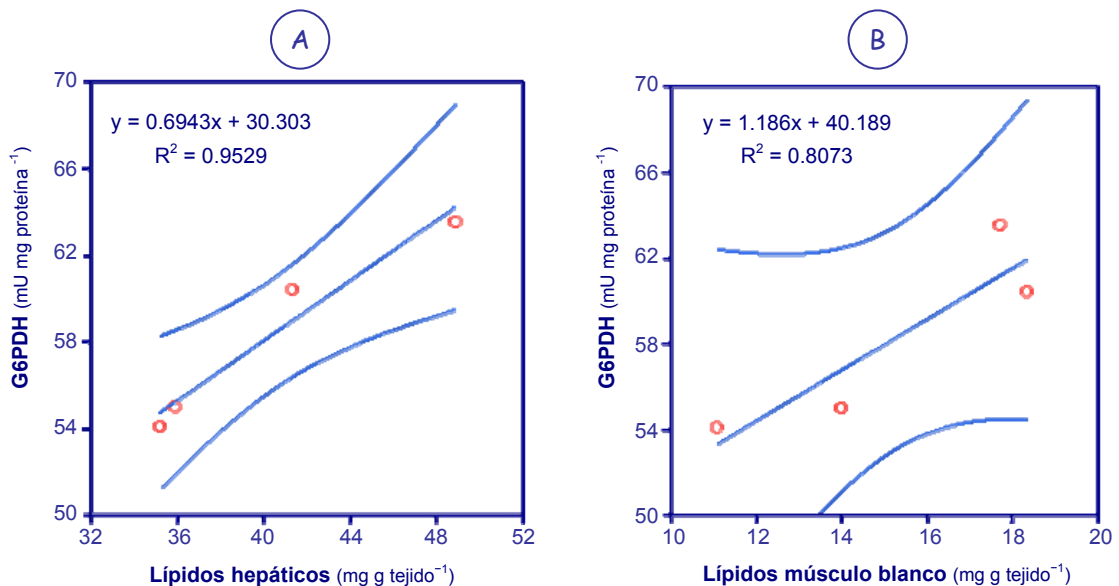


Figura IV-15. Regresión lineal entre las variables actividad G6PDH y contenido en lípidos hepáticos (A) o en músculo blanco (B) de dentón alimentados con dietas con distintos niveles de macronutrientes, donde se muestra el intervalo de predicción de la media con un 95% de confianza.

Se podría pensar que este hecho se correspondería con un aumento de la RHS de los dentones alimentados con las dietas P<sub>43</sub>C<sub>28</sub> y P<sub>43</sub>L<sub>24</sub>. Sin embargo, esto no fue así, y las únicas diferencias encontradas para la RHS vendrían producidas por el nivel de lípidos dietarios y no por la proteína. No obstante, los lípidos dietarios no indujeron cambios ni en el glucógeno, ni en los lípidos, así como tampoco en la proteína hepática, aunque estos datos no han sido incluidos en los resultados de la presente tesis. Por ello, el aumento en la RHS en estos tratamientos sólo podría ser atribuible a un mayor contenido en agua del hígado, aunque este hecho no puede ser afirmado con seguridad ya que la humedad hepática no fue determinada. Contrariamente a estas observaciones, otros autores obtuvieron que un aumento en el contenido en lípidos dietarios, no sólo induce un aumento en el nivel de lípidos hepáticos y musculares, sino también en la RHS (Lanari et al., 1999; Santinha et al., 1999; Lee et al., 2002b; Rueda-Jasso et al., 2004; Wang et al., 2005a). Por otra parte, es importante señalar que, al igual que en el ensayo anterior en el que se empleaban distintos tipos y niveles de carbohidratos, el mayor nivel de inclusión de este macronutriente no determinó aisladamente un incremento en el contenido de glucógeno hepático ni en la RHS, aunque sí cuando es considerada la interacción entre el nivel de proteína y carbohidratos/lípidos. De cualquier forma, los valores de RHS observados en este estudio están en el rango de valores reportados para esta especie (Skalli, 2001).

Por su parte, algunos parámetros sanguíneos, tales como el contenido en hemoglobina, hematocrito o la concentración de hemoglobina corpuscular media, son ampliamente usados como indicadores hematológicos de la respuesta de los peces ante diversos agentes estresantes, incluidos los nutricionales (Wendelaar-Bonga, 1997). Los resultados del presente estudio muestran que el suministro de dietas con distintas proporciones de los principales macronutrientes (proteína, lípidos y carbohidratos) no afecta en ningún caso a estos indicadores hematológicos. Similares resultados fueron obtenidos por Kumar et al. (2005) en juveniles de *Labeo rohita*, alimentados con distintos niveles de proteína y diferentes tipos y niveles de carbohidratos. Sin embargo, otros autores (Waagbø et al., 1994) sí observaron una relación negativa entre el contenido en hemoglobina y el empleo de niveles crecientes de carbohidratos en dietas para *Salmo salar*.

Respecto a la influencia del balance de macronutrientes dietarios sobre el metabolismo intermediario, los resultados obtenidos confirman que en dentón se cumple la tendencia general observada para la mayoría de las especies cuando son alimentadas con dietas ricas en proteínas. Así, a nivel hepático, un incremento en el contenido de proteína dietaria indujo mayor actividad GPT y FBPasa, indicando la posible utilización proteica para la obtención de glucosa mediante gluconeogénesis. De igual forma, un incremento en el nivel proteico de las dietas también indujo una elevación de los niveles de actividad hepática de los principales enzimas del catabolismo aminoacídico en especies como la anguila (Suárez et al., 1995), la trucha arcoiris (Sánchez-Muros et al., 1998) o la dorada (Metón et al., 1999). No obstante, contrariamente a las observaciones previas, Kirchner et al. (2003) no encontraron efecto alguno del nivel de proteína sobre trucha arcoiris. Además, al igual que se ha observado en el presente estudio, la capacidad gluconeogénica, indicada principalmente por la actividad FBPasa, suele verse incrementada paralelamente con el aumento de los enzimas implicados en el metabolismo aminoacídico, cuando el nivel de proteína dietaria es elevado (Figura IV-16, A y B). Este hecho ha sido obtenido en trucha arcoiris (De la Higuera y Cárdenas, 1985; Kirchner et al., 2003, 2005), anguila (Suárez et al., 1995, 2002) o dorada (Caseras et al., 2002).

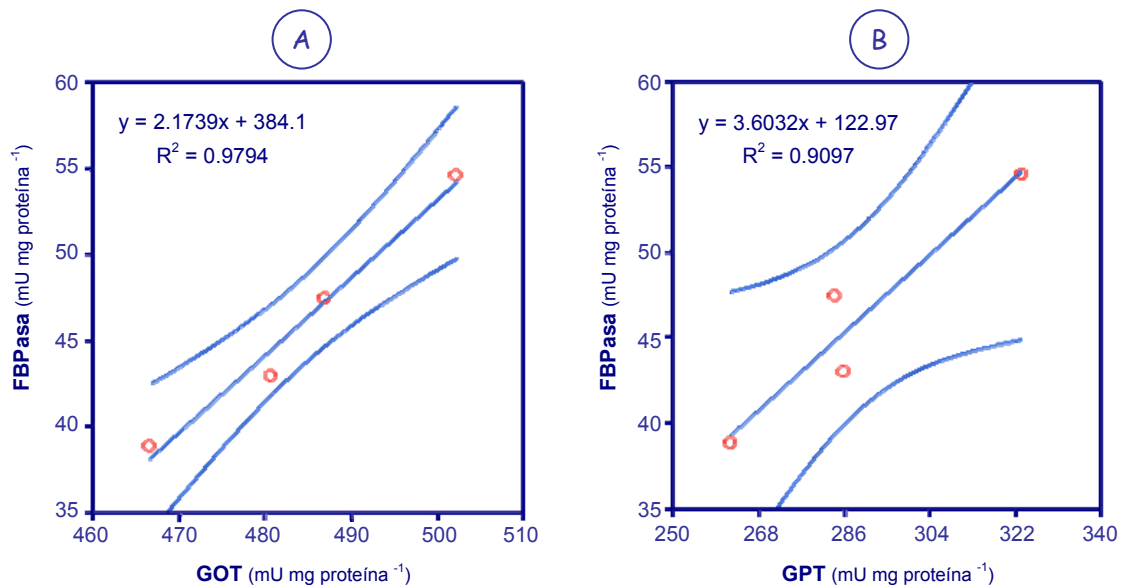


Figura IV-16. Regresión lineal entre las variables actividad FBPasa y GOT (A) o GPT (B) en hígado de dentón alimentados con dietas con distintos niveles de macronutrientes, donde se muestra el intervalo de predicción de la media con un 95% de confianza.

Por otra parte, mientras que distintos autores han observado una relación directa entre el contenido en proteína dietaria y los niveles de aminoácidos circulantes (Cowey et al., 1977; Ogata et al., 1985; Suárez et al., 1995; Sánchez-Muros et al., 1998; Yamamoto et al., 2000; Kirchner et al., 2005; Vieira et al., 2005), en el presente estudio no se ha encontrado dicha relación. No obstante, existe un pequeño pero significativo incremento en los niveles de proteína plasmática en aquellos grupos alimentados con dietas que contienen menores cantidades de proteína. Considerando que el contenido en metabolitos plasmáticos debe ser interpretado con suma precaución, ya que su alteración puede ser debida a diversas causas, tales como la generación vía metabólica, la introducción a través del alimento o bien por la captación de los distintos órganos, podríamos considerar que estos resultados pueden ser consecuencia de la mayor utilización de lípidos o carbohidratos como fuentes de energía, por lo que las proteínas estarían siendo transportadas para su acúmulo en distintos tejidos para el crecimiento. Aunque no existieron diferencias significativas en los índices de utilización del alimento, se puede observar una ligera tendencia a obtener mayores CEC en los tratamientos con menor contenido en proteína.

Por otra parte, algunos estudios han observado que el incremento en la gluconeogénesis producido por aquellas dietas con alto contenido proteico, conlleva un aumento en los niveles de glucosa plasmática (Kirchner et al., 2003; Bibiano Melo et al., 2006). Sin embargo, en el presente estudio no se encontró ningún efecto inducido por los distintos niveles de macronutrientes sobre la glucemia de los dentones. En base a los resultados, y como indicábamos antes, con la siempre presente precaución en la interpretación del flujo de metabolitos plasmáticos, se podría deducir que, al menos en parte, la glucosa producida por gluconeogénesis en los grupos alimentados con las dietas con un 43% de proteína, podría estar siendo utilizada en el propio hígado, sin llegar a ser vertida al torrente sanguíneo. En este sentido, el incremento en la disponibilidad de glucosa generada por el aumento en la síntesis *de novo* de la misma, junto con la glucosa aportada por el alimento, podría cubrir ampliamente las necesidades energéticas del animal, de forma que la glucosa “excedente” estaría siendo derivada hacia la vía de las pentosas fosfato, tal y como nos muestran los resultados de actividad incrementada para el enzima G6PDH hepático en las dietas P<sub>43</sub>C<sub>28</sub> y P<sub>43</sub>L<sub>24</sub>.

Como es sobradamente conocido, la G6PDH junto al EM, son los principales enzimas encargados de suministrar el NADPH necesario, tanto para la síntesis de lípidos, como para los mecanismos de defensa antioxidante, entre otras funciones. En este sentido, se podría suponer una actividad lipogénica aumentada en aquellos animales alimentados con mayores niveles de proteína, que tal y como comentábamos anteriormente, aunque no se refleja a nivel corporal, se confirmaría a nivel tisular, siendo el contenido lipídico, tanto del hígado como del músculo blanco, mayor para las dietas con un 43% de proteína (Figura IV-15, A y B). Aunque la mayoría de autores no encuentran esta relación entre proteína y síntesis de lípidos, Walton (1986) y Barroso et al. (1994) observaron que, en trucha arcoiris, la actividad hepática de los enzimas generadores de NADPH disminuía cuando se utilizaban dietas bajas en contenido proteico en la alimentación de los animales. No obstante, los resultados muestran que, a la vez que se sintetizan más lípidos, la ruta lipolítica en el hígado también se encuentra incrementada en las dietas con mayor nivel de proteína, lo que indicaría que el exceso lipídico generado es aprovechado por el organismo para la obtención de energía a través de la  $\beta$ -oxidación, tal como reflejaría la actividad HOAD hepática observada, principal enzima regulador de esta vía.

En cuanto a los niveles de lípidos circulantes, en general, nuestros resultados parecen estar de acuerdo con lo indicado por otros autores que observan una relación inversa entre estos metabolitos y el nivel de proteína dietaria (Vieira et al., 2005), si bien en nuestro caso sólo se obtuvieron diferencias significativas para el colesterol total y HDL. Así, la síntesis de lípidos observada a nivel hepático implicaría la captación de estos metabolitos desde el torrente sanguíneo, de forma que éstos quedarían “fijados” en el hígado sin volver a ser vertidos al plasma, tal y como muestran los resultados de la acumulación lipídica observada.

Por otra parte, aunque el debate sobre la importancia de los cuerpos cetónicos en el metabolismo de los peces continúa abierto, en base al conjunto de resultados obtenidos en este y en el resto de ensayos que componen la presente tesis se confirmaría que, en dentón, existe una importante actividad de los enzimas implicados en la cetogénesis y, que además, éstos se encuentran regulados por la situación nutricional de los peces. Así, los resultados de este estudio reflejan un aumento en la actividad ACoAT hepática en aquellos animales alimentados con mayor nivel de proteína. Este hecho podría



justificarse por un posible exceso en la producción de acetil-CoA, derivado tanto de la glucólisis, como del incremento observado en la  $\beta$ -oxidación del hígado de estos animales. Asimismo, en músculo blanco también se observó un aumento en la actividad ACoAT. Sin embargo, al contrario que en hígado, el papel de este enzima a nivel muscular sería la utilización de cuerpos cetónicos. En este sentido, la mayor cetogénesis observada en el hígado de los dentones alimentados con un 43% de proteína dietaria, se correspondería con el mayor uso obtenido en el músculo blanco de estos animales. Además, considerando que en este tejido no se produjeron cambios significativos como consecuencia de los mayores niveles de proteína en las vías glucolíticas y lipolíticas ni en la actividad GPT, que podría proporcionar piruvato para la producción de acetil-CoA, se podría admitir que el incremento observado en la actividad CS, enzima responsable de condensar acetil-CoA con oxalacetato para su entrada al ciclo de Krebs, podría ser consecuencia de aquel acetil-CoA introducido por los cuerpos cetónicos. Como consecuencia de este incremento, se podría haber generado la necesidad de suministrar mayores cantidades de oxalacetato, necesario para mantener la reacción catalizada por el enzima CS, lo cual justificaría el incremento paralelo observado en la actividad GOT, para estos tratamientos.

En cuanto al tejido cardíaco, la regulación metabólica observada se debió principalmente al efecto de la utilización de bajos niveles de inclusión de proteína en las dietas. Así, como consecuencia de la menor disponibilidad de sustratos aminoacídicos para la obtención de energía junto con el incremento en los niveles de lípidos y/o carbohidratos en las dietas para este fin, se produjo un incremento en la actividad de los principales enzimas de las vías glucolítica (HK-IV y PK) y lipolítica (HOAD) a nivel coronario. Como consecuencia de la lipólisis, una mayor cantidad de glicerol estaría siendo desviado para la obtención de glucosa. Asimismo, la mayor generación de acetil-CoA, procedente tanto de la glucólisis como de la lipólisis, requeriría de la producción de intermediarios que fueran capaces de mantener la actividad de los enzimas del ciclo de Krebs. En este sentido, el aumento en la actividad GPT observada en los animales alimentados con bajos niveles de proteína, podría suministrar oxalacetato a partir de piruvato, permitiendo la entrada del acetil-CoA al ciclo de Krebs. Además, durante este proceso se estarían generando grandes cantidades de alanina, y si bien parte de este aminoácido podría ser utilizado en la síntesis proteica, el resto precisaría ser eliminado del organismo mediante desaminación. Esta última teoría, podría confirmarse por el

aumento observado en la actividad GDH en el corazón de los animales alimentados con las dietas P<sub>38</sub>C<sub>28</sub> y P<sub>38</sub>L<sub>24</sub>.

En lo que respecta a la inclusión de distintos niveles de lípidos o carbohidratos, diversos trabajos reportan la existencia de cambios metabólicos inducidos por las diferentes situaciones nutricionales. Así, la tendencia general descrita por la mayoría de los estudios es que un aumento en el contenido de lípidos dietarios disminuye la actividad de los enzimas lipogénicos en el hígado (Lin et al., 1977; Likimani y Wilson, 1982; Arnesen et al., 1993; Suárez et al., 1995; Dias et al., 1998; Gélineau et al., 2001; Suárez et al., 2002; Boujard et al., 2004; Wang et al., 2005a). A su vez, un aumento de los carbohidratos dietarios, estimula la actividad de tales enzimas (Hilton y Atkinson, 1982; Likimani y Wilson, 1982; Fynn-Aikins et al., 1992; Suárez et al., 1995; Dias et al., 1998; Barroso et al., 2001). Sin embargo, en el presente estudio, en hígado, principal órgano encargado de la regulación del metabolismo lipídico, no se mostraron los efectos descritos por los anteriores autores, de forma que los distintos niveles de lípidos o carbohidratos no supusieron cambios significativos sobre la actividad hepática G6PDH, ni tampoco sobre la HOAD, principal enzima regulador de la  $\beta$ -oxidación. De igual modo, Warman y Bottino (1978) tampoco observaron efectos sobre la actividad lipogénica de *Arius felis* por los cambios en los niveles de lípidos y carbohidratos dietarios.

En base a estos resultados, se podría afirmar que las modificaciones observadas en los niveles plasmáticos de colesterol total, HDL y lípidos totales se deberían a factores exógenos como la composición dietaria, y no tanto a endógenos como el metabolismo hepático. Así, existen numerosos trabajos que muestran la existencia de una relación directa entre el contenido en lípidos dietarios y los lípidos circulantes en plasma (Vieira et al., 2005). Parece lógico pensar que “per se” el suministro de un menor nivel de lípidos en la dieta (a un mismo nivel proteico) tenga como consecuencia menores niveles de lípidos plasmáticos.

Por otro lado, la respuesta generalizada ante un incremento en el contenido de carbohidratos dietarios, cuando los niveles de inclusión permiten un uso eficaz de este nutriente, es la disminución de la actividad gluconeogénica (Walton y Cowey, 1982; Suárez et al., 1995, 2002; Panserat et al., 2002) y aumento de la vía glucolítica (Walton

y Cowey, 1982; Metón et al., 1999, 2000; Caseras et al., 2002; Suárez et al., 2002; Kirchner et al., 2005), junto con una estimulación en la actividad de la G6PDH (Hilton y Atkinson, 1982; Fynn-Aikins et al., 1992; Suárez et al., 1995). Sin embargo, en el presente estudio, la utilización de un 28% de carbohidratos en las dietas, dio lugar a efectos opuestos a esta tendencia general. Así, aunque tal nivel de carbohidratos dietarios no supuso efectos negativos para el crecimiento, desde un punto de vista metabólico se podría afirmar que los dentones no son capaces de emplear eficientemente este nutriente a estos niveles. En este sentido, los resultados del metabolismo hepático indican un aumento en las vías gluconeogénicas (actividad FBPasa incrementada), tanto a partir de aminoácidos (GPT elevada) como de glicerol (GK elevada), en aquellos animales alimentados con las dietas P<sub>43</sub>C<sub>28</sub> y P<sub>38</sub>C<sub>28</sub>, frente a los grupos alimentados con menor contenido en carbohidratos. De igual forma, en músculo blanco también se puede observar un incremento de la actividad FBPasa y GK para los animales alimentados con mayores niveles de carbohidratos. Este conjunto de resultados, estaría en concordancia con el ensayo anterior, ya que aunque, efectivamente, el empleo de un 24% de carbohidratos dietarios tampoco reflejó efectos negativos sobre el crecimiento y el organismo, sí se indicó que, en base a los resultados de utilización del alimento (IC y CEC), niveles de carbohidratos por encima de éste podrían no estar siendo utilizados eficazmente por los dentones.

Por su parte, apenas se observaron efectos sobre el metabolismo cardíaco, si bien, altos niveles de lípidos dietarios parecen promover la actividad GK, cuyos productos podrían estar siendo derivados a gluconeogénesis, ya que aunque no se observaron diferencias significativas, se mostró una ligera tendencia a aumentar los valores de actividad FBPasa en estos tratamientos. No obstante, el incremento de actividad G6PDH podría estar indicando la recirculación de los productos procedentes del enzima GK, produciendo NADPH necesario para sintetizar lípidos *de novo*, cerrando un ciclo de constante anabolismo y catabolismo lipídico.

Al margen del efecto dietario que se pudiera ejercer sobre el metabolismo intermediario, es importante destacar la imposibilidad de detección de actividad del enzima HK-IV hepática en los dentones del presente ensayo.

En este sentido, y si comparamos estos resultados con los obtenidos en los dos anteriores ensayos en dentón (vitamina C e hidratos de carbono), podemos comprobar un importante efecto de la edad sobre la actividad de este enzima. Así, en dentones de pequeño tamaño (aproximadamente 23 g), los valores de actividad hepática HK-IV se encontraron entre 3.1 y 3.5 mU mg de proteína<sup>-1</sup>. Sin embargo, dentones con un peso medio de 57 g, mostraron valores que oscilaron entre 0.6 y 1.5. Finalmente, en el presente ensayo, dentones con un peso medio de 173 g presentan actividades HK-IV en hígado, tan bajas que, al menos con las técnicas empleadas, no han podido ser detectadas. Aunque no se han encontrado en bibliografía estudios que constaten este fenómeno específicamente para la actividad HK-IV, algunos autores han confirmado que la edad del animal produce cambios en la actividad de distintos enzimas tanto del metabolismo intermediario (Kiesling et al., 1991) como de otras rutas metabólicas como pueden ser aquellas implicadas en la digestión de los alimentos (Kuz'mina, 1996; Wang et al., 2006b).

Por otra parte, un gran número de estudios han constatado que la composición del alimento ingerido por los peces puede condicionar tanto la producción de agentes oxidantes como la actividad de los mecanismos de defensa antioxidante (Martínez-Álvarez et al., 2005). Aunque, desde un punto de vista global, los resultados del presente ensayo no mostraron influencias importantes de los diferentes niveles de macronutrientes empleados sobre los mecanismos de defensa antioxidante, es importante resaltar que, tanto en corazón como en hemolisado, niveles elevados de proteína dietaria indujeron valores significativamente más bajos en la actividad GPX. Similares resultados fueron observados en peces de hábito carnívoro, cuya actividad GPX fue menor cuando eran comparados con otras especies herbívoras u omnívoras (Radi et al., 1987). No obstante, al contrario que las observaciones obtenidas por Radi et al. (1987), quienes reportaron que las actividades CAT y SOD eran estimuladas en las especies carnívoras frente a aquellas de hábito herbívoro u omnívoro, en el presente ensayo la actividad CAT se vio disminuida en corazón en aquellos grupos alimentados con dietas de alto nivel proteico. En cualquier caso, sin embargo, ni estos autores ni los resultados del presente ensayo nos permiten establecer el motivo por el cual se establece esta relación entre nivel de proteína dietaria y actividad enzimática de defensas antioxidantes.

Por su parte, al igual que en los resultados observados para *Solea senegalensis* (Rueda-Jasso et al., 2004), en el presente estudio, la actividad SOD hepática aumentó con el incremento en lípidos dietarios. No obstante, estas diferencias deben ser interpretadas con suma cautela, ya que aunque estadísticamente se indica que el contenido en lípidos condiciona la actividad de este enzima, como nos muestran los resultados, este hecho se produce sólo a altos niveles de proteína dietaria.

En lo que respecta a la influencia de los distintos tratamientos dietarios sobre posibles modificaciones en el patrón isoenzimático SOD, tan sólo en músculo blanco, niveles más elevados de proteína dietaria parecen inducir la expresión de un tercer isoenzima SOD, CuZn-SOD II. Adicionalmente, es importante resaltar que, en comparación con el resto de tejidos, la intensidad manifestada por el isoenzima Mn-SOD es mayor en músculo blanco y corazón, sin distinción entre tratamientos. Si se considera que este isoenzima se encuentra presente únicamente a nivel mitocondrial (Halliwell y Gutteridge, 2000), este hecho estaría bien justificado por la elevada cantidad de mitocondrias localizadas en estos tejidos.

En cuanto a los indicadores de daño oxidativo generado sobre lípidos o proteínas, los valores obtenidos nos muestran que éstos se encuentran directamente relacionados con el contenido de los nutrientes en las dietas. En este sentido, una mayor ingesta proteica o lipídica podría inducir un aumento en la disponibilidad de estos sustratos, así como en su metabolismo, lo que resultaría en una mayor susceptibilidad a la oxidación de los mismos (Stéphan et al., 1995; Álvarez et al., 1998; Rueda-Jasso et al., 2004). En concordancia con este hecho, un mayor contenido de grupos carbonilo en hígado, corazón y hemolisado, indicativo de un mayor daño oxidativo de las proteínas en estos tejidos, fue observado en aquellos grupos de peces alimentados con un 43% de proteína dietaria. En este caso, la mayor disponibilidad de proteína y el aumento en su metabolismo justificarían estos daños.

Por otro lado, al igual que en el caso de las proteínas, el empleo de mayores niveles de lípidos dietarios resultó en un mayor contenido en MDA, indicativo del daño oxidativo de este nutriente, en músculo blanco y en hemolisado. Asimismo, los valores más bajos de peroxidación lipídica en aquellos animales alimentados con dietas de alto contenido en carbohidratos, no sólo podría deberse a la menor disponibilidad y catabolismo de los

lípidos, sino también al posible efecto de protección ejercido por la glucosa, la cual puede actuar como capturador de radicales libres, en estos tratamientos (Sagone et al., 1983).

Finalmente destacar que la supervivencia de los peces en el ensayo fue alta en todos los casos, por encima siempre del 85% y sin diferencias significativas entre los distintos tratamientos dietarios. Probablemente las condiciones de temperatura relativamente bajas, en torno a los 18°C, en las que se mantuvieron los peces protegió a los animales del posible ataque de agentes infecciosos (Company et al., 1999b), al contrario de lo que se observó en el ensayo anterior.

### 3.5. CONCLUSIONES

1. Se confirma en este estudio la capacidad del dentón para utilizar de forma eficaz tanto los carbohidratos como los lípidos para obtener la energía necesaria para su desarrollo, así como para compensar eficientemente el “vacío” energético derivado de la disminución del contenido proteico del alimento.
2. Bajo las condiciones de este ensayo, existe la posibilidad de disminuir el contenido proteico dietario hasta un 38% sin que se vean afectados ninguno de los parámetros de crecimiento. De hecho, se confirma que estos niveles de proteína indujeron una disminución del catabolismo proteico.
3. Respecto a la optimización de la utilización nutritiva de la proteína, los lípidos se mostraron más eficaces que los hidratos de carbono.
4. Desde el punto de vista metabólico, el dentón parece no ser capaz de emplear eficientemente los hidratos de carbono a niveles elevados, ya que se induce un aumento de la gluconeogénesis, tanto a partir de aminoácidos como de glicerol.
5. Ni los diferentes niveles de macronutrientes ni la interacción de los mismos provoca alteraciones significativas sobre los mecanismos de defensa antioxidante. Con carácter general, existe una relación directa entre el nivel de ingesta de lípidos o proteínas y la aparición de daños oxidativos sobre estos componentes tisulares.

### 3.6. CONCLUSIONS

1. The capacity of common dentex to use efficiently both carbohydrates and lipids to obtain the required energy for its development when dietary protein content is reduced has been confirmed in this trial.
2. Under the tested conditions, dietary protein may be reduced to 38% without affecting any growth parameters. In fact, it was confirmed that this protein level induced a decrease of the protein catabolism.
3. Considering the optimization of protein nutritive utilization, lipids were used more efficiently than carbohydrates.
4. From the metabolic point of view, common dentex does not seem to be able to use effectively carbohydrates at high levels, since this situation induces an increase of glyconeogenesis, both from amino acids and glycerol.
5. Neither the different macronutrient levels nor their interaction cause significant alterations on the antioxidant defence mechanisms. In general, a direct relation between the level of lipid or protein intake and the occurrence of oxidative damage on these tissue components exists.





## **4. BLOQUE EXPERIMENTAL IV-4. Respuesta metabólica en dentones sometidos a ayuno prolongado y posterior realimentación.**

### **4.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

Los peces, en general, poseen una gran capacidad para resistir largos periodos de ayuno, de tal forma que para muchas especies este hecho forma parte de su ciclo de vida (Love, 1980; Navarro y Gutiérrez, 1995; Vigliano et al., 2002). Uno de los principales motivos naturales que conducen al proceso de ayuno en peces son las fluctuaciones estacionales, además de espaciales, en la disponibilidad de presas. Igualmente, los procesos reproductivos constituyen una causa natural de ayuno, incluyendo tanto la etapa anterior al desove como las migraciones necesarias para la realización del mismo. Sin embargo, además de por causas naturales, los peces cultivados también pueden experimentar situaciones de ayuno derivadas de los procedimientos de rutina en la acuicultura, tales como el transporte de los animales, tratamientos sanitarios específicos, etc. Igualmente, existen estudios que han indicado que el ayuno puede ser empleado como una técnica efectiva para mejorar la calidad del producto final en especies como el salmón (Einen y Thomassen, 1998), la trucha arcoiris (Rasmussen et al., 2000) y la dorada (Grigorakis y Alexis, 2005), en el sentido de que esta situación influye sobre la composición del músculo y los depósitos de grasa en el pez.

Estos acontecimientos, tanto naturales como impuestos artificialmente, implican la necesidad de movilizar y usar las reservas energéticas, e incluso los constituyentes corporales de los peces, para sobrevivir, lo que conlleva una pérdida de peso asociada, además de una serie de ajustes metabólicos, tanto en las principales rutas del metabolismo intermediario como en los mecanismos de respuesta antioxidante del animal (Navarro y Gutiérrez, 1995; Vigliano et al., 2002). No obstante, tanto las estrategias a seguir como la capacidad con la que los peces responden ante el ayuno están condicionadas por múltiples variables (Love, 1980; Navarro y Gutiérrez, 1995; Hutchings et al., 1999; Vigliano et al., 2002). Así, cada especie presenta un patrón

diferente en los cambios metabólicos necesarios para la movilización de las reservas energéticas. Además de este factor interespecífico, dentro de una misma especie también pueden presentarse diferencias en las respuestas ante el ayuno. El estado nutricional previo, así como el estado fisiológico del animal anterior al ayuno, la edad, el tamaño de los peces, la época del año, las condiciones ambientales (temperatura, oxígeno, etc.) y la duración del ayuno, entre otros muchos factores, también van a influir en la forma en la que se va a producir la reorganización del metabolismo. Todas estas variables explicarían la discrepancia de resultados existente en la bibliografía acerca de cual sería el patrón de respuesta general que seguirían los peces ante el ayuno y, concretamente, la respuesta de cada especie.

En la mayoría de las especies, salvo aisladas excepciones como en *Myxine glutinosa* (Falkmer y Matty, 1966) o *Anguilla rostrata* (Suárez y Mommsen, 1987), el ayuno induce hipoglucemia (Navarro y Gutiérrez, 1995; Vigliano et al., 2002). Así, en lubina se ha observado que los niveles de glucosa plasmática disminuyen significativamente desde los días iniciales del ayuno (Gutiérrez et al., 1991; Echevarría et al., 1997; Pérez-Jiménez et al., 2007). Respuestas similares han sido encontradas en otras especies como *Acipenser fulvescens* (Gillis y Ballantyne, 1996), *Salmo salar* (Soengas et al., 1996), *Acipenser transmontanus* (Hung et al., 1997), *Sparus aurata* (Power et al., 2000), *Brycon cephalus* (Figueiredo-Garutti et al., 2002) y *O. mykiss* (Figuerola et al., 2000; Pottinger et al., 2003). No obstante, en base a los estudios disponibles, parece que, en la mayoría de los casos, los niveles de glucosa plasmática no suelen alcanzar los niveles mínimos necesarios para el mantenimiento del animal.

El mantenimiento de la glucemia bajo estas circunstancias se puede conseguir mediante la degradación del glucógeno hepático durante las primeras fases del ayuno, siendo este sustrato utilizado, además, como fuente de energía (Navarro y Gutiérrez, 1995; Vigliano et al., 2002). Este hecho parece estar constatado en estudios con dorada (Power et al., 2000; Metón et al., 2003) y lubina (Pérez-Jiménez et al., 2007), donde los niveles de glucógeno hepático disminuyeron considerablemente desde los primeros días en los que los animales fueron privados de alimento. En otros estudios, especies como *Acipenser transmontanus* (Hung et al., 1997), *Cyprinus carpio* (Shimeno et al., 1997), *Brycon cephalus* (Figueiredo-Garutti et al., 2002) y *O. mykiss* (Pottinger et al., 2003) también han mostrado un comportamiento similar al descrito en dorada y lubina. En cuanto al

glucógeno muscular, éste se puede agotar durante el ayuno o mantenerse a expensas de la continua generación de glucosa en el hígado (Navarro y Gutiérrez, 1995). Así, especímenes de *Brycon cephalus* en condiciones de ayuno, no sólo mantuvieron los niveles de glucógeno muscular, sino que los incrementaron durante este periodo (Figueiredo-Garutti et al., 2002).

Por otro lado, además de la activación de vías gluconeogénicas, se ha demostrado que la protección de estos niveles mínimos o basales de glucosa también se puede conseguir reduciendo el uso de la misma, habiéndose demostrado que la hipoglucemia es una potente señal para limitar la captación de glucosa por las células, reduciendo o inhibiendo la actividad de enzimas implicados en el catabolismo de este sustrato (Moon y Foster, 1995; Navarro y Gutiérrez, 1995). Así, distintos estudios muestran actividades reducidas de los principales enzimas glucolíticos hepáticos (HK, HK-IV y PK), además de otros enzimas relacionados con el metabolismo de la glucosa (G6PDH), en distintas especies sometidas a ayuno, como *Pleuronectes platessa* (Moon y Johnston, 1980), *O. kisutch* (Sheridan y Mommsen, 1991), *O. mykiss* (Bastrop et al., 1992; Kirchner et al., 2005), *Macquaria ambigua* (Collins y Anderson, 1997), *Acipenser transmontanus* (Hung et al., 1997), *Cyprinus carpio* (Shimeno et al., 1997), *Sparus aurata* (Caseras et al., 2002; Metón et al., 2003) y *Dicentrarchus labrax* (Pérez-Jiménez et al., 2007). Por otra parte, los estudios relativos a enzimas de metabolismo intermediario en músculo blanco son más escasos. Yang y Somero (1993) encontraron una disminución en la actividad PK del músculo blanco ante una situación de ayuno en las especies *Scorpaena guttata* y *Sebastes alascanus*.

Casi de forma paralela al agotamiento del glucógeno, las reservas lipídicas (grasa perivisceral, hepática y muscular) son movilizadas para obtener la energía necesaria para el mantenimiento del animal. Distintos estudios muestran una reducción significativa del contenido lipídico corporal en especies como *Pleuronectes platessa* (Jobling, 1980), *Clarias lazera* (Hogendoorn, 1983), *O. mykiss* (Reinitz, 1983) y *Salmo salar* (Cook et al., 2000). En este sentido, el análisis del contenido lipídico de los diferentes reservorios corporales muestra un descenso de los mismos en condiciones de ayuno. Así, en especies como la dorada se ha observado una disminución de lípidos a nivel hepático (Power et al., 2000), muscular y perivisceral (Grigorakis y Alexis, 2005).

En lubina, Gutiérrez et al. (1991) observaron un descenso en los lípidos periviscerales y, en carpa, Segner et al. (1997) encontraron una disminución en el contenido de lípidos hepáticos. El orden en el que estas reservas son utilizadas depende de la especie a considerar, aunque, en general, es la grasa perivisceral la primera en ser movilizada durante el ayuno en la mayoría de los casos, mientras que al final del mismo son empleadas la hepática y muscular (Navarro y Gutiérrez, 1995).

Por otra parte, el contenido en lípidos circulantes en plasma también desciende durante el ayuno, debido tanto a la nueva situación nutricional como a la inhibición de la actividad de enzimas lipogénicos (Zammit y Newsholme, 1979; Navarro y Gutiérrez, 1995; Vigliano et al., 2002). Este hecho ha sido observado en numerosos trabajos. Así, en lubina se ha observado una reducción del nivel de triglicéridos plasmáticos (Santulli et al., 1997; Pérez-Jiménez et al., 2007), así como de las actividades ácido graso sintetasa (FAS) y G6PDH en situaciones de privación de alimento (Pérez-Jiménez et al., 2007). Respuestas similares se han observado en otras especies como *Morone saxatilis* (Mac Farlane et al., 1990), *Acipenser transmontanus* (Hung et al., 1997) y *Cyprinus carpio* (Shimeno et al., 1997). Sin embargo, los resultados de otros trabajos muestran tendencias contrarias a la descrita, ya que los niveles de triglicéridos aumentaron o se mantuvieron durante las primeras etapas del ayuno en lubina (Echevarría et al., 1997) y trucha arcoiris (Kirchner et al., 2005).

Respecto al colesterol total, se observa una tendencia al decremento en distintas especies como la lubina (Echevarría et al., 1997; Pérez-Jiménez et al., 2007) y la carpa (Shimeno et al., 1997). Tal como ocurre con los triglicéridos, otras especies, como *Morone saxatilis* (Mac Farlane et al., 1990), muestran una respuesta inversa a la que acabamos de exponer para el colesterol total.

Por otro lado, algunos autores sugieren que los cuerpos cetónicos generados a partir del acetil-CoA procedente de la  $\beta$ -oxidación, no juegan un papel importante como fuente energética durante el ayuno en peces (Zammit y Newsholme, 1979; Black y Love, 1986; Segner et al., 1997). Sin embargo, este hecho aún se encuentra bajo debate, ya que otros autores han mostrado lo contrario en especies como *Dicentrarchus labrax* (Carrillo et al., 1982), *Squalus acanthias* (De Roos, 1994), *O. mykiss* (Soengas et al., 1998; Figueroa et al., 2000) y *Salmo salar* (Soengas et al., 1996).

Finalmente, cuando las reservas glucogénicas y lipídicas se encuentran prácticamente agotadas, la proteína, principalmente la muscular, comienza a ser movilizada para ser empleada como fuente de energía y como sustrato gluconeogénico (Navarro y Gutiérrez, 1995). Este hecho ha sido observado en especies como *O. mykiss* (Morata et al., 1982; Soengas et al., 1998; Pottinger et al., 2003), donde los enzimas implicados en el suministro de estos sustratos gluconeogénicos de origen proteico aumentaron su actividad en las últimas fases del periodo de ayuno experimental. Similares resultados han sido obtenidos en *Rutilus rutilus* (Méndez y Wieser, 1993), *Dicentrarchus labrax* (Echevarría et al., 1997) y *Sparus aurata* (Metón et al., 2003; Grigorakis y Alexis, 2005).

Por su parte, se ha determinado que los aminoácidos plasmáticos muestran una respuesta distinta ante el ayuno, en función de que sean o no esenciales, sin olvidar que ésta también está condicionada directamente por la especie a considerar (Navarro y Gutiérrez, 1995; Gillis y Ballantyne, 1996; Echevarría et al., 1997; Navarro et al., 1997). Contrariamente a la secuencia de uso de sustratos que acabamos de describir, algunas especies intentan preservar las reservas de glucógeno, degradando en primer lugar la proteína, principalmente muscular, para gluconeogénesis, y usando lípidos y/o proteína como sustratos energéticos (Butler, 1968; Gas, 1972; Sheridan y Mommsen, 1991; Vijayan et al., 1993; Navarro y Gutiérrez, 1995; Gillis y Ballantyne, 1996).

Además de la movilización de las reservas energéticas, con la consecuente pérdida de peso asociada, y los ajustes metabólicos necesarios que acabamos de comentar, otra de las consecuencias más importantes del ayuno en peces es la generación de una situación prooxidante. Así, durante el ayuno, la tasa de generación de ROS se encuentra incrementada como consecuencia del aumento del metabolismo oxidativo. En algunos casos, esta producción de ROS podría exceder su neutralización por las defensas antioxidantes del animal, dando lugar a la aparición de estrés oxidativo (Sies, 1986; Di Giulio et al., 1995; Halliwell y Gutteridge, 2000; Livingstone, 2001). En especies como la dorada se ha comprobado que el ayuno induce un incremento en la concentración de MDA hepático, indicativo del daño oxidativo a lípidos (Pascual et al., 2003). Además, otros estudios han puesto de manifiesto que una privación parcial de alimento también puede producir un aumento en los niveles de MDA hepáticos en especies como la trucha arcoiris (Hidalgo et al., 2002).

Respecto a las actividades de los enzimas antioxidantes (SOD, GPX, GR y CAT), por lo general, aumentan en respuesta a la nueva situación prooxidante generada por la modificación metabólica producida por el ayuno. Así, Guderley et al. (2003) encontraron que, en *Gadus morhua*, la actividad de los enzimas CAT y GPX hepáticas y CAT muscular aumentaba bajo condiciones de privación del alimento. Igualmente, Pascual et al. (2003) observaron un incremento de las actividades SOD, GR y GPX hepáticas en doradas sometidas a ayuno, aunque en este caso la actividad CAT no se vio influenciada. Existen, sin embargo, estudios que indican una tendencia contraria a la presentada previamente. Este es el caso de Blom et al. (2000) quienes, sometiendo a ayuno a especímenes de trucha arcoiris, observaron un descenso en los niveles de actividad GPX y GR hepáticos. De cualquier modo, existen casos en los que la respuesta de las defensas antioxidantes, incluso incrementándose, puede no ser suficiente para evitar el daño de las ROS.

Una vez finalizado el periodo de ayuno, los peces son realimentados, de forma que, tanto la especie como el resto de factores expuestos previamente, son determinantes para condicionar la respuesta de los animales a esta nueva situación, siendo la duración del ayuno un factor especialmente importante. La recuperación durante la fase de realimentación puede ser total, parcial, o en casos extremos en los que se han producido daños irreversibles, nula (Navarro y Gutiérrez, 1995). Sin embargo, en general, los daños no suelen ser muy dramáticos, por lo que los peces vuelven al estado fisiológico anterior al ayuno, recuperando además el peso perdido (Love, 1980; Weatherley y Gill, 1987; Navarro y Gutiérrez, 1995; Vigliano et al., 2002). Así, este fenómeno ha sido observado en numerosas especies como por ejemplo el bacalao (Black y Love, 1986), la carpa (Blasco et al., 1992), el salmón (Soengas et al., 1996), la dorada (Power et al., 2000; Metón et al., 2003; Pascual et al., 2003), la trucha arcoiris (Farbridge y Leatherland, 1992; Pottinger et al., 2003) y la lubina (Pérez-Jiménez et al., 2007), entre otras muchas (Navarro et al., 1992; Méndez y Wieser, 1993; Collins y Anderson, 1997).

Además, a excepción de algunos estudios (Schwarz et al., 1985; Pirhonen y Forsman, 1998), se ha descrito que, en la mayoría de especies de peces, la tasa de crecimiento observada durante la fase de realimentación, puede, en algunos casos, ser superior a la experimentada por el animal en condiciones comparables con disponibilidad continua de alimento. Esta respuesta, que tiende a restaurar la trayectoria de crecimiento original,

es conocida como “crecimiento compensatorio” (Ali et al., 2003). Aunque las bases fisiológicas del crecimiento compensatorio aún no han sido completamente esclarecidas, parece que una ingesta incrementada respecto a la de controles continuamente alimentados (hiperfagia) y/o un mejor índice de conversión del alimento son las principales causas que justifican este fenómeno (Dobson y Holmes, 1984; Quinton y Blake, 1990; Hayward et al., 1997; Ali et al., 2003). Sin embargo, el crecimiento compensatorio depende de multitud de variables, entre las que destacan no sólo la especie a considerar sino también las condiciones de cultivo y los ciclos de ayuno-realimentación experimentados, pudiéndose observar respuestas diversas para una misma especie (Ali et al., 2003). Así, Sahin et al. (2000), con un período único de ayuno-realimentación en doradas, observaron el potencial de esta especie para mostrar crecimiento compensatorio. Sin embargo, Eroldogan et al. (2006), trabajando con esta misma especie, sólo encontraron una ligera compensación parcial cuando ensayaron con ciclos alternos de ayuno y realimentación de diferente duración. Probablemente, y según indican estos autores, las diferencias observadas entre ambos ensayos se debieron más a las condiciones ambientales (temperatura) que a los propios protocolos de ayuno-realimentación. No obstante, otras especies también muestran una limitada capacidad para el crecimiento compensatorio (Schwarz et al., 1985; Wang et al., 2000).

Esta respuesta compensatoria posee un gran interés para la acuicultura, ya que una apropiada gestión de este fenómeno, con los ciclos alternativos de ayuno y realimentación adecuados a cada especie, resultaría en una mejora de la productividad derivada de una tasa de crecimiento incrementada y un IC mejorado (Hayward, et al., 1997; Gaylord y Gatlin, 2001). Sin embargo, aún existen muchas incertidumbres, que precisan de una investigación más profunda, acerca de los posibles efectos negativos del crecimiento compensatorio, ya que los animales crecen a tasas por encima de su capacidad fisiológica habitual, pudiéndose generar efectos adversos sobre el desarrollo y supervivencia de los animales (Ali et al., 2003).

Conocer el modo en que cada especie es capaz de superar situaciones de ayuno, y la forma en que se recupera durante la realimentación, es un importante reto para la investigación en acuicultura, ya que ayudaría a prevenir los posibles daños en la salud y bienestar de los peces y permitiría optimizar la producción.



## 4.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 4.2.1. Dietas experimentales y alimentación

Para la alimentación de los animales del presente ensayo se utilizó una dieta comercial Dibaq-Diproteg, S.A. (España), con un tamaño de grano de 4.5 mm y cuya composición analítica se refleja en la Tabla IV-38. El experimento constó de dos fases: una fase inicial de 5 semanas de duración, durante las cuales dos de los lotes (controles) fueron alimentados manualmente tres veces al día hasta saciedad aparente, mientras que los otros dos lotes estuvieron en ayuno. Transcurrido este tiempo, comenzó la segunda fase de 3 semanas de duración, en la que los animales control continuaron con la misma pauta de alimentación que en la fase 1, y los animales que habían sido sometidos a ayuno comenzaron a recibir alimento.

Tabla IV-38. Composición analítica de la dieta comercial Dibaq-Diproteg, S.A. utilizada en el ensayo de ayuno-realimentación.

<i>Análisis de la dieta</i>	
Humedad (%)	8.46
Proteína (% ss)	48.03
Lípidos (% ss)	22.08
Ceniza (% ss)	10.42
MELN (% ss)	19.47

### 4.2.2. Animales y mantenimiento

Un total de 64 especímenes de *Dentex dentex*, de un peso medio inicial de  $323.9 \pm 2.1$  g, fueron distribuidos al azar en 4 lotes (16 individuos/lote). Cada lote se alojó en tanques cilíndricos grises de fibra de vidrio, de 1000 litros de capacidad, abastecidos con agua de mar (37 ‰ de salinidad), en circuito abierto y con un flujo continuo de  $30 \text{ l min}^{-1}$ . El fotoperiodo fue de 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

La temperatura media del agua durante el experimento fue de  $25.5 \pm 2.0$  °C y los niveles medios de oxígeno disuelto siempre fueron superiores al 88% de saturación. Tras una semana inicial de adaptación a las condiciones experimentales, se inició el ensayo con una duración total de 8 semanas, subdividida en dos fases, ayuno (5 semanas) y realimentación (3 semanas), como describíamos anteriormente.

#### 4.2.3. Toma de muestras, parámetros calculados y análisis realizados

La ingesta fue registrada diariamente en cada uno de los lotes experimentales. Los animales fueron pesados individualmente al inicio del experimento. Se realizaron controles del peso de los lotes al final de cada una de las fases experimentales (ayuno y realimentación). Asimismo, finalizada cada fase (5ª y 8ª semana), se muestrearon 4 peces por lote (8 por situación experimental), de los cuales se determinó tanto la longitud total como el peso. Estos animales muestreados fueron empleados para extracción de sangre, hígado, corazón y músculo blanco. El peso de los hígados fue registrado en el momento de la extracción. Además de estos tejidos, el digestivo también fue extraído para determinar in situ su peso, así como su contenido en grasa perivisceral.

La metodología empleada para la toma de muestras, así como para su procesamiento y análisis, y la descripción de los índices determinados se encuentran detalladas en el apartado de material y métodos general, así como en el Anexo I.

Se calculó el incremento de peso de los animales y se realizó una valoración de los índices IN, RHS, RDS e IGP.

En las muestras de sangre se determinó el contenido en hemoglobina, el hematocrito y la concentración de hemoglobina corpuscular media. Asimismo, se separó la fracción plasmática para el análisis del contenido en glucosa, colesterol total, colesterol HDL y LDL, triglicéridos, lípidos totales, aminoácidos y proteínas, y el hemolisado, en el que se determinaron las actividades de los enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPX y GR, así como el nivel de peroxidación lipídica como indicador de daño oxidativo.

Las muestras hepáticas y musculares se emplearon para el análisis de su contenido en lípidos y glucógeno y, junto con las de corazón, también se utilizaron para la determinación de las actividades de enzimas del metabolismo intermediario (HK, PK, FBPasa, GK, GDH, GOT, GPT, CS, G6PDH, EM, HOAD, ACoAT y  $\beta$ -OHBDH). De igual modo, en estos tres tejidos se procedió a la valoración del posible daño oxidativo (MDA y grupos carbonilo, este último sólo en hígado y corazón, producido por las especies de oxígeno reactivo y de las actividades de los enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPX y GR. Finalmente, se analizó el patrón isoenzimático de la SOD en hígado, músculo blanco y corazón mediante técnicas electroforéticas.

Para la estimación del posible efecto del ayuno o la realimentación se utilizó el Análisis de la Varianza de una vía (ANOVA), equivalente en este caso a la prueba t-Student, ya que las medias comparadas fueron dos a dos (ayuno y su control y realimentación y su control). El nivel de confianza empleado fue del 95% ( $P < 0.05$ ).

### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.1. Ingesta, eficacia del alimento, crecimiento y supervivencia

En la Tabla IV-39 se muestran los resultados de ingesta, eficacia del alimento y crecimiento de los dentones sometidos a las distintas situaciones nutricionales. Como se puede observar, los valores de ingesta fueron significativamente más elevados en el grupo de dentones realimentados (R) tras el periodo de ayuno, en comparación con la ingesta obtenida en ambos controles ( $C_A$  y  $C_R$ ). No se observaron diferencias significativas en el índice de conversión. En cuanto a los datos de crecimiento, los resultados muestran una pérdida de peso notable ( $P < 0.05$ ) en aquellos grupos sometidos a privación del alimento (A). El peso final de los animales tras la fase de realimentación fue similar en  $C_R$  y R, mientras que el incremento de peso y la TCI difirieron significativamente entre ambos grupos. La mortalidad fue nula durante el periodo experimental.

Tabla IV-39. Ingesta, eficacia del alimento y crecimiento en dentón sometido a ayuno y posterior realimentación.

Grupo	Ingesta (g 100 g pez <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	IC	Peso Medio Inicial (g)	Peso Medio Final (g)	$\Delta$ Peso (% día <sup>-1</sup> )	TCI (%)
$C_A$	1.56 ± 0.05	0.46 ± 0.01	326.0 ± 3.1	417.6 ± 1.8	0.80 ± 0.02	0.71 ± 0.02
A	-----	-----	321.8 ± 0.1	303.2 ± 0.7 *	-0.17 ± 0.01 *	-0.17 ± 0.01 *
$C_R$	1.50 ± 0.05	0.49 ± 0.09	417.6 ± 1.8	466.8 ± 12.4	0.56 ± 0.11	0.53 ± 0.10
R	2.76 ± 0.28 *	0.51 ± 0.18	303.2 ± 0.7 *	387.0 ± 17.3	1.36 ± 0.24 *	1.19 ± 0.19 *

Los resultados son media ± E.S. de dos lotes experimentales. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) del ayuno o la realimentación respecto a su control.

#### 4.3.2. Índices biométricos

Los resultados de la Tabla IV-40 reflejan una reducción significativa de los índices IN e IGP en el grupo privado de alimento en comparación con su control ( $C_A$ ). Durante la realimentación, estas diferencias desaparecieron entre los grupos  $C_R$  y R para el IN, pero no para el IGP. Por su parte, los índices RHS y RDS no se vieron afectados ni por el ayuno ni por la posterior realimentación.

Tabla IV-40. Índices biométricos en dentón sometido a ayuno y posterior realimentación.

<b>Grupo</b>	<b>IN</b> (g cm <sup>-3</sup> )	<b>RHS</b> (%)	<b>RDS</b> (%)	<b>IGP</b> (%)
<b>C<sub>A</sub></b>	1.66 ± 0.06	0.88 ± 0.08	1.83 ± 0.11	2.50 ± 0.33
<b>A</b>	1.36 ± 0.02 *	0.76 ± 0.04	1.66 ± 0.08	0.97 ± 0.19 *
<b>C<sub>R</sub></b>	1.74 ± 0.10	1.33 ± 0.05	2.16 ± 0.23	2.75 ± 0.33
<b>R</b>	1.61 ± 0.08	1.20 ± 0.08	2.88 ± 0.20	1.36 ± 0.05 *

Los resultados son media ± E.S. (n = 8). Los asteriscos indican diferencias significativas (P<0.05) entre ayuno y realimentación respecto a su control.

#### 4.3.3. Constantes eritrocitarias

No se observó ninguna influencia significativa de las distintas situaciones nutricionales (ayuno y realimentación) ni en el hematocrito ni en el contenido en hemoglobina de la sangre extraída a los dentones muestreados (Tabla IV-41). Por el contrario, el índice CHCM fue significativamente inferior en el grupo A en relación con aquellos valores obtenidos para el grupo control del ayuno (C<sub>A</sub>). Estas diferencias se mantuvieron tras la realimentación de los animales (P<0.05), donde los valores de CHCM continuaron siendo más elevados en el grupo C<sub>R</sub> que en el R.

Tabla IV-41. Constantes eritrocitarias en dentón sometido a ayuno y posterior realimentación.

<b>Grupo</b>	<b>Hcto</b> (%)	<b>Hb</b> (g dl <sup>-1</sup> )	<b>CHCM</b> (g dl <sup>-1</sup> )
<b>C<sub>A</sub></b>	45.58 ± 2.18	8.65 ± 0.32	18.81 ± 0.52
<b>A</b>	49.44 ± 2.81	7.71 ± 0.50	15.63 ± 0.63 *
<b>C<sub>R</sub></b>	41.01 ± 1.07	9.74 ± 0.65	23.85 ± 1.91
<b>R</b>	45.82 ± 2.63	8.20 ± 0.40	18.70 ± 0.55 *

Los resultados son media ± E.S. (n = 8). Los asteriscos indican diferencias significativas (P<0.05) del ayuno o la realimentación respecto a su control.

#### 4.3.4. Metabolitos plasmáticos

La Tabla IV-42 muestra los efectos del ayuno y la posterior realimentación sobre los niveles de metabolitos plasmáticos en los dentones sometidos a experimentación. Como consecuencia del ayuno, los resultados reflejan una clara disminución ( $P < 0.05$ ) en los niveles plasmáticos de glucosa, proteína, lípidos totales, triglicéridos, colesterol HDL, LDL y total. Tras la realimentación, excepto para la proteína y el colesterol HDL, se siguieron observando estas diferencias entre los grupos R y C<sub>R</sub>. Los niveles plasmáticos de aminoácidos totales no se vieron afectados significativamente por las situaciones nutricionales ensayadas (ayuno y realimentación).

#### 4.3.5. Contenido de proteína, glucógeno y lípidos en hígado y músculo blanco

En la Tabla IV-43 se muestran los resultados del efecto del ayuno y posterior realimentación sobre el contenido de proteína, glucógeno y lípidos en hígado y músculo blanco de los dentones sometidos a experimentación.

Mientras que la proteína hepática y la muscular no reflejaron efecto alguno a causa del ayuno o la realimentación, los niveles de glucógeno, hepático y muscular, disminuyeron de forma significativa en los animales sometidos a ayuno en comparación con aquellos que fueron alimentados durante el mismo periodo (C<sub>A</sub>). Tras la realimentación desaparecieron las diferencias observadas por efecto del ayuno en los niveles de glucógeno hepático, no siendo así en el músculo blanco, donde los peces realimentados (R) continuaron con valores significativamente inferiores en relación a su grupo control (C<sub>R</sub>).

En cuanto a los lípidos hepáticos, se observó un aumento ( $P < 0.05$ ) considerable de los mismos en los peces bajo condiciones de privación de alimento. Las diferencias entre grupos no desaparecieron tras la realimentación, aunque sí se invirtieron, es decir, el grupo R mostró niveles significativamente inferiores a los del C<sub>R</sub>. El contenido en lípidos musculares no varió durante las distintas situaciones experimentales.

Tabla IV-42. Efecto del ayuno y posterior realimentación en los niveles de metabolitos plasmáticos de dentón. Los datos se expresan como mg dl<sup>-1</sup>.

Grupo	Glucosa	Aminoácidos totales	Proteína	Lípidos totales	Triglicéridos	Colesterol total	Colesterol HDL	Colesterol LDL
C <sub>A</sub>	135.0 ± 5.1	463.5 ± 10.1	7054.1 ± 205.1	652.9 ± 8.1	188.5 ± 9.2	144.3 ± 3.5	35.83 ± 1.64	293.6 ± 9.1
A	67.0 ± 2.2 *	494.3 ± 15.4	6273.8 ± 166.5 *	426.9 ± 14.2 *	112.4 ± 6.2 *	107.9 ± 4.2 *	21.54 ± 2.14 *	156.2 ± 9.2 *
C <sub>R</sub>	100.9 ± 11.6	483.6 ± 25.4	8326.8 ± 743.0	777.2 ± 61.0	211.6 ± 6.8	175.1 ± 9.2	46.14 ± 2.00	399.5 ± 37.8
R	77.3 ± 1.8 *	443.0 ± 13.2	8022.0 ± 569.0	542.8 ± 31.1 *	154.5 ± 9.2 *	172.0 ± 9.8	26.13 ± 0.93 *	328.3 ± 14.4 *

Los resultados son media ± E.S. (n = 8). Los asteriscos indican diferencias significativas (P<0.05) del ayuno o la realimentación respecto a su control.

Tabla IV-43. Efecto del ayuno y posterior realimentación en el contenido en proteína, glucógeno y lípidos en hígado y músculo blanco de dentón.

Grupo	Proteína (mg g tejido <sup>-1</sup> )		Glucógeno (mg glucosa g tejido <sup>-1</sup> )		Lípidos (mg g tejido <sup>-1</sup> )	
	Hígado	Músculo	Hígado	Músculo	Hígado	Músculo
C <sub>A</sub>	111.62 ± 2.88	207.69 ± 1.63	104.29 ± 13.78	0.48 ± 0.04	67.32 ± 6.91	18.97 ± 2.00
A	104.36 ± 4.78	198.73 ± 2.01	6.51 ± 0.58 *	0.17 ± 0.01 *	235.27 ± 13.19 *	17.53 ± 1.39
C <sub>R</sub>	124.72 ± 3.13	210.34 ± 1.55	109.73 ± 1.25	0.59 ± 0.06	122.58 ± 9.74	21.47 ± 2.04
R	119.28 ± 1.22	203.39 ± 0.57	96.77 ± 7.51	0.43 ± 0.04 *	77.40 ± 5.45 *	16.92 ± 1.63

Los resultados son media ± E.S. (n = 8). Los asteriscos indican diferencias significativas (P<0.05) del ayuno o la realimentación respecto a su control.

#### 4.3.6. Metabolismo intermediario

##### *Hígado*

En la Tabla IV-44 se recogen las actividades específicas de enzimas hepáticos del metabolismo intermediario de los dentones bajo las distintas situaciones nutricionales ensayadas.

En los animales privados de alimento, los resultados muestran un descenso significativo en la actividad de los enzimas glucolíticos HK y PK. En cuanto a la actividad del enzima gluconeogénico FBPasa, no se observaron variaciones en la actividad en ninguna de las situaciones experimentales (ayuno y realimentación). Los resultados muestran, sin embargo, un incremento ( $P < 0.05$ ) de la actividad del enzima GK en el grupo de dentones privados de alimento (A).

En cuanto a las enzimas del metabolismo proteico, la actividad GPT disminuyó significativamente en los animales sometidos a ayuno, mientras que los enzimas GDH y GOT incrementaron ( $P < 0.05$ ) su actividad en el grupo A en comparación con su grupo control ( $C_A$ ).

En el metabolismo aeróbico, el ayuno produjo un incremento significativo en la actividad CS, enzima implicado en el ciclo de Krebs.

Por lo que se refiere al metabolismo lipídico, los resultados muestran que la privación de alimento conlleva una disminución notable ( $P < 0.05$ ) en la actividad de los enzimas productores de NADPH, G6PDH y EM, mientras que el enzima lipolítico HOAD, manifestó un incremento significativo en su actividad en estas condiciones (A).

Finalmente, los enzimas del metabolismo de cuerpos cetónicos también se vieron afectados por el ayuno. Así, mientras que la actividad  $\beta$ -OHBDH aumentó significativamente con la privación de alimento, la actividad ACoAT mostró un patrón inverso ( $P < 0.05$ ).



En la realimentación no se observan diferencias significativas entre el grupo R y su control en ninguno de los enzimas ensayados, a excepción de la GDH, cuya actividad continuó siendo superior ( $P < 0.05$ ) en el grupo R respecto a su control ( $C_R$ ), y los enzimas HK y PK, que invirtieron la respuesta del ayuno, mostrando valores significativamente superiores en los dentones realimentados respecto de los grupos  $C_R$ .

#### *Músculo blanco*

Los resultados presentados en la Tabla IV-45, correspondientes a músculo blanco, revelan un claro efecto del ayuno sobre los enzimas PK, FBPasa, GK, GDH, GOT, CS, EM y HOAD, cuyas actividades fueron significativamente inferiores en el grupo privado de alimento (A) respecto del control ( $C_A$ ). Las actividades del resto de enzimas analizados, HK, GPT, G6PDH y ACoAT, no se vieron afectadas por esta situación nutricional. En ningún caso se detectó actividad  $\beta$ -OHBDH.

Los cambios en las actividades enzimáticas inducidas por el ayuno desaparecieron tras la realimentación, excepto para la GDH donde aparecen de nuevo diferencias significativas del grupo R respecto al control, pero en este caso con valores inferiores en los controles. El resto de actividades enzimáticas que no variaron por el efecto del ayuno, tampoco lo hicieron con la realimentación, a excepción del enzima HK, que presentó mayor actividad en  $C_R$  que en R ( $P < 0.05$ ).

#### *Corazón*

En la Tabla IV-46 se muestra el efecto del ayuno y la realimentación sobre los enzimas del metabolismo intermediario en corazón de dentón. Tras el periodo de ayuno, los enzimas HK, PK, FBPasa, GOT, GPT y G6PDH presentaron actividades significativamente inferiores respecto al grupo control ( $C_A$ ). El resto de enzimas analizados no reflejaron diferencias estadísticas como consecuencia de la privación de alimento. Después del periodo de realimentación, HK, PK, FBPasa, GOT, GPT y G6PDH presentaron valores de actividad similares en los grupos  $C_R$  y R. El resto de enzimas continuó sin presentar cambios significativos tras la realimentación, excepto en el caso de los enzimas HOAD y ACoAT, donde los animales realimentados mostraron valores inferiores de actividad en comparación con los del grupo control.

Tabla IV-44. Actividad específica de enzimas relacionados con el metabolismo intermediario en hígado de dentón sometido a ayuno y posterior realimentación. Los datos se expresan como mU mg proteína<sup>-1</sup>.

Grupo	HK	PK	FBPasa	GK	GDH	GOT	GPT	CS	G6PDH	EM	HOAD	ACoAT	β-OHBDH
<b>C<sub>A</sub></b>	4.58 ± 0.38	31.96 ± 2.81	87.88 ± 5.92	30.40 ± 1.31	290.0 ± 23.6	484.1 ± 42.2	388.2 ± 26.3	18.14 ± 0.40	52.04 ± 4.50	7.89 ± 0.29	39.02 ± 3.18	33.39 ± 1.87	3.81 ± 0.58
<b>A</b>	1.53* ± 0.15	23.62* ± 1.66	82.00* ± 5.29	37.22* ± 0.94	353.7* ± 13.9	625.7* ± 36.9	203.6* ± 7.9	23.20* ± 1.46	22.95* ± 3.21	3.91* ± 0.19	87.01* ± 5.52	22.90* ± 1.51	10.28* ± 1.23
<b>C<sub>R</sub></b>	1.93 ± 0.25	21.44 ± 1.32	79.51 ± 1.29	28.17 ± 2.31	198.8 ± 10.2	373.5 ± 22.2	292.7 ± 15.7	17.08 ± 0.62	63.74 ± 7.19	7.53 ± 1.08	28.96 ± 0.70	35.56 ± 1.42	4.42 ± 0.34
<b>R</b>	2.50* ± 0.11	28.20* ± 1.47	72.34 ± 2.77	29.12 ± 1.99	273.9* ± 17.3	464.8 ± 27.4	320.0 ± 10.8	19.00 ± 0.62	56.53 ± 4.15	8.35 ± 0.35	33.68 ± 1.69	37.37 ± 2.29	6.50 ± 0.64

Los resultados son media ± E.S. (n = 8). Los asteriscos indican diferencias significativas (P<0.05) del ayuno o la realimentación respecto a su control.

Tabla IV-45. Actividad específica de enzimas relacionados con el metabolismo intermediario en músculo blanco de dentón sometido a ayuno y posterior realimentación. Los datos se expresan como mU mg proteína<sup>-1</sup>.

Grupo	HK	PK	FBPasa	GK	GDH	GOT	GPT	CS	G6PDH	EM	HOAD	ACoAT	β-OHBDH
<b>C<sub>A</sub></b>	0.64	3828.9	10.17	201.8	6.92	176.9	7.29	21.13	0.38	7.76	5.37	1.35	No
	± 0.05	± 218.1	± 0.67	± 16.6	± 0.33	± 13.4	± 0.79	± 1.69	± 0.02	± 0.74	± 0.41	± 0.08	detectada
<b>A</b>	0.54	1851.8 *	6.57 *	88.8 *	5.06 *	113.8 *	6.59	14.79 *	0.44	5.61 *	4.13 *	1.50	"
	± 0.04	± 115.9	± 0.55	± 6.1	± 0.45	± 11.5	± 0.56	± 1.07	± 0.04	± 0.50	± 0.25	± 0.12	"
<b>Cr</b>	1.00	3130.6	11.05	98.3	5.02	152.6	6.44	18.65	0.38	6.69	4.56	1.42	"
	± 0.10	± 359.3	± 1.07	± 3.9	± 0.44	± 5.0	± 0.68	± 0.13	± 0.03	± 0.68	± 0.58	± 0.12	"
<b>R</b>	0.59 *	2959.6	9.62	128.1	7.96 *	170.9	6.03	22.15	0.32	7.29	5.29	1.89 *	"
	± 0.06	± 235.8	± 0.82	± 10.0	± 0.78	± 13.1	± 0.27	± 1.22	± 0.03	± 0.35	± 0.49	± 0.13	"

Los resultados son media ± E.S. (n = 8). Los asteriscos indican diferencias significativas (P<0.05) del ayuno o la realimentación respecto a su control.

Tabla IV-46. Actividad específica de enzimas relacionados con el metabolismo intermediario en corazón de dentón sometido a ayuno y posterior realimentación. Los datos se expresan como mU mg proteína<sup>-1</sup>.

Grupo	HK	PK	FBPasa	GK	GDH	GOT	GPT	CS	G6PDH	EM	HOAD	ACoAT	β-OHBDH
<b>C<sub>A</sub></b>	3.38 ± 0.31	734.1 ± 25.3	1.69 ± 0.22	38.66 ± 3.59	62.98 ± 5.48	790.4 ± 33.2	10.16 ± 0.95	149.5 ± 4.3	5.38 ± 0.17	18.18 ± 0.96	27.59 ± 0.84	7.98 ± 0.25	1.60 ± 0.13
<b>A</b>	1.83* ± 0.20	465.8 ± 25.2	1.04* ± 0.14	32.26 ± 3.08	50.72 ± 2.67	632.4* ± 38.1	7.07* ± 0.66	162.2 ± 10.4	4.20* ± 0.17	18.49 ± 0.85	30.73 ± 1.60	8.34 ± 0.60	2.07 ± 0.29
<b>C<sub>R</sub></b>	2.87 ± 0.37	809.8 ± 18.4	1.18 ± 0.21	40.90 ± 2.99	64.42 ± 8.08	919.4 ± 73.0	12.95 ± 1.11	134.8 ± 5.1	5.42 ± 0.48	20.87 ± 0.18	28.56 ± 2.26	9.03 ± 0.48	2.43 ± 0.57
<b>R</b>	3.45 ± 0.63	776.2 ± 22.8	1.05 ± 0.11	45.68 ± 2.49	66.03 ± 4.37	842.3 ± 61.0	10.31 ± 0.85	137.2 ± 5.0	4.99 ± 0.26	18.91 ± 0.92	22.18* ± 0.81	7.68* ± 0.32	2.18 ± 0.22

Los resultados son media ± E.S. (n = 8). Los asteriscos indican diferencias significativas (P<0.05) del ayuno o la realimentación respecto a su control.

### 4.3.7. Estado redox

#### Hígado

Los resultados obtenidos (Tabla IV-47) indican un incremento significativo en la actividad específica de los enzimas antioxidantes hepáticos SOD, CAT y GPX, para el grupo sometido a ayuno en relación con su grupo control ( $C_A$ ). En el caso de la GR también existen diferencias estadísticas entre grupos, aunque contrariamente a los otros enzimas, los valores observados son menores en el grupo A que en  $C_A$ . Tras la realimentación, no se mostraron diferencias entre los grupos R y  $C_R$  en ninguno de los enzimas antioxidantes.

Tabla IV-47. Actividad específica de enzimas antioxidantes en hígado de dentón sometido a ayuno y posterior realimentación.

<b>Grupo</b>	<b>SOD</b> (U mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>CAT</b> (U mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>GPX</b> (mU mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>GR</b> (mU mg proteína <sup>-1</sup> )
<b><math>C_A</math></b>	173.6 ± 8.7	249.5 ± 14.1	57.51 ± 2.28	15.31 ± 0.96
<b>A</b>	245.8 ± 13.0 *	305.2 ± 16.2 *	87.52 ± 4.18 *	7.23 ± 0.58 *
<b><math>C_R</math></b>	146.3 ± 6.5	201.8 ± 12.8	55.02 ± 0.95	12.52 ± 1.51
<b>R</b>	141.5 ± 4.3	199.9 ± 5.1	60.68 ± 3.19	15.12 ± 1.14

Los resultados son media ± E.S. (n = 8). Los asteriscos indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) del ayuno o la realimentación respecto a su control.

En relación con el daño oxidativo a lípidos en hígado, los resultados (Tabla IV-48) muestran que los mayores niveles de MDA ( $P < 0.05$ ) aparecieron en el grupo sometido a ayuno (A). Tras el periodo de realimentación, tales diferencias entre grupos desaparecieron. En el caso del daño oxidativo a proteínas, no se detectó ninguna influencia de la situación nutricional sobre el contenido en grupos carbonilo.

Tabla IV-48. Indicadores de daño oxidativo a lípidos y proteínas hepáticas de dentón sometido a ayuno y posterior realimentación.

<b>Grupo</b>	<b>Peroxidación lipídica</b> (nmol MDA g tejido <sup>-1</sup> )	<b>Grupos carbonilo</b> (nmol C=O mg proteína <sup>-1</sup> )
<b>C<sub>A</sub></b>	24.16 ± 3.26	2.23 ± 0.22
<b>A</b>	148.03 ± 28.35 *	1.90 ± 0.22
<b>C<sub>R</sub></b>	33.56 ± 9.44	2.64 ± 0.25
<b>R</b>	30.65 ± 4.21	2.29 ± 0.43

Los resultados son media ± E.S. (n = 8). Los asteriscos indican diferencias significativas (P<0.05) del ayuno o la realimentación respecto a su control.

### *Músculo blanco*

No se detectaron diferencias en las actividades enzimáticas musculares SOD, GPX y GR, ni en la concentración de MDA entre los dentones sometidos a ayuno y los alimentados (Tabla IV-49). Después del periodo de realimentación, aparecieron diferencias significativas entre grupos tanto en las enzimas SOD y GR (mayor actividad en R que en C<sub>R</sub>) como en la concentración de MDA (mayor concentración en C<sub>R</sub> que en R). No se detectó actividad CAT en ningún caso.

Tabla IV-49. Actividad específica de enzimas antioxidantes e indicador de daño oxidativo a lípidos en músculo blanco de dentón sometido a ayuno y posterior realimentación.

<b>Grupo</b>	<b>SOD</b> (U mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>CAT</b> (U mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>GPX</b> (mU mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>GR</b> (mU mg proteína <sup>-1</sup> )	<b>Peroxidación lipídica</b> (nmol MDA g tejido <sup>-1</sup> )
<b>C<sub>A</sub></b>	6.13 ± 0.53	No detectada	87.58 ± 9.97	1.06 ± 0.08	27.76 ± 1.12
<b>A</b>	7.20 ± 0.63	"	72.78 ± 4.60	1.33 ± 0.11	26.80 ± 1.81
<b>C<sub>R</sub></b>	9.85 ± 0.90	"	75.14 ± 7.16	0.70 ± 0.06	38.49 ± 1.13
<b>R</b>	12.26 ± 0.54 *	"	89.75 ± 3.23	1.41 ± 0.10 *	30.37 ± 1.36 *

Los resultados son media ± E.S. (n = 8). Los asteriscos indican diferencias significativas (P<0.05) del ayuno o la realimentación respecto a su control.

### Corazón

Según los resultados obtenidos (Tabla IV-50), la situación de ayuno (A) indujo un aumento significativo de la actividad CAT en corazón en comparación con aquellos valores obtenidos para el grupo control ( $C_A$ ). Sin embargo, los enzimas GPX y GR muestran un patrón inverso al de la CAT, siendo los valores del grupo A inferiores ( $P < 0.05$ ) a los de  $C_A$ . En el caso del enzima SOD no existieron diferencias significativas producidas por esta situación nutricional. Sin embargo, tras la realimentación, aparecieron diferencias ( $P < 0.05$ ) en la SOD, cuya actividad fue significativamente superior en el grupo  $C_R$  respecto al R. La actividad CAT continuó siendo superior en el grupo realimentado, mientras que las diferencias observadas durante el ayuno en los enzimas GPX y GR desaparecieron tras la realimentación.

Tabla IV-50. Actividad específica de enzimas antioxidantes en corazón de dentón sometido a ayuno y posterior realimentación.

Grupo	SOD	CAT	GPX	GR
	(U mg proteína <sup>-1</sup> )	(U mg proteína <sup>-1</sup> )	(mU mg proteína <sup>-1</sup> )	(mU mg proteína <sup>-1</sup> )
$C_A$	232.2 ± 18.0	9.42 ± 0.47	92.30 ± 4.09	3.62 ± 0.12
<b>A</b>	170.2 ± 23.8	13.25 ± 1.23 *	78.62 ± 4.54 *	2.47 ± 0.06 *
$C_R$	290.4 ± 23.3	8.80 ± 0.42	73.89 ± 6.69	3.69 ± 0.25
<b>R</b>	137.9 ± 16.7 *	10.28 ± 0.26 *	70.55 ± 1.71	3.70 ± 0.19

Los resultados son media ± E.S. (n = 8). Los asteriscos indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) del ayuno o la realimentación respecto a su control.

En la Tabla IV-51 se muestran los resultados referentes al daño oxidativo a lípidos en corazón como consecuencia del ayuno, observándose valores significativamente superiores en el grupo privado de alimento. Tales diferencias desaparecieron tras la realimentación. No se detectó ninguna influencia de la situación nutricional sobre el daño oxidativo a proteínas en corazón (contenido en grupos carbonilo).

Tabla IV-51. Indicadores de daño oxidativo a lípidos y proteínas en corazón de dentón sometido a ayuno y posterior realimentación.

<b>Grupo</b>	<b>Peroxidación lipídica</b> (nmol MDA g tejido <sup>-1</sup> )	<b>Grupos carbonilo</b> (nmol C=O mg proteína <sup>-1</sup> )
<b>C<sub>A</sub></b>	27.91 ± 1.54	4.07 ± 0.66
<b>A</b>	58.88 ± 7.33 *	3.08 ± 0.40
<b>C<sub>R</sub></b>	24.53 ± 3.18	2.86 ± 0.41
<b>R</b>	23.09 ± 2.37	1.94 ± 0.30

Los resultados son media ± E.S. (n = 8). Los asteriscos indican diferencias significativas (P<0.05) del ayuno o la realimentación respecto a su control.

### *Hemolisado*

En la Tabla IV-52 se muestran los resultados correspondientes al estado oxidativo (actividad de enzimas antioxidantes e indicadores de daño oxidativo) en hemolisado de dentones sometidos a ayuno y posterior realimentación. Como se puede observar, los enzimas SOD, CAT y GPX presentan diferencias significativas entre el grupo privado de alimento (A) y el control (C<sub>A</sub>), siendo los valores de actividad más elevados en C<sub>A</sub> que en A. Por su parte, el enzima GR mostró valores significativamente superiores en el grupo A. No se observaron efectos sobre la concentración de MDA. La realimentación supuso la inversión del patrón presentado tras el ayuno para los enzimas SOD y CAT. Así, los valores más elevados (P<0.05) aparecieron en el grupo realimentado. El enzima GPX continuó mostrando las mismas diferencias observadas en el ayuno. Ni el enzima GR ni la concentración de MDA reflejaron diferencias entre los grupos R y C<sub>R</sub>.

Tabla IV-52. Actividad específica de enzimas antioxidantes e indicador de daño oxidativo a lípidos en hemolisado de dentón sometido a ayuno y posterior realimentación.

<b>Grupo</b>	<b>SOD</b> (U mg Hb <sup>-1</sup> )	<b>CAT</b> (U mg Hb <sup>-1</sup> )	<b>GPX</b> (mU mg Hb <sup>-1</sup> )	<b>GR</b> (mU mg Hb <sup>-1</sup> )	<b>Peroxidación lipídica</b> (nmol MDA ml <sup>-1</sup> )
<b>C<sub>A</sub></b>	17.99 ± 0.34	212.9 ± 30.0	765.4 ± 29.7	14.72 ± 1.37	160.6 ± 4.5
<b>A</b>	13.71 ± 0.51 *	142.1 ± 6.1 *	649.6 ± 27.2 *	19.81 ± 0.67 *	187.3 ± 10.6
<b>C<sub>R</sub></b>	10.44 ± 0.99	105.0 ± 0.7	590.0 ± 32.5	25.33 ± 2.32	200.8 ± 12.9
<b>R</b>	15.51 ± 0.67 *	200.5 ± 19.2 *	423.3 ± 31.1 *	20.97 ± 1.23	181.8 ± 8.3

Los resultados son media ± E.S. (n = 8). Los asteriscos indican diferencias significativas (P<0.05) del ayuno o la realimentación respecto a su control.



#### 4.3.8. Patrón isoenzimático de la SOD

Los resultados obtenidos tras la determinación del patrón isoenzimático de la SOD en hígado, músculo blanco, corazón y hemolisado de dentón, se muestran en la Figura IV-17. Como se puede observar, existen dos isoenzimas SOD de carácter constitutivo (CuZn-SOD y Mn-SOD), puestos de manifiesto en hígado, músculo blanco y corazón, sin diferencias entre grupos. No obstante, en el tejido hepático, y para cada una de las situaciones nutricionales, se observa la aparición de una tercera isoforma SOD, CuZn-SOD II. En cuanto al hemolisado, el revelado electroforético mostró la existencia de una única isoforma SOD, CuZn-SOD I, sin que existan diferencias entre grupos.

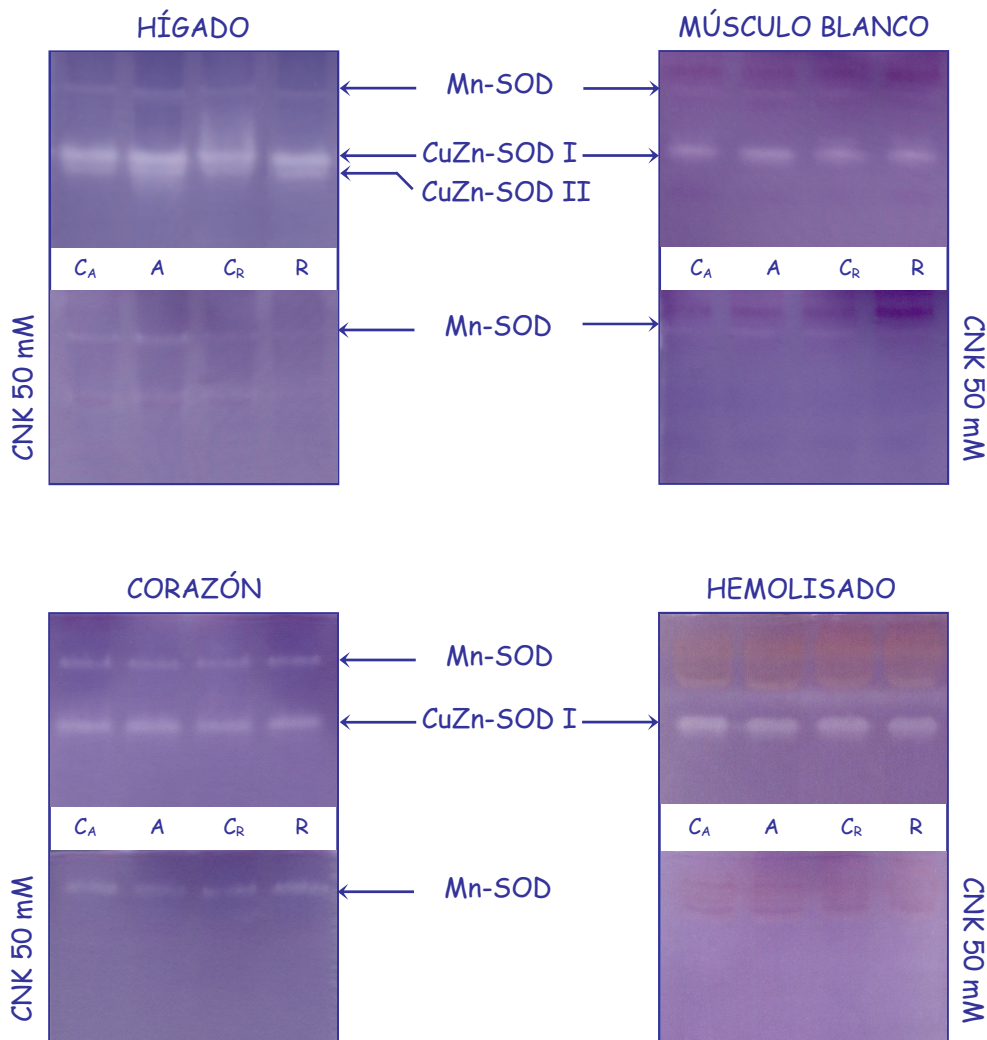


Figura IV-17. Patrón isoenzimático de la SOD generado por las diferentes condiciones experimentales, en los tejidos de hígado, músculo blanco, corazón y hemolisado de dentón. La fotografía inferior en cada uno de los tejidos correspondería al gel incubado para inhibición en solución 50 mM CNK.

## 4.4. DISCUSIÓN

### 4.4.1. Ayuno

Una consecuencia de la privación de alimento es la pérdida de peso corporal debida al uso de las reservas energéticas para el mantenimiento de las funciones vitales. Así, al igual que en estudios realizados en otras especies (Navarro y Gutiérrez, 1995; Vigliano et al., 2002), los resultados del presente ensayo muestran una reducción significativa tanto en el peso final de los animales como en los índices de crecimiento analizados (Figura IV-18).



Figura IV-18. Efecto del ayuno sobre distintos índices de crecimiento en dentón. Los datos son presentados como % de variación de los distintos parámetros en los animales sometidos a ayuno respecto a su grupo control (0 %).

No obstante, existen evidencias de que, como en mamíferos, la actividad física de los peces disminuye durante el ayuno prolongado (Novak et al., 2005) lo que implicaría ajustes en los sistemas biológicos, incluido el metabolismo. En este sentido, como se discutirá ampliamente más adelante, la mayoría de los enzimas del metabolismo intermediario evaluados en el presente estudio en aquellos tejidos directamente relacionados con la actividad física (músculo blanco y corazón) reflejaron una situación de depresión metabólica general en los peces sometidos a ayuno. Esta reducción de la tasa metabólica constituiría una estrategia para preservar las reservas corporales, con la consecuente minimización de la pérdida de peso. Dado que las pérdidas de peso en el presente estudio ( $0.17\% \text{ día}^{-1}$ ) son muy inferiores a las indicadas para otras especies como dorada ( $0.63\% \text{ día}^{-1}$ ) o trucha ( $0.82\% \text{ día}^{-1}$ ) de un peso medio similar (Power et al., 2000; Pottinger et al., 2003), los resultados podrían reflejar una elevada capacidad de adaptación del dentón a esta situación nutricional.

Por otro lado, el ayuno también provocó una reducción significativa del índice de nutrición (IN), lo que, al igual que en otras especies, indicaría la movilización de las reservas energéticas corporales (Moon y Johnston, 1980; Bastrop et al., 1992; Guderley et al., 2003; Pottinger et al., 2003; Grigorakis y Alexis, 2005). Sin embargo, el resultado obtenido para este índice debe ser interpretado con precaución, ya que, como fue propuesto por Love (1980), el IN aisladamente no es una medida adecuada para representar efectos del ayuno. Así, otros autores no observaron variación en el IN pese a la pérdida de peso corporal (Gillis y Ballantyne, 1996; Power et al., 2000).

La movilización de las reservas energéticas en dentón durante el ayuno, se confirma por los resultados de distintos índices corporales y del análisis de composición hepática y muscular (Figura IV-19).

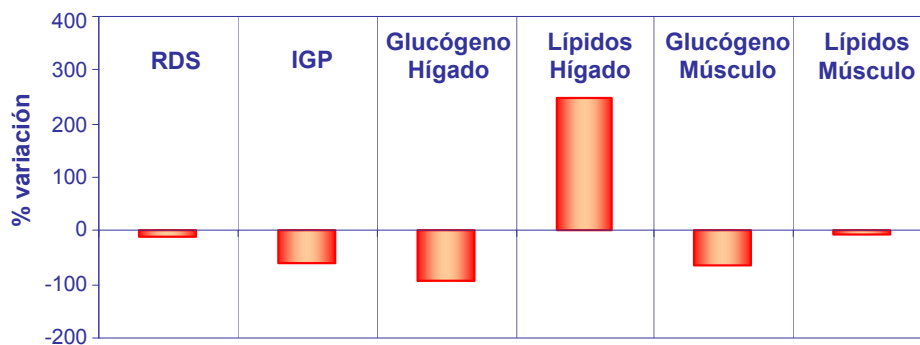


Figura IV-19. Efecto del ayuno sobre la relación digestivosomática (RDS), índice de grasa perivisceral (IGP) y el contenido en glucógeno y lípidos en hígado y músculo blanco en dentón. Los datos son presentados como % de variación de los distintos parámetros en los animales sometidos a ayuno respecto a su grupo control (0 %).

En este sentido, se observó que el ayuno resultó en una ligera disminución de la RDS, así como en una reducción significativa del IGP, indicando una considerable utilización de los lípidos periviscerales para la obtención de energía (Navarro y Gutiérrez, 1995; Vigliano et al., 2002), hecho respaldado por los resultados observados en los enzimas del metabolismo intermediario que se discutirán más adelante. Similares efectos han sido observados en especies como la lubina o la dorada, donde, tras tres semanas de ayuno, se produjo una significativa reducción del IGP (Gutiérrez et al., 1991; Grigorakis y Alexis, 2005).

Por otra parte, los datos de composición del músculo blanco reflejan la escasa importancia que juegan los lípidos de este tejido ante una situación de privación de alimento en una especie como el dentón, al menos en el tiempo experimentado. Así, el nivel de lípidos musculares no varió como consecuencia de un ayuno de cinco semanas. Echevarría et al. (1997) observaron una respuesta similar en el caso de lubinas sometidas a ayuno durante más de veintiuna semanas. Sin embargo, en dorada sí se observó una reducción del contenido lipídico muscular después de tres semanas de ayuno (Grigorakis y Alexis, 2005). Una vez más, se comprueba la necesidad de conocer las respuestas individuales de cada especie a las distintas situaciones nutricionales, debido a la diversidad de respuestas interespecíficas que existen (Navarro y Gutiérrez, 1995; Vigliano et al., 2002). En este sentido, mientras que en especies como *Brycon cephalus* los niveles de glucógeno muscular aumentan durante el ayuno (Figueiredo-Garutti et al., 2002), en el presente estudio la privación de alimento provocó una disminución del 65% del glucógeno muscular, que probablemente fue empleado para el mantenimiento de los propios procesos vitales de este tejido.

En cuanto al hígado, cabe destacar que la mera observación de este órgano refleja claras alteraciones morfológicas y de composición consecuencia de la privación de alimento. En la Figura IV-20, se puede observar el aspecto blanquecino del hígado de los dentones sometidos a ayuno comparado con el del grupo control, cuyo aspecto es considerado normal. El análisis de composición desveló la existencia de un espectacular incremento del contenido de lípidos hepáticos en los dentones privados de alimento (250%). Este hecho podría ser la causa fundamental que justificaría la naturaleza de la apariencia observada.



Figura IV-20. Aspecto del hígado de dentones sometidos a las diferentes situaciones nutricionales.

Exceptuando un estudio realizado en *Acanthopagrus schlegeli* (Deng et al., 2004), no nos consta que existan en bibliografía otras referencias donde se haya observado este fenómeno en peces. Deng et al. (2004) justificaron este hecho debido a una alteración del metabolismo lipídico inducida por la privación de alimento. Así, durante el ayuno, los ácidos grasos liberados al plasma a partir de los depósitos lipídicos de reserva podrían seguir dos caminos al llegar al hígado, ser directamente oxidados para la obtención de energía, o bien ser esterificados de nuevo en moléculas VLDL, produciéndose su acúmulo hepático.

Aunque no se conoce el mecanismo por el cual esto podría suceder, posiblemente, el exceso de ácidos grasos en el hígado podría sobrepasar la capacidad de oxidación de los mismos durante los procesos de ayuno, resultando en la acumulación hepática de parte de estos lípidos, según el mecanismo que acabamos de describir. Si bien este incremento de lípidos hepáticos producidos por el ayuno apenas ha sido observado en peces, sí existen estudios realizados en mamíferos que lo respaldan. Así, Kalderon et al. (2000) observaron que, del flujo de ácidos grasos generados por la lipólisis de los tejidos adiposos de ratas durante el ayuno, tan solo el 36% fue utilizado para su oxidación. El resto se re-esterificó (57%) para volver a acumularse en el tejido adiposo o bien fue re-esterificado en VLDL (7%) acumulándose en el tejido hepático. Similares resultados han sido obtenidos en humanos (Diraison y Beylot, 1998).

Por otro lado, pese al aumento del contenido lipídico hepático, no se observaron alteraciones significativas inducidas por el ayuno en la RHS. Sin embargo, el patrón presentado por la mayoría de las especies sometidas a esta situación nutricional es una reducción generalizada de este índice como consecuencia de una disminución tanto de los lípidos (Segner et al., 1997; Power et al., 2000) como del glucógeno hepático (Soengas et al., 1996; Hung et al., 1997; Shimeno et al., 1997; Figueroa et al., 2000; Power et al., 2000; Figueiredo-Garutti et al., 2002; Metón et al., 2003; Pottinger et al., 2003; Pérez-Jiménez et al., 2007). La ausencia de efecto sobre la RHS en el presente estudio podría ser debida a la compensación que se produciría entre el aumento de lípidos con la notable disminución de glucógeno hepático observada. Así, casi la totalidad del glucógeno contenido en el hígado (94%) fue consumido como consecuencia del ayuno (Figura IV-19). Este hecho está de acuerdo con numerosos estudios en distintas especies de peces, que señalan a esta reserva energética como una

de las fuentes más importantes para la obtención de energía metabólica y para el mantenimiento de los niveles basales de glucemia, al menos durante las primeras fases del ayuno (Navarro y Gutiérrez, 1995; Vigliano et al., 2002). Por otra parte, la conservación de reservas de glucógeno hepático durante el ayuno prolongado, aún en mínimas cantidades, parece ser esencial para el mantenimiento de la integridad de los tejidos (Vigliano et al., 2002), lo que justificaría la preservación del 6% del glucógeno original observada.

Aunque el ayuno indujo una clara hipoglucemia (Figura IV-21), similar a la observada en la mayoría de este tipo de estudios (Soengas et al., 1996; Echevarría et al., 1997; Hung et al., 1997; Power et al., 2000; Figueiredo-Garutti et al., 2002; Pottinger et al., 2003; Pérez-Jiménez et al., 2007), los niveles de glucosa plasmática de los dentones no descendieron por debajo de los niveles basales establecidos para otras especies marinas (65-70 mg/dl) (Echevarría et al., 1997).

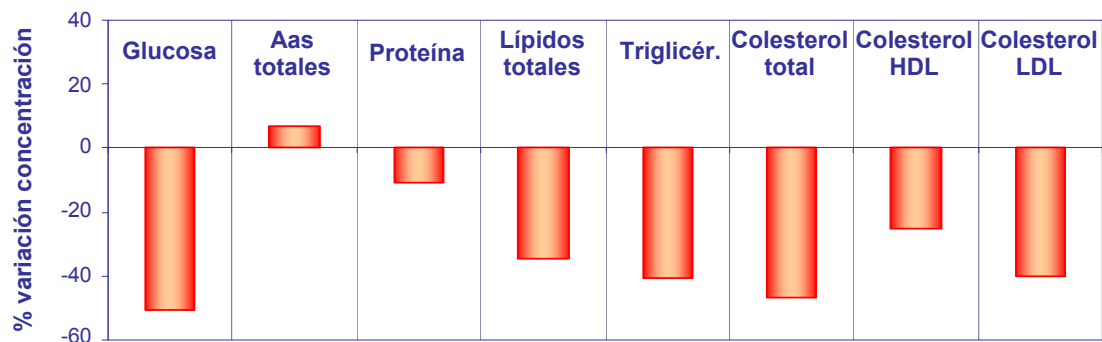


Figura IV-21. Efecto del ayuno sobre la concentración de metabolitos plasmáticos en dentón. Los datos son presentados como % de variación de los distintos parámetros en los animales sometidos a ayuno respecto a su grupo control (0 %).

Como indicábamos anteriormente, son muchos los estudios que han constatado que, en general, el mantenimiento de los niveles mínimos de glucosa plasmática durante las primeras fases del ayuno es, en gran medida, responsabilidad de la glucogenolisis de las reservas hepáticas (Hung et al., 1997; Shimeno et al., 1997; Power et al., 2000; Figueiredo-Garutti et al., 2002; Metón et al., 2003; Pottinger et al., 2003; Pérez-Jiménez

et al., 2007; Polakof et al., 2007). Sin embargo, una reducción en la tasa de utilización de esta glucosa es otra forma de preservar los niveles mínimos de este metabolito en sangre, además del proceso de gluconeogénesis que trataremos más adelante. Así, es ampliamente conocido que la hipoglucemia es una potente señal capaz de limitar la captación de glucosa circulante por las células de aquellos tejidos que no dependen de este metabolito, inhibiendo consecuentemente la actividad de los enzimas que lo degradan (Fideu et al., 1983; Moon et al., 1989; Sheridan y Mommsen, 1991; Soengas et al., 1996; Collins y Anderson, 1997; Pérez-Jiménez et al., 2007; Polakof et al., 2007). En este sentido, nuestros resultados muestran una clara inhibición de los enzimas glucolíticos HK (67%) y PK (26%), en el hígado de los dentones sometidos a ayuno prolongado (Figura IV-22).

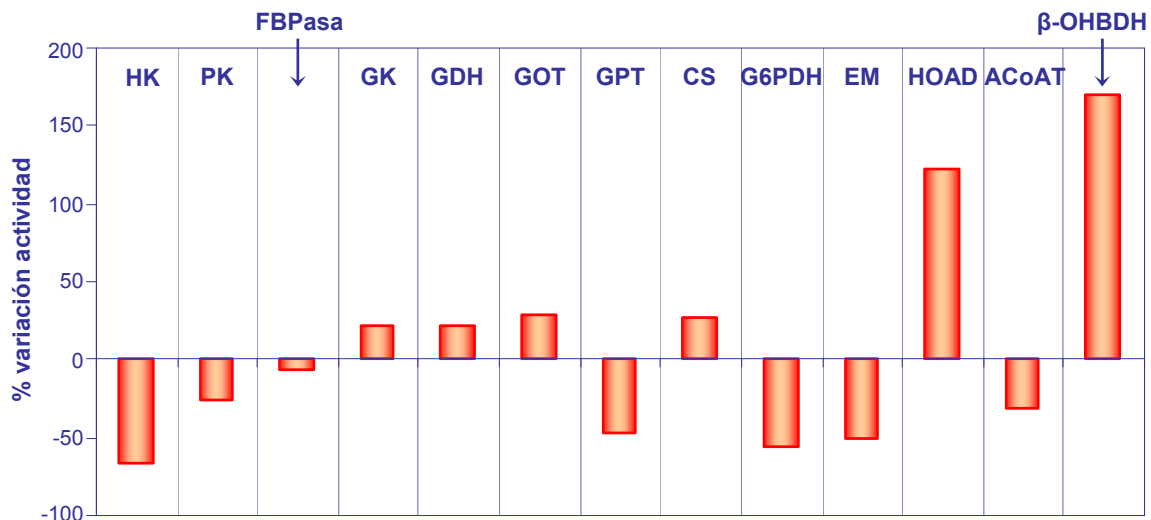


Figura IV-22. Efecto del ayuno sobre la actividad de enzimas clave del metabolismo intermediario en hígado de dentón. Los datos son presentados como % de variación de los distintos parámetros en los animales sometidos a ayuno respecto a su grupo control (0 %).

Los resultados de distintos estudios muestran una respuesta similar en otras especies sometidas a privación de alimento (Moon y Johnston, 1980; Sheridan y Mommsen, 1991; Collins y Anderson, 1997; Shimeno et al., 1997; Metón et al., 2003; Kirchner et al., 2005; Pérez-Jiménez et al., 2007; Polakof et al., 2007). Del mismo modo, el ayuno indujo una disminución del 56% en la actividad G6PDH hepática, contribuyendo, como en el caso de la inhibición de la glucólisis, a la reducción del empleo de glucosa en la

vía de las pentosas fosfato (Figura IV-22). Esta importante disminución de la actividad G6PDH se ha observado en otros peces como consecuencia de la privación de alimento (Bastrop et al., 1992; Viganò et al., 1993; Hung et al., 1997; Shimeno et al., 1997; Barroso et al., 1998; Caseras et al., 2002; Metón et al., 2003; Pérez-Jiménez et al., 2007). Además de la contribución al control de la glucosa plasmática, la inhibición de la actividad G6PDH podría tener otras consecuencias metabólicas, derivadas de la menor generación de NADPH por parte de este enzima. Así, estos resultados, junto con la menor actividad del EM, también responsable de la generación de NADPH para la síntesis de ácidos grasos, pueden ser utilizados como una medida indirecta que reflejaría la reducción en la actividad lipogénica hepática en los dentones sometidos a ayuno.

Como consecuencia directa, tanto de la ausencia de ingestión de alimento como de la inhibición en la síntesis de ácidos grasos, los lípidos plasmáticos analizados en el presente trabajo (lípidos totales, triglicéridos, colesterol total, HDL y LDL) disminuyeron en los dentones sometidos al ayuno (Figura IV-21), de acuerdo con lo observado en otras muchas especies (Zammit y Newsholme, 1979; Hung et al., 1997; Santulli et al., 1997; Shimeno et al., 1997; Pérez-Jiménez et al., 2007). En vertebrados superiores, se ha demostrado que los niveles de triglicéridos plasmáticos disminuyen al inhibirse la actividad de los enzimas lipogénicos (Herzberg, 1991), al igual que ocurre en el dentón y en el resto de estudios anteriormente expuestos. Sin embargo, otros autores observaron una respuesta inversa, encontrando un incremento o un mantenimiento de los niveles de este metabolito en especies como la lubina o la trucha arcoiris (Echevarría et al., 1997; Kirchner et al., 2005). Igualmente, también se han observado respuestas contrarias a esta tendencia generalizada para los niveles de colesterol total en otras especies (Mac Farlane et al., 1990).

Por otro lado, además de las reservas de glucógeno, las reservas lipídicas, y más concretamente los lípidos periviscerales, parecen jugar un papel fundamental para el dentón en la obtención de energía cuando los individuos son privados de alimento. Este hecho se confirma tanto por la importante reducción del IGP que comentábamos con anterioridad, como por el notable aumento de la  $\beta$ -oxidación (Figura IV-22). Así, el aumento del catabolismo lipídico hepático de los dentones del grupo de ayuno, reflejado en el notable aumento de la actividad del enzima HOAD (123%), indicaría el uso de las reservas lipídicas como fuente de energía fundamental para el mantenimiento del



animal, hecho generalizado en la mayoría de las especies de peces sometidas a ayuno (Navarro y Gutiérrez, 1995; Vigliano et al., 2002).

El aumento de la  $\beta$ -oxidación tiene como consecuencia la generación de grandes cantidades de acetil-CoA, que precisan ser oxidadas en el ciclo de Krebs para la obtención de energía. Para llevar a cabo este proceso, se precisan dos factores fundamentales. Por un lado, es necesaria la acción del enzima CS, encargado de condensar el acetil-CoA con el oxalacetato, introduciendo el producto en el ciclo de Krebs. El aumento significativo de la actividad CS hepática (28%) confirmaría una mayor incorporación de acetil-CoA al ciclo de Krebs, además del buen uso que esta especie es capaz de hacer de las reservas lipídicas (Figura IV-22). Por otro lado, además de la acción de la CS, la incorporación del acetil-CoA al ciclo de Krebs precisa, como acabamos de mencionar, de la existencia de un suministro suficiente de oxalacetato. En condiciones normales de alimentación, este oxalacetato procedería del piruvato derivado de la glucólisis pero, ya que la producción del piruvato se encuentra inhibida como consecuencia del ayuno, este oxalacetato podría proceder del aspartato a partir de la reacción catalizada por la GOT. Así, aunque la actividad GPT hepática disminuyó como consecuencia del ayuno, probablemente como una estrategia de protección para prevenir el exceso de oxidación de la proteína corporal, la actividad GOT en los animales ayunados presenta una actividad incrementada en igual proporción que la de la CS (29%) (Figura IV-22). De igual forma, la actividad GDH aumentó en un 22%, de acuerdo con la necesidad de desaminar el glutamato generado por los enzimas transaminasas, especialmente como consecuencia del incremento de la actividad GOT, regenerando igualmente el  $\alpha$ -cetoglutarato necesario para la continuidad de los procesos de transaminación.

Aunque no se observaron cambios en el nivel de aminoácidos en plasma, la concentración de proteínas plasmáticas disminuyó con el ayuno (Figura IV-21). Resultados similares fueron observados por Shimeno et al. (1997) en carpa. Sin embargo, otros autores indican un mantenimiento de los aminoácidos y/o de las proteínas plasmáticas en especies como la dorada y la trucha sometidas a privación de alimento (Power et al., 2000; Pottinger et al., 2003).

Por otro lado, se ha de destacar que, pese al decremento en la actividad GPT, la capacidad gluconeogénica del hígado se mantuvo en las condiciones de ayuno, no encontrándose cambios significativos en la actividad del enzima FBPasa hepática como consecuencia de la privación de alimento. Los resultados de otros estudios están de acuerdo con esta respuesta (Pérez-Jiménez et al., 2007). Sin embargo, según Navarro y Gutiérrez (1995), el patrón general presentado por la mayoría de los peces cuando son sometidos a un ayuno prolongado sería el contrario al observado en este caso. Así, en especies como salmón, carpa, dorada o trucha privadas de alimento, se observa un incremento de la actividad FBPasa (Soengas et al., 1996; Segner et al., 1997; Metón et al., 2003; Kirchner et al., 2005). De cualquier modo, el mantenimiento de esta actividad parece ser suficiente para mantener los niveles basales de glucosa plasmática. En este sentido, los sustratos empleados para la síntesis de glucosa, además de aminoácidos, podrían ser las grandes cantidades de glicerol derivadas de la hidrólisis de triglicéridos. Este hecho parece confirmarse por el aumento significativo de la actividad GK hepática, que incorporaría el glicerol a la vía gluconeogénica.

Dado que el aumento de las actividades CS y GOT es muy inferior al observado para  $\beta$ -oxidación, se podría pensar que no todo el acetyl-CoA generado en el proceso es capaz de ingresar en el ciclo de Krebs. Como el hígado tiene una cantidad limitada de coenzima A, si la mayor parte de este se encuentra ligado en forma de acetyl-CoA, disminuiría la  $\beta$ -oxidación por déficit de coenzima A libre. Para evitar esto, la producción y exportación de cuerpos cetónicos liberaría coenzima A, permitiendo continuar la oxidación de ácidos grasos (Vigliano et al., 2002). Harmon y Sheridan (1992) observaron un aumento de las concentraciones plasmáticas de acetoacetato que podría indicar un aumento en la actividad cetogénica hepática. En el presente ensayo, aunque se produjo una reducción de la actividad ACoAT, sí se observa un incremento significativo (170%) de la actividad  $\beta$ -OHBDH (Figura IV-22). Al igual que en el caso del dentón, también en salmón privado de alimento se observa un aumento de la actividad  $\beta$ -OHBDH (Soengas et al., 1996). Sin embargo, aún existe una gran controversia sobre el papel que juegan los cuerpos cetónicos en peces bajo condiciones de ayuno.

A la luz de los resultados, se podría afirmar que el hígado es el órgano regulador, desde el punto de vista metabólico, para hacer frente a la privación de alimento, ya que a

diferencia de éste, tanto en músculo blanco como en corazón las respuestas mostradas por la mayoría de los enzimas del metabolismo intermediario analizados se inhiben, en mayor o menor grado, como consecuencia del ayuno (Figura IV-23 y IV-24). Este hecho reflejaría un estado de depresión metabólica generalizada con el objetivo de minimizar el gasto energético bajo estas circunstancias.

No existen demasiados datos sobre el comportamiento de la maquinaria enzimática del corazón como consecuencia del ayuno. Sin embargo, a nivel muscular, las respuestas observadas coinciden con las encontradas en dentón. Así, Méndez y Wieser (1993), reportaron para *Rutilus rutilus*, un descenso en la actividad de enzimas de las vías glucolítica (PK y PFK), gluconeogénica (FBPasa) y del ciclo de Krebs (CS), mientras que otras como GOT y GPT permanecieron invariables, al menos durante las primeras etapas de ayuno (tres semanas). De igual forma, Lowery et al. (1987) encontraron una disminución significativa de los enzimas glucolíticos del músculo blanco en *Paralabrax nebulifer* sometido a privación de alimento. Similares resultados fueron observados por Moon y Johnston (1980) y Kiessling et al. (1991) en *Pleuronectes platessa* y *Oncorhynchus mykiss*, respectivamente. Yang y Somero (1993) también encontraron una reducción importante en los enzimas PK y CS en músculo blanco de *Scorpaena guttata* y *Sebastolous alascanus*.

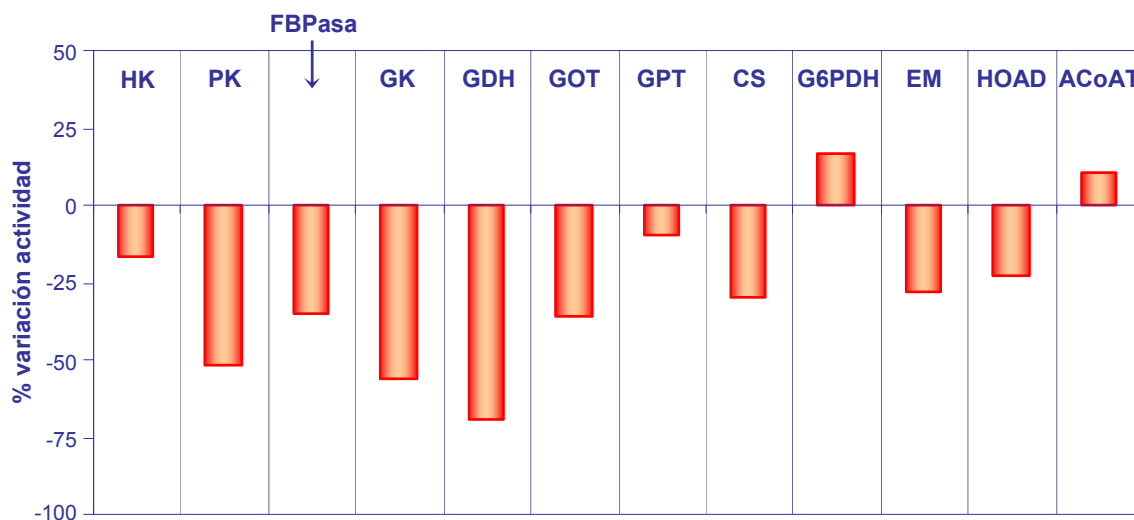


Figura IV-23. Efecto del ayuno sobre la actividad de enzimas clave del metabolismo intermediario en músculo blanco de dentón. Los datos son presentados como % de variación de los distintos parámetros en los animales sometidos a ayuno respecto a su grupo control (0 %).

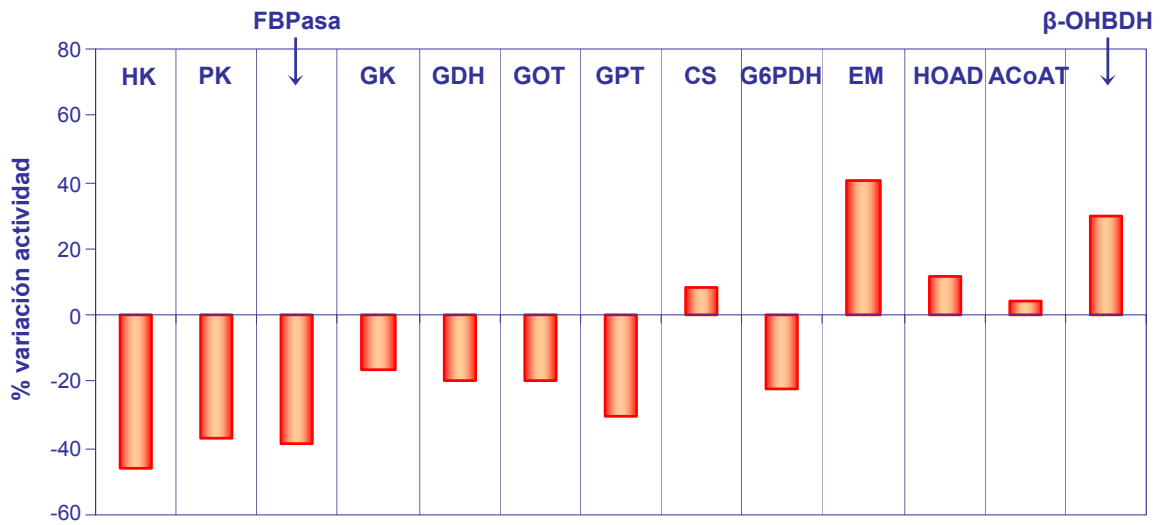


Figura IV-24. Efecto del ayuno sobre la actividad de enzimas clave del metabolismo intermediario en corazón de dentón. Los datos son presentados como % de variación de los distintos parámetros en los animales sometidos a ayuno respecto a su grupo control (0 %).

Por otro lado, a pesar del incremento en algunas de las actividades enzimáticas hepáticas, el descenso generalizado observado en el metabolismo cardíaco y muscular, que acabamos de comentar, implicaría una disminución en las necesidades de oxígeno para mantener el metabolismo aerobio, lo que implicaría una disminución en la necesidad de proteínas transportadoras de este elemento. Este hecho podría justificar los valores de hemoglobina ligeramente inferiores obtenidos en los peces sometidos a ayuno, al igual que la significativa disminución en el índice CHCM para estos animales (Figura IV-25).

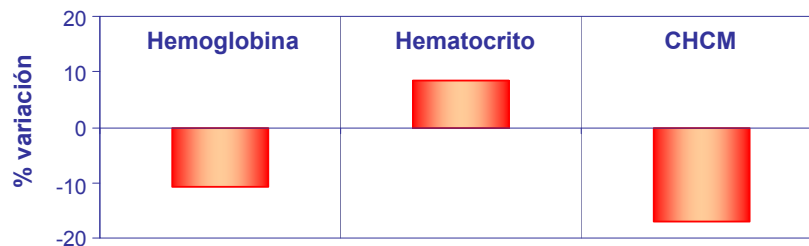


Figura IV-25. Efecto del ayuno sobre la concentración de hemoglobina y los índices hematocrito y CHCM en sangre de dentón. Los datos son presentados como % de variación de los distintos parámetros en los animales sometidos a ayuno respecto a su grupo control (0 %).

En cuanto al estado oxidativo en los dentones privados de alimento, una de las principales consecuencias del ajuste metabólico inducido por el ayuno podría ser un incremento en la generación de agentes oxidantes, especialmente ROS, en aquellos tejidos en los que se observó un metabolismo oxidativo incrementado. En condiciones normales, el organismo genera distintos tipos de agentes oxidantes como consecuencia de la actividad metabólica, principalmente aerobia. Para evitar los posibles daños celulares que pudieran causar dichos agentes, las células poseen un sistema de defensa consistente en una serie de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, encargados de eliminar estas moléculas. Por tanto, la determinación de dichas defensas en los dentones sometidos a ayuno, así como conocer los daños generados por los agentes oxidantes, permitirá establecer la capacidad de esta especie para enfrentarse exitosamente ante estas situaciones.

En este sentido, y al igual que en otras especies como la dorada (Pascual et al., 2003), los resultados de la actividad SOD hepática mostraron un notable incremento (42%) en aquellos dentones privados de alimento (Figura IV-26), posiblemente, como consecuencia del incremento en la tasa de generación de radicales superóxido por el acrecentado metabolismo oxidativo descrito bajo esta situación. Así, y como ya se expuso previamente al discutir el metabolismo intermediario hepático, el incremento en la actividad HOAD, enzima que interviene en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, junto con el aumento en la actividad CS, perteneciente al ciclo de Krebs, conducirían a una mayor generación de NADH y FADH<sub>2</sub>, los cuales entrarían en la cadena respiratoria mitocondrial para ser oxidados y generar ATP. En este sentido, la cadena respiratoria mitocondrial es una de las principales fuentes intracelulares de ROS (Ramasarma, 1982; Lenaz, 1998) ya que, bajo condiciones fisiológicas normales, entre el 1% y 4% del O<sub>2</sub> que reacciona en esta cadena es incompletamente reducido a radical superóxido (Ramasarma, 1982; Tiidus y Houston, 1994; Storey, 1996; Lee et al., 1997). Por ello, si consideramos las condiciones fisiológicas generadas por el ayuno, podría esperarse una mayor producción de este radical que induciría la activación de los mecanismos de defensa antioxidantes para prevenir los posibles daños que se pudieran generar.

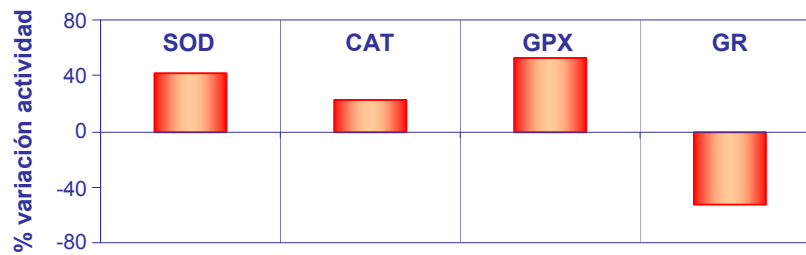


Figura IV-26. Efecto del ayuno sobre la actividad de enzimas de defensa antioxidante en hígado de dentón. Los datos son presentados como % de variación de los distintos parámetros en los animales sometidos a ayuno respecto a su grupo control (0 %).

Respecto a los enzimas CAT y GPX, también se observó un aumento de su actividad en hígado (22% y 52%, respectivamente), no sólo como consecuencia del incremento en el metabolismo oxidativo, sino también, y principalmente, como un mecanismo de defensa ante la mayor tasa de generación de  $H_2O_2$  producida por la reacción catalizada por la SOD (Figura IV-26). Similares incrementos en las actividades CAT y GPX hepáticas como consecuencia del ayuno han sido observados previamente en *Gadus morhua* (Guderley et al., 2003). Igualmente, Pascual et al. (2003) observaron incrementos en la actividad GPX hepática de doradas privadas de alimento. Sin embargo, los niveles de actividad GR hepática de los dentones privados de alimento presentaron una tendencia opuesta al del resto de enzimas antioxidantes (Figura IV-26), mostrando valores inferiores a los del grupo control. Similares resultados fueron observados en trucha arcoiris (Blom et al., 2000) mientras que, por el contrario, el ayuno indujo un aumento en la actividad de este enzima en hígado de dorada (Pascual et al., 2003). Si consideramos que la reacción catalizada por la GR es dependiente de NADPH, la disminución observada en la actividad hepática del enzima G6PDH podría justificar la respuesta de este enzima antioxidante. Así, la ruta de las pentosas fosfato ha sido considerada como la fuente predominante de generación del NADPH necesario para la defensa frente al estrés oxidativo (Pandolfi et al., 1995; Tian et al., 1999; Leopold y Loscalzo, 2000), por lo que podría esperarse que cualquier situación que inhiba la actividad G6PDH, y en consecuencia la producción de NADPH, también limite la actividad GR, impidiendo el reciclaje de glutation oxidado (GSSG) a glutation reducido (GSH).

Por otro lado, se ha demostrado que el NADPH protege a la catalasa de la inactivación (Gaetani et al., 1994; Kirkman et al., 1999), ya que cada uno de los cuatro monómeros de este enzima contiene un punto de unión al NADPH necesario para la actividad enzimática (Kirkman y Gaetani, 1984; Kirkman et al., 1999). En este sentido, se ha encontrado que el descenso en los niveles de NADPH se correlaciona con una menor actividad CAT en eritrocitos humanos (Gaetani et al., 1989). Así, aunque en el presente estudio se observó un incremento en la actividad CAT hepática de dentones privados de alimento, éste fue moderado, en comparación con aquellos experimentados por los enzimas SOD y GPX, por lo que la baja disponibilidad de NADPH, derivada de la inhibición de la G6PDH, podría evitar que la catalasa estuviera jugando su papel de retirada de  $H_2O_2$  a los niveles óptimos de actividad para esta enzima en este tejido. Estudios previos han observado que el ayuno induce cambios en la actividad hepática CAT en trucha arcoiris (Hidalgo et al., 2002). No obstante, Pascual et al. (2003) encontraron que en doradas con restricción parcial y total de comida, se inducía una significativa reducción en la actividad CAT en hígado de estos peces. El papel crucial de la G6PDH en la modulación de la respuesta celular al estrés oxidativo y en el mantenimiento de los niveles intracelulares de glutatión reducido ha sido confirmado en mamíferos (Gaetani et al., 1989; Vulliamy et al., 1992; Pandolfi et al., 1995; Tian et al., 1999; Salvemini et al., 1999; Leopold y Loscalzo, 2000).

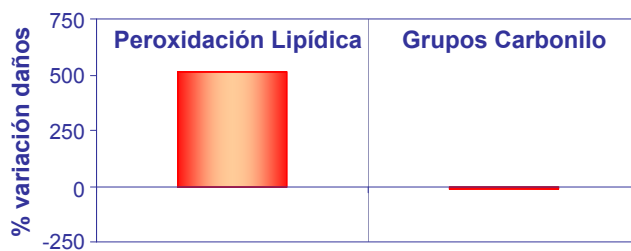


Figura IV-27. Efecto del ayuno sobre el daño oxidativo en hígado de dentón. Los datos son presentados como % de variación de los distintos parámetros en los animales sometidos a ayuno respecto a su grupo control (0 %).

El desequilibrio observado en el balance GSH vs. GSSG, junto a la disminución del nivel de glutatión endógeno que tiene lugar en los procesos de ayuno (Papadopoulos et al., 1997; Robinson et al., 1997; Vendemiale et al., 2001; Pascual et al., 2003) y la posible deficiencia de NADPH que

optimice la actividad CAT, podría conducir a una mayor vulnerabilidad del organismo al ataque de agentes oxidantes. En este sentido, los resultados de los niveles de MDA en hígado de dentones privados de alimento, índice común de daño oxidativo, muestran un espectacular aumento de la peroxidación lipídica (512%) (Figura IV-27).

Por tanto, debido a las “fisuras” en los mecanismos de protección que acabamos de indicar, la activación de los enzimas antioxidantes hepáticos SOD, CAT y GPX no fue suficiente para evitar que el ayuno prolongado condujera a un estado de estrés oxidativo en esta especie. Otros autores también han observado que la privación parcial o total de alimento produce un incremento en los niveles de MDA en hígado de especies como la trucha arcoiris (Hidalgo et al., 2002) o la dorada (Pascual et al., 2003). Por el contrario, Abele et al. (2007) no encontraron este incremento de la peroxidación lipídica en el hígado de *Scophthalmus maximus* cuando estos animales fueron privados parcialmente de alimento. Por otro lado, en el presente estudio no se registraron cambios en los niveles de grupos carbonilo, otro indicador válido del daño oxidativo a proteínas en peces (Fessard y Livingstone, 1998; Almroth et al., 2005; Parvez y Raisuddin, 2005, Parvez et al., 2006). Similares resultados fueron obtenidos por Abele et al. (2007), donde los niveles de grupos carbonilo no variaron en los animales sometidos a restricción parcial de alimento.

Al contrario que en el hígado, el músculo blanco no presentó variaciones ni en la actividad de las enzimas antioxidantes ni en el nivel de MDA, no registrándose daño oxidativo alguno provocado por la situación de ayuno (Figura IV-28). Guderley et al. (2003) observó esta misma respuesta en músculo blanco de *Gadus morhua*, donde ni la actividad CAT y la GPX fueron modificadas como consecuencia del ayuno. Esta ausencia de cambios, probablemente fue debida al descenso generalizado del metabolismo muscular que podría haber tenido como consecuencia una disminución en la tasa de generación de ROS.

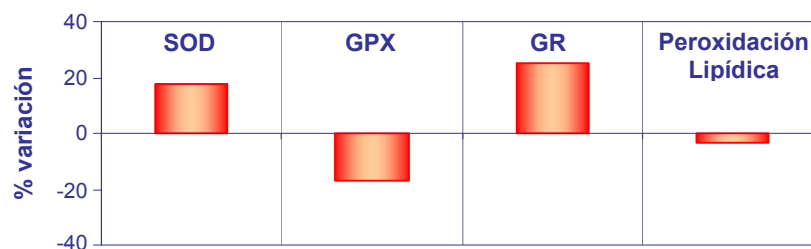


Figura IV-28. Efecto del ayuno sobre la actividad de enzimas antioxidantes y daño oxidativo en músculo blanco de dentón. Los datos son presentados como % de variación de los distintos parámetros en los animales sometidos a ayuno respecto a su grupo control (0 %).



Por su parte, al igual que en músculo blanco, en el corazón también se observó un descenso en la actividad de los principales enzimas del metabolismo intermediario. Sin embargo, aunque no hubo diferencias significativas, pudo observarse un ligero incremento en las actividades CS y HOAD, lo cual podría haber causado un aumento paralelo en la producción de ROS, al igual que ocurrió en el hígado. No obstante, la respuesta de los enzimas antioxidantes cardíacos fue distinta a la que observamos a nivel hepático (Figura IV-29). Así, mientras que las actividades GPX y GR disminuyeron, la actividad CAT aumentó, hecho que puede sorprender si consideramos que el principal papel desintoxicante de  $H_2O_2$  en el tejido cardíaco es asumido por el enzima GPX y no por la catalasa (Halliwell y Gutteridge, 2000). En base a estos resultados, sería aventurado decir que, en dentón, el enzima CAT es el encargado de asumir principalmente la defensa antioxidante en corazón, por lo que estudios futuros podrían aclarar este asunto. Por otra parte, la actividad SOD disminuyó ligeramente en el corazón de los dentones en ayuno. Así, a pesar del incremento en la actividad CAT, ésta podría ser insuficiente, de modo que, junto con la reducción en la actividad GPX, se podría acumular  $H_2O_2$  en el medio, inhibiendo, al menos parcialmente, la actividad SOD (Kono y Fridovich, 1982; Halliwell y Gutteridge, 2000).

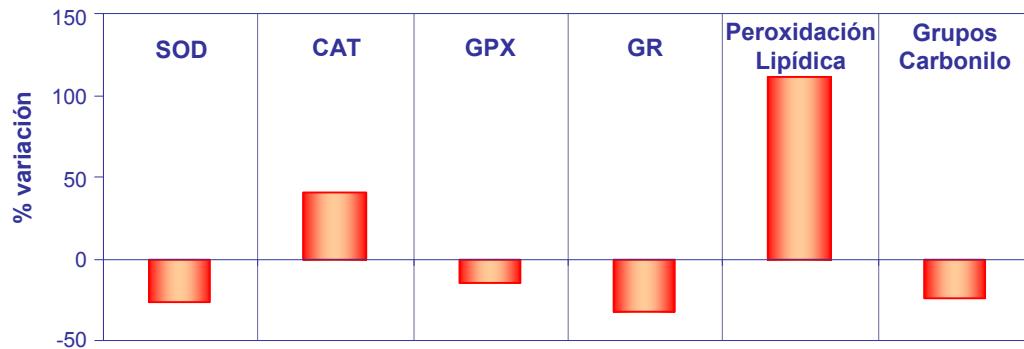


Figura IV-29. Efecto del ayuno sobre la actividad de enzimas antioxidantes y daño oxidativo en corazón de dentón. Los datos son presentados como % de variación de los distintos parámetros en los animales sometidos a ayuno respecto a su grupo control (0 %).

Los niveles de MDA observados en el tejido cardíaco estarían de acuerdo con este razonamiento, ya que se observó que, en corazón de dentones en ayuno, los niveles de peroxidación lipídica aumentaron. Si bien el incremento en la peroxidación de lípidos a nivel cardíaco no fue tan espectacular como en hígado, tan sólo un 111% frente al 512%

hepático, la balanza oxidativa volvió a inclinarse hacia la acumulación de agentes oxidantes e insuficientes defensas antioxidantes, provocando estrés oxidativo, como ya ocurrió con el hígado. No obstante, tampoco en el corazón se observaron daños a nivel proteico.

Respecto al hemolisado, todos los enzimas antioxidantes, a excepción de la GR, experimentaron una reducción en su actividad como consecuencia del ayuno (Figura IV-30). Este decremento es paralelo a la disminución observada en el contenido en hemoglobina (no significativa) y a la del índice CHCM. En este sentido, los índices eritrocitarios pueden ser empleados como indicadores de daño oxidativo, ya que los eritrocitos son uno de los lugares mas importantes en la producción de radicales libres (Saltman, 1989). Así, aunque el oxígeno se une de forma reversible a la hemoglobina para ser transportado a los tejidos, bajo condiciones fisiológicas normales, aproximadamente el 3% de la oxihemoglobina sufre autooxidación dando lugar a la generación de radicales superóxido (Ramasarma, 1982; Lenaz, 1998; Nagababu y Rifkind, 2000). Una reducción en la concentración de estas moléculas, como la observada en los dentones privados de alimento del presente estudio, podría reducir la generación de estos agentes oxidantes y, como consecuencia, la de los mecanismos de defensa antioxidante. Además, los valores de MDA en hemolisado no revelaron ningún daño oxidativo, por lo que estos resultados avalarían esta teoría.

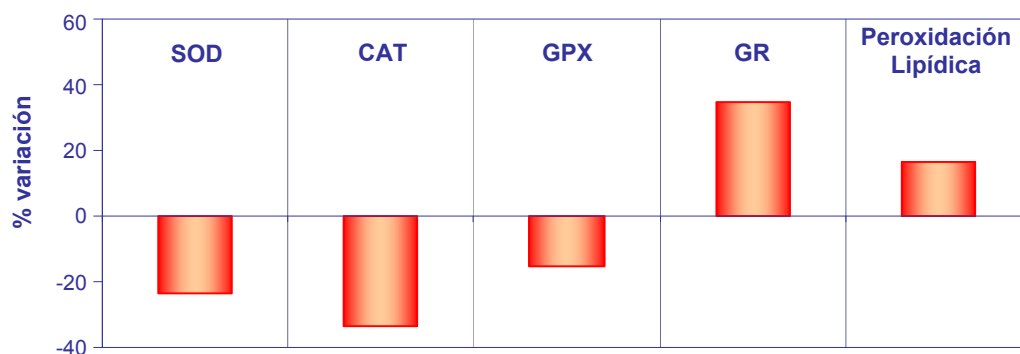


Figura IV-30. Efecto del ayuno sobre la actividad de enzimas antioxidantes y daño oxidativo en hemolisado de dentón. Los datos son presentados como % de variación de los distintos parámetros en los animales sometidos a ayuno respecto a su grupo control (0 %).

Finalmente, la privación de alimento no indujo cambios en el patrón isoenzimático de la SOD en ninguno de los tejidos de dentón analizados en el presente estudio. Sin embargo, en otros espáridos como la dorada, Pascual et al. (2003) observaron que el ayuno indujo cambios en el patrón isoenzimático de la SOD en el hígado, apareciendo dos nuevas isoenzimas Mn-SOD. No obstante, es importante resaltar que, al igual que en el ensayo anterior (ensayo IV-3), en comparación con el resto de tejidos, la intensidad manifestada por el isoenzima Mn-SOD es mayor en corazón, aunque en este caso menos evidente en músculo blanco. Como ya se indicó, la elevada cantidad de mitocondrias en estos tejidos justificaría este hecho (Halliwell y Gutteridge, 2000). Además, la edad/tamaño del animal parece ser un factor determinante no sólo sobre la actividad de distintas enzimas como la SOD (Navarro-Arévalo et al., 1999; Won et al., 2002), sino también en la expresión de sus diferentes isoformas. En este sentido, tanto en el hígado de los dentones del ensayo de vitamina C (ensayo IV-1), cuyo tamaño oscilaba entre 10 y 25 g, como en los del presente estudio (300-400 g), se ha observado la presencia de la isoforma CuZn-SOD II, la cual no se puso de manifiesto en tamaños intermedios (ensayos IV-2 y IV-3). Este hecho podría justificarse por la necesidad de activación de las defensas antioxidantes en estos tamaños. Así, animales de pequeño tamaño, por lo general, poseen un metabolismo acelerado que posee como última consecuencia una mayor producción de radicales libres. Igualmente, animales adultos acumulan estos residuos oxidativos, necesarios de eliminar.

#### 4.4.2. Realimentación

Tras tres semanas de realimentación, los peces compensaron las pérdidas de masa corporal, tal como reflejan los índices de incremento de peso y TCI, que fueron muy superiores a los presentados por los animales control (Figura IV-31). Este proceso de rápido crecimiento experimentado por los peces realimentados es conocido como “crecimiento compensatorio” (Ali et al., 2003). Además, en función de la clasificación

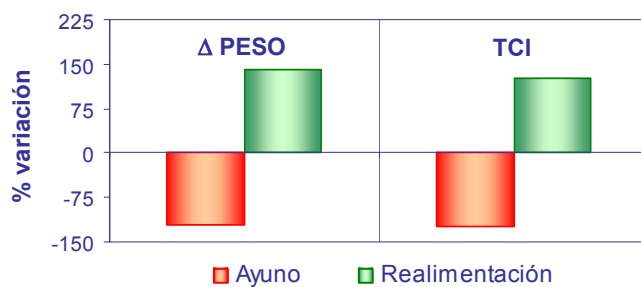


Figura IV-31. Efecto del ayuno y posterior realimentación en el crecimiento del dentón. Los datos son presentados como % de variación de los distintos parámetros en los animales sometidos a ayuno o realimentación respecto a su grupo control (0 %).

establecida dentro de este término (parcial, completo o sobrecompensación), y de acuerdo con los resultados obtenidos, en los que el peso final de ambos grupos, control y realimentados, no presentaron diferencias significativas, la respuesta generada sería considerada de crecimiento compensatorio completo (Ali et al., 2003).

El crecimiento compensatorio no sólo posee un interés teórico, sino también aplicado a la acuicultura (Ali et al., 2003). Además, este fenómeno ha sido observado en un amplio rango de especies de peces. Así, Nikki et al. (2004) confirmaron las observaciones realizadas por otros autores en estudios previos acerca de la eficaz respuesta del crecimiento compensatorio completo obtenida en trucha arcoiris durante la realimentación (Weatherley y Gill, 1981; Dobson y Holmes, 1984; Kindschi, 1988; Jobling y Koskela, 1996). Otros muchos autores también observaron esta respuesta en especies como *Ictalurus punctatus* (Kim y Lovell, 1995; Gaylord y Gatlin, 2001), *Salmo salar* (Nicieza y Metcalfe, 1997; Johansen et al., 2001), *Pagrus pagrus* (Rueda et al., 1998), *Scophthalmus maximus* (Saether y Jobling, 1999), *Carassius auratus* (Qian et al., 2000; Xie et al., 2001), *Gasterosteus aculeatus* (Zhu et al., 2001, 2003) y *Lates calcarifer* (Tian y Quin, 2003).

En el presente estudio, el motivo fundamental de la mejora del incremento de peso y la TCI, y por tanto del crecimiento compensatorio observado, no se debería tanto a una modificación del IC, sino más bien al notable incremento en la ingesta de alimento de los dentones realimentados, en comparación con aquellos del grupo control. Este incremento en el apetito, de los animales previamente privados de alimento, es una respuesta generalizada en la mayoría de las especies estudiadas (Weatherley y Gill, 1981; Jobling y Koskela, 1996; Ali et al., 2001; Xie et al., 2001; Tian y Quin, 2003; Zhu et al., 2003), incluyendo aquellas en las que el crecimiento compensatorio tan sólo fue parcial (Wang et al., 2000; Eroldogan et al., 2006). En base a todos estos resultados, la hiperfagia es una de las causas más importantes del crecimiento compensatorio (Ali et al., 2003). Además, es importante destacar que la respuesta de hiperfagia mostrada en el presente estudio, un incremento del 84% respecto al control, fue notablemente más intensa que la presentada por otras especies como la dorada o la trucha arcoiris (Nikki et al., 2004; Eroldogan et al., 2006), sugiriendo, por tanto, la posibilidad de emplear exitosamente estas técnicas de alimentación en el cultivo del dentón.

En términos generales, la mayoría del resto de parámetros evaluados en el presente ensayo se restablecieron tras la fase de realimentación, hecho que está de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores (Méndez y Wieser, 1993; Soengas et al., 1996; Collins y Anderson, 1997; Power et al., 2000; Metón et al., 2003; Pascual et al., 2003; Pottinger et al., 2003; Morales et al., 2004; Pérez-Jiménez et al., 2007). Sin embargo, algunos de ellos continuaron mostrando los efectos provocados por el ayuno. Así, mientras que el IN se recuperó completamente tras la realimentación, no sucedió lo mismo con el IGP (Figura IV-32). En este sentido, tres semanas de realimentación podrían no ser suficientes para restaurar la grasa perivisceral a los niveles normales presentados por los animales control.

Como en la mayoría de los estudios, los dentones del presente trabajo recuperaron los niveles de glucógeno hepático en su práctica totalidad (Figura IV-32), desapareciendo tras la realimentación las diferencias inducidas por el ayuno (Blasco et al., 1992; Soengas et al., 1996; Power et al., 2000; Metón et al., 2003; Pottinger et al., 2003). Sin embargo, en otros estudios se pueden observar respuestas diversas.

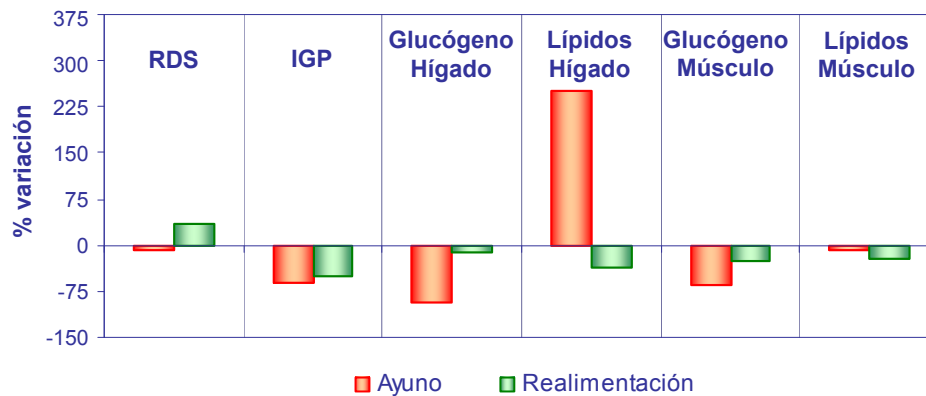


Figura IV-32. Efecto del ayuno y posterior realimentación en la relación digestivosomática (RDS), índice de grasa perivisceral (IGP) y contenido de glucógeno y lípidos en hígado y músculo blanco de dentón. Los datos son presentados como % de variación de los distintos parámetros en los animales sometidos a ayuno o realimentación respecto a su grupo control (0 %).

Así, Méndez y Wieser (1993) observaron que, tras siete días de realimentación, los valores de glucógeno hepático se incrementaron dramáticamente, llegando a ser hasta seis veces superiores al de los controles. No obstante, estos valores decrecieron hasta llegar a niveles similares al control después de catorce días de realimentación. Pérez-Jiménez et al. (2007) encontraron que la recuperación de los niveles de glucógeno hepático estaría igualmente influenciada por la composición nutricional de las dietas suministradas, pudiendo, tras la realimentación, superarse los valores control (dietas altas en carbohidratos) o bien no llegar a restaurar completamente las reservas glucogénicas en el tiempo ensayado (dietas bajas en carbohidratos). En otros estudios, tras la realimentación, los niveles de glucógeno hepático no se recuperaron en su totalidad (Doraswamy Reddy et al., 1988; Sheridan y Mommsen, 1991).

Por su parte, y al igual que en el caso de la grasa perivisceral, tres semanas de realimentación no fueron suficientes para restaurar completamente el glucógeno muscular a los niveles control, aunque la ingesta de alimento durante este tiempo supuso la recuperación del 73% del nivel control de este metabolito. Similares resultados fueron observados en *Rhamdia hilarii* (Machado et al., 1988).

En cuanto a las lesiones hepáticas causadas por la acumulación lipídica tras el ayuno, el suministro de un alimento continuado supuso la desaparición de las mismas, tal y como se puede observar, no sólo en los niveles de lípidos de los dentones realimentados (Figura IV-32), que llegaron a ser incluso menores a los del grupo control, sino también en la imagen de un hígado de dentón realimentado de la Figura IV-20. Aunque no existen estudios que justifiquen este hecho, probablemente, la disponibilidad de nutrientes suministrados en el alimento de los que poder extraer la energía necesaria, conllevaría la reducción en los procesos de  $\beta$ -oxidación, hecho que se refleja en la restauración de los valores de actividad del metabolismo intermediario, por lo que los lípidos acumulados en el hígado podrían ser liberados de nuevo, en un mecanismo inverso al producido en el ayuno, para acumularse en los tejidos de reserva lipídica del animal.

Por otro lado, distintos estudios muestran una rápida recuperación de los metabolitos plasmáticos tras pocos días de realimentación. Así, Soengas et al. (1996) y Power et al. (2000), observaron que tras quince y siete días de realimentación en salmón y dorada, respectivamente, los niveles de glucosa volvieron a equipararse a los valores control. Igualmente, Pérez-Jiménez et al. (2007) obtuvieron que, en lubina, tras doce días de realimentación los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol total, lípidos totales y aminoácidos fueron similares a los existentes antes del ayuno. En el presente estudio, sin embargo, la realimentación no hizo que se recuperaran totalmente los niveles de aquellos metabolitos que habían sido alterados por el ayuno, a excepción de la proteína y el colesterol HDL. Posiblemente, la combinación de un tiempo aún insuficiente de realimentación, junto con el continuo y necesario flujo de metabolitos sintetizados, transportados y almacenados en los tejidos de reserva, no permitió la completa estabilización de tales niveles para esta especie (Figura IV-33).

En cuanto al metabolismo intermediario, por lo general, en la mayoría de estudios sobre ayuno los peces son capaces de recuperar el perfil metabólico normal después de la realimentación (Méndez y Wieser, 1993; Soengas et al., 1996; Collins y Anderson, 1997; Metón et al., 2003; Pérez-Jiménez et al., 2007; Polakof et al., 2007). Igualmente, en el presente estudio, la realimentación revocó prácticamente todas las diferencias presentadas como consecuencia del ayuno en hígado, músculo blanco y corazón de los dentones (Figura IV-34, A, B y C).

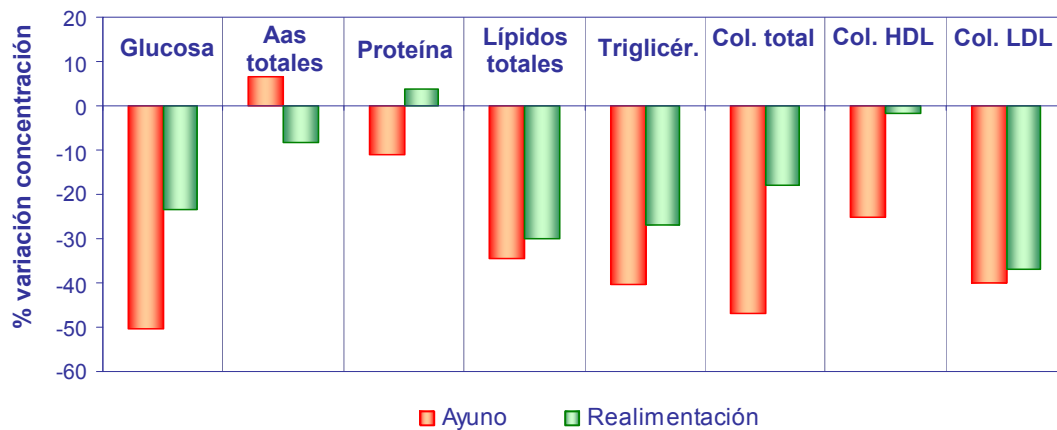


Figura IV-33. Efecto del ayuno y posterior realimentación en la concentración de metabolitos plasmáticos en dentón. Los datos son presentados como % de variación de los distintos parámetros en los animales sometidos a ayuno o realimentación respecto a su grupo control (0 %).

Sin embargo, tras la realimentación, algunos de los enzimas, en distintos tejidos, mostraron niveles de actividad diferentes a los del grupo control. Este es el caso de las actividades HK, PK y GDH en hígado, y de la GDH en músculo blanco, donde no sólo fueron restaurados los niveles de actividad disminuidos como resultado del ayuno, sino que fueron superiores incluso a los niveles control. Probablemente, estos resultados fueron consecuencia de la necesidad de metabolizar las mayores cantidades de glucosa y determinados aminoácidos derivados de la incrementada ingesta de alimento en el grupo de los realimentados, a la que nos referimos anteriormente. Resultados similares fueron observados en trucha arcoiris, donde las actividades HK, HK-IV y PK hepáticas aumentaron notablemente en los animales realimentados como consecuencia de la hiperfagia producida durante esta fase (Soengas et al., 2006; Polakof et al., 2007). En cuanto al metabolismo cardíaco, los animales realimentados presentaron actividades HOAD y ACoAT inferiores a las del grupo control, posiblemente como consecuencia de nuevo del incremento en la ingesta de alimento. Así, la alta disponibilidad de energía en estos animales, respecto del grupo control, disminuiría la necesidad de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, y, consecuentemente, de la actividad ACoAT, cuyo sustrato procede fundamentalmente del proceso anterior. Por otra parte, las diferencias observadas en los enzimas HK y ACoAT en el músculo blanco, inferiores en los dentones realimentados respecto al grupo control, pese a ser significativas no son destacables, ya que estos enzimas no juegan un papel esencial en el metabolismo muscular.



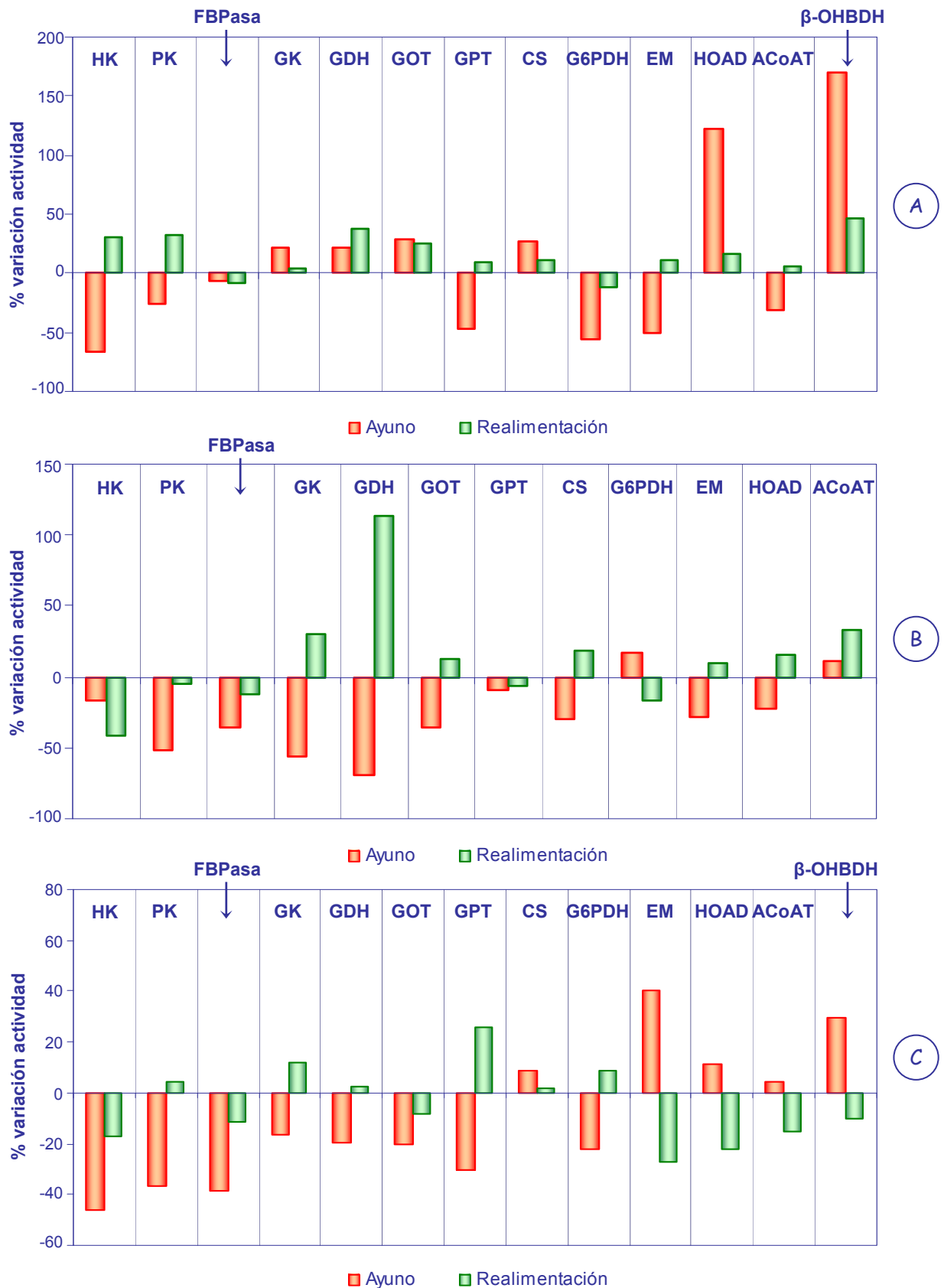


Figura IV-34. Efecto del ayuno y posterior realimentación sobre la actividad de enzimas clave del metabolismo intermediario en hígado (A), músculo blanco (B) y corazón (C) de dentón. Los datos son presentados como % de variación de los distintos parámetros en los animales sometidos a ayuno o realimentación respecto a su grupo control (0 %).

Respecto a los sistemas de defensa antioxidante y los índices de daño oxidativo en hígado, que fueron modificados por el ayuno, la realimentación restauró tanto la actividad de los enzimas antioxidantes como el nivel de MDA a los valores control (Figura IV-35), como había sido observado previamente en dorada (Pascual et al., 2003).

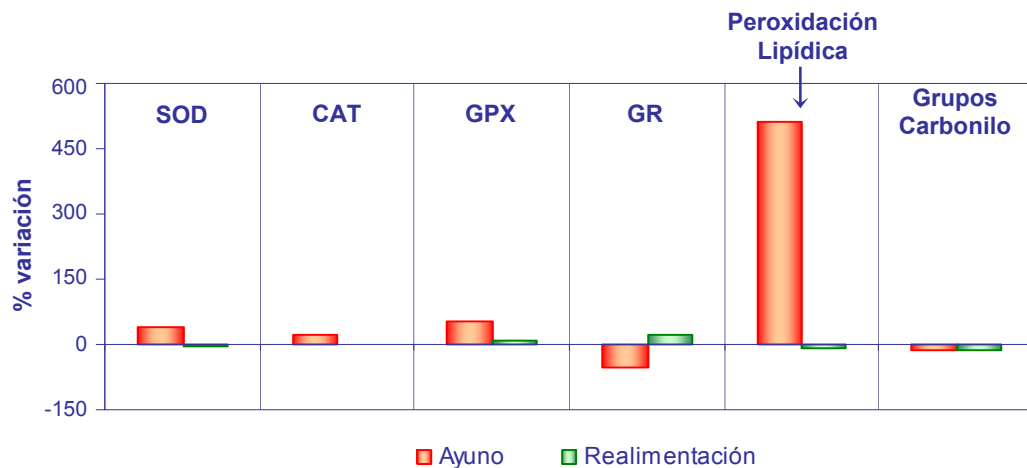


Figura IV-35. Efecto del ayuno y posterior realimentación sobre la actividad de enzimas antioxidantes y los daños oxidativos en hígado de dentón. Los datos son presentados como % de variación de los distintos parámetros en los animales sometidos a ayuno o realimentación respecto a su grupo control (0 %).

Por su parte, en músculo blanco, la realimentación supuso la aparición de diferencias significativas entre el grupo control y los dentones realimentados en la actividad SOD, GR y, en menor medida GPX (Figura IV-36). Probablemente, estos resultados son la respuesta a la recuperación metabólica del músculo blanco, en algunos casos superior al del grupo control, como consecuencia del aumento de actividad. El aumento en las defensas antioxidantes, respecto al grupo control, produjo una disminución de los niveles de peroxidación lipídica muscular en los animales realimentados.

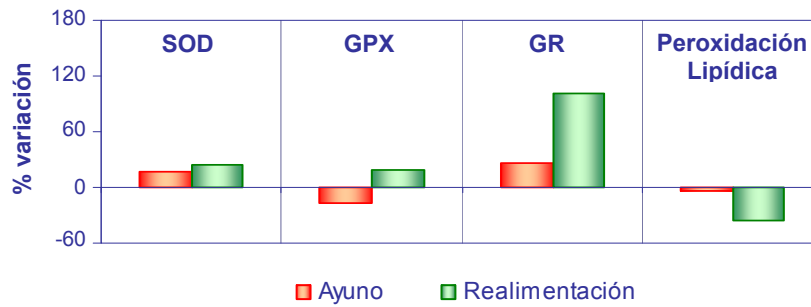


Figura IV-36. Efecto del ayuno y posterior realimentación sobre la actividad de enzimas antioxidantes y los daños oxidativos en músculo blanco de dentón. Los datos son presentados como % de variación de los distintos parámetros en los animales sometidos a ayuno o realimentación respecto a su grupo control (0 %).

Por otro lado, en corazón, aunque las actividades GPX y GR recuperaron los niveles normales y los daños oxidativos, indicados por el contenido en MDA, desaparecieron, tanto la actividad SOD como CAT continuaron aún mostrando los efectos del ayuno (Figura IV-37). Así, tres semanas de realimentación parecen no haber sido suficientes para eliminar la posible acumulación de  $H_2O_2$  producida durante el periodo de privación de alimento y, por tanto, el enzima SOD aún puede continuar inhibido, mientras que la catalasa mantiene elevada su actividad para intentar eliminar el exceso de  $H_2O_2$ .

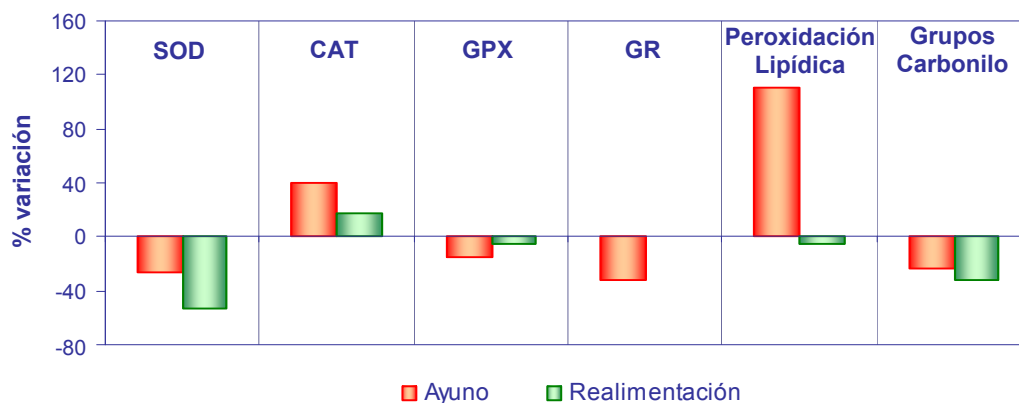


Figura IV-37. Efecto del ayuno y posterior realimentación sobre la actividad de enzimas antioxidantes y los daños oxidativos en corazón de dentón. Los datos son presentados como % de variación de los distintos parámetros en los animales sometidos a ayuno o realimentación respecto a su grupo control (0 %).

Finalmente, la realimentación resultó en un incremento significativo de las defensas antioxidantes SOD, CAT y GPX en hemolisado, respecto de los grupos control (Figura IV-38). Este hecho no mantiene el paralelismo mostrado durante el ayuno con los valores de hemoglobina y CHCM, ya que continúan siendo inferiores en los animales realimentados (Figura IV-39). Sin embargo, el aumento en los sistemas de defensa antioxidante podría justificarse, de nuevo, por el incremento de la actividad metabólica aerobia en los peces realimentados. Así, inevitablemente, parte de los agentes oxidantes generados durante estos procesos serán vertidos al torrente sanguíneo junto con los productos sintetizados en los diferentes tejidos y que son transportados para su uso o almacenamiento en otras partes del organismo.

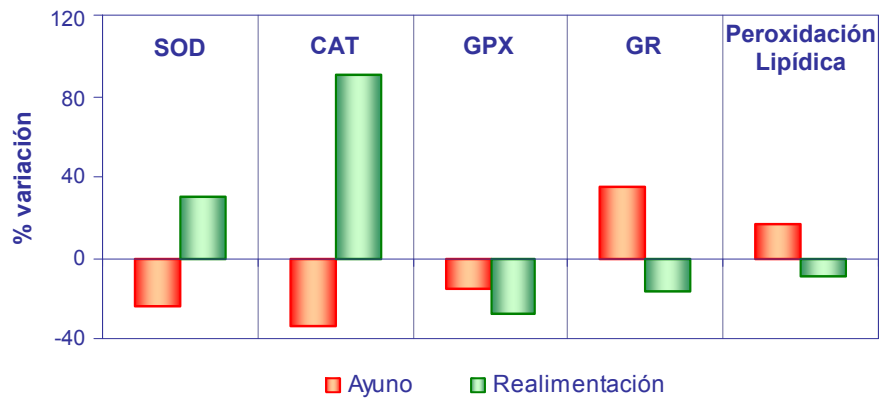


Figura IV-38. Efecto del ayuno y posterior realimentación sobre la actividad de enzimas antioxidantes y los daños oxidativos en hemolisado de dentón. Los datos son presentados como % de variación de los distintos parámetros en los animales sometidos a ayuno o realimentación respecto a su grupo control (0 %).

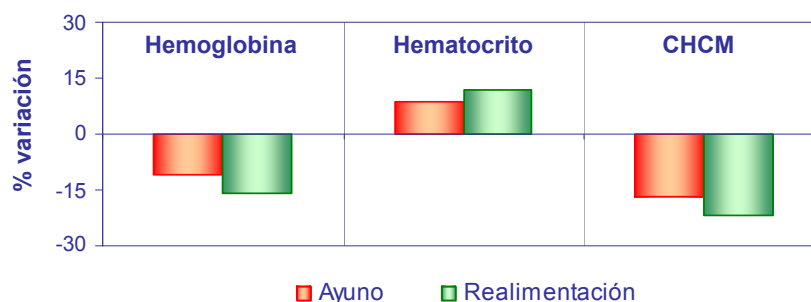


Figura IV-39. Efecto del ayuno y posterior realimentación sobre la concentración de hemoglobina y los índices hematocrito y CHCM en sangre de dentón. Los datos son presentados como % de variación de los distintos parámetros en los animales sometidos a ayuno o realimentación respecto a su grupo control (0 %).

## 4.5. CONCLUSIONES

1. El dentón posee un alto grado de resistencia al ayuno prolongado, superior al de otras especies análogas, debido, fundamentalmente, a una adaptación metabólica eficaz.
2. Mientras el hígado asume el principal papel regulador a nivel metabólico, otros tejidos (músculo blanco y corazón) experimentan un estado de depresión metabólica general tendente a minimizar el gasto energético en estos periodos de ausencia de alimento.
3. El patrón de respuesta de esta especie se corresponde con el observado generalmente en la mayoría de los peces. El glucógeno y los lípidos son los primeros sustratos utilizados para la supervivencia del animal, mientras que las proteínas se emplean cuando las reservas anteriores han sido prácticamente agotadas.
4. A pesar de la activación de los enzimas antioxidantes hepáticos, el ayuno prolongado condujo a un estado de estrés oxidativo en esta especie, como consecuencia, fundamentalmente, de la inhibición de los enzimas responsables de la producción de poder reductor.
5. La realimentación de los animales supuso una respuesta de crecimiento compensatorio completo. Este hecho se debió, no tanto a una modificación de la utilización del alimento, sino más bien a un notable incremento en la ingesta.

## 4.6. CONCLUSIONS

1. Common dentex possess a high capacity to withstand periods of prolonged fasting, which is higher than in other analogous species, due, basically, to an efficient metabolic adaptation.
2. While liver assumes the main role for metabolic regulation, other tissues (white muscle and heart) experience a state of general metabolic depression directed towards minimize the energetic cost in these periods of food deprivation.
3. The response pattern observed in this species corresponds with that observed in most fish. Glycogen and lipids are the first substrates used to survive, whereas proteins are used when the previous reserves have been practically exhausted.
4. In spite of the activation of the hepatic antioxidant enzymes, prolonged fasting leads to oxidative stress in this species, as a result, essentially, of the inhibition of the enzymes responsible for reducing power production.
5. Refeeding of animals results in a full compensation growth response. This fact is not derived from a modification of the feed use, but rather from a notable increase in food intake.



V- RESUMEN Y CONCLUSIÓN  
GENERAL

V- SUMMARY AND GENERAL  
CONCLUSION







## 1. RESUMEN

El dentón (*Dentex dentex*) es una especie muy valorada por los consumidores y, por tanto, apreciada para su comercialización. Desde los primeros estudios realizados en esta especie, se observó que se trata de un espárido con una tasa de crecimiento comparable a la mostrada por otras especies cultivadas como la dorada. Este hecho, junto al potencial aprovechamiento de las técnicas de cultivos ya existentes, sitúa a esta especie como una de las más importantes para la diversificación de la acuicultura marina mediterránea. No obstante, no hay que olvidar que, para que un cultivo acuícola tenga éxito, es necesario conocer bien las necesidades nutricionales y la fisiología de la especie en cuestión. Así, a partir de este conocimiento, se consiguen formular piensos lo más equilibrados posible, que permitan no sólo obtener un óptimo desarrollo del cultivo de la especie, sino también minimizar las pérdidas al medio ambiente y disminuir los costes de alimentación. Por tanto, establecer un alimento específico para dentón se presenta como un paso fundamental para la producción de esta especie.

Para conseguir este objetivo fundamental, en el presente trabajo se han realizado distintos ensayos de crecimiento y utilización del alimento, en los que el dentón ha sido sometido a diferentes situaciones nutricionales. Asimismo, también se han realizado análisis de los principales enzimas del metabolismo intermediario, además de evaluar el estado redox de los peces, para verificar la capacidad de adaptación metabólica de la especie.

Inicialmente, y partiendo de la premisa de que el dentón, al igual que la mayoría de peces, es incapaz de sintetizar un micronutriente tan esencial como la vitamina C, se formularon ocho dietas con niveles crecientes de esta vitamina (0, 30, 60, 120, 240, 480, 960, 1920 mg ácido ascórbico kg dieta<sup>-1</sup>), las cuales fueron suministradas durante ocho semanas a dentones cuyo peso medio inicial fue de  $2.05 \pm 0.02$  g. Los resultados obtenidos mostraron que los niveles necesarios para el correcto desarrollo de esta especie se encuentran en torno a los 500 mg ácido ascórbico kg dieta<sup>-1</sup>. Así, niveles deficientes generaron una pérdida del equilibrio del estado redox de los animales a favor del daño oxidativo, lo que hizo peligrar la integridad de los lípidos y proteínas, fundamentales para el correcto funcionamiento fisiológico del pez.

Este hecho se manifestó claramente en la actividad de la mayoría de los enzimas hepáticos del metabolismo intermediario analizados, los cuales mostraron una alteración en su patrón de actividad, que en último término repercutió negativamente sobre los índices de utilización y transformación de los nutrientes aportados por la dieta.

Por otro lado, a pesar de que algunos autores consideran que los peces carnívoros son incapaces de utilizar adecuadamente los carbohidratos que les son suministrados en el alimento, existen estudios que han comprobado la eficacia de utilizar este macronutriente para disminuir el contenido en proteína dietaria, uno de los componentes más caros en la fabricación de piensos. Esto permitiría optimizar la relación proteína/energía del alimento, lo que llevaría implícito un ahorro económico importante para la producción. Entre los factores más importantes que determinan el uso de los carbohidratos se encuentran tanto la especie, como el tipo y el nivel de inclusión de este nutriente en las dietas.

Para conocer la capacidad del dentón para utilizar eficazmente los hidratos de carbono, se formularon nueve dietas experimentales, con un contenido constante de proteína (43%) y energía (22 MJ kg<sup>-1</sup>), y que combinaban el uso de tres tipos (almidón pregelatinizado, dextrina y maltodextrina) y tres niveles (12%, 18% y 24%) de carbohidratos. Los dentones, con un peso medio inicial de 9.76 ± 0.05 g, fueron alimentados durante nueve semanas, tras las cuales se realizó un ensayo de digestibilidad. Los resultados indican que el dentón es capaz de aprovechar bien los hidratos de carbono suministrados en su dieta, en sus distintas formas y niveles, de manera que, tanto los índices de crecimiento como de utilización del alimento fueron comparables e incluso superiores a los obtenidos en estudios previos para dentones de tamaño similar. Aunque, las diferencias observadas entre grupos para estos parámetros no fueron, en ocasiones, claramente evidentes, en base a los resultados obtenidos, se podría afirmar que la combinación óptima entre fuente y nivel de carbohidratos dietarios, que promueven el mayor efecto de ahorro proteico, y consecuentemente, los mejores crecimientos y utilización del alimento en dentones de este tamaño, pertenece a un 18% de maltodextrina. Además, aunque el tipo de fuente carbohidratada influyó en la actividad de distintas enzimas del metabolismo intermediario, en conjunto, estas alteraciones no se reflejaron ni en los índices de utilización del alimento ni en el crecimiento de los animales.

Igualmente, el uso de hidratos de carbono como fuente energética alternativa no produjo efectos negativos sobre el estado oxidativo del dentón, contribuyendo incluso a su protección, al menos a los niveles de inclusión estudiados.

Una vez confirmada la eficacia de la inclusión de carbohidratos en el alimento para dentón, se planteó hasta que punto era posible disminuir el contenido en proteína de las dietas, sin afectar negativamente el normal crecimiento de los animales. En este sentido, la sustitución parcial de la proteína está condicionada por la posibilidad de incluir otras fuentes energéticas en la dieta. Con el fin de establecer el límite superior de utilización de carbohidratos y lípidos, así como la determinación del macronutriente más adecuado para la sustitución parcial de la proteína como principal fuente energética, se formularon cuatro dietas experimentales, las cuales fueron suministradas, durante trece semanas, a dentones con un peso medio inicial de  $91.7 \pm 1.4$  g. Se combinaron niveles altos y bajos de los distintos macronutrientes y se estableció un contenido en energía digestible ( $18 \text{ MJ kg}^{-1}$ ) constante para todas ellas. En dos de las dietas el contenido en proteína se estableció en un 43%, mientras que en las otras dos fue del 38%. Dentro de cada par de dietas, con el contenido proteico prefijado, se estableció un nivel de lípidos (24%) para una de ellas, y uno de carbohidratos (28%), variando el macronutriente restante para ajustar la energía. Los resultados obtenidos confirmaron la posibilidad de disminuir el contenido proteico hasta un 38% dietario, dentro de las condiciones experimentadas, sin que se vieran afectados ninguno de los parámetros de crecimiento. Para ello, esta especie es capaz de utilizar eficientemente tanto los carbohidratos como los lípidos para obtener la energía necesaria para su desarrollo. No obstante, desde el punto de vista de la utilización nutritiva de la proteína, los lípidos se utilizaron de forma más eficaz que los hidratos de carbono. Asimismo, la inclusión de un 28% de carbohidratos en las dietas indujo un incremento en los procesos gluconeogénicos de distintos tejidos, lo que indicó que, al igual que en el ensayo anterior, el dentón no emplea adecuadamente elevados niveles de este nutriente. Por otro lado, el empleo de las distintas combinaciones de macronutrientes no indujo alteraciones en el equilibrio redox de los animales. Sin embargo, cabe destacar la existencia de una relación directa entre el nivel de ingesta de lípidos o proteínas y la aparición de daños oxidativos sobre estos componentes tisulares.

Finalmente, el dentón, al igual que el resto de especies cultivadas, puede llegar a experimentar procesos de ayuno, derivados tanto de causas naturales como impuestos por el acuicultor. Conocer en que forma esta especie responde a estas situaciones adversas es fundamental para la optimización de su cultivo. Para ello, se realizó un último experimento, en el cual, dentones con un peso medio inicial de  $323.9 \pm 2.1$  g fueron sometidos a ayuno prolongado, cuya duración fue de cinco semanas. Tras este tiempo, los peces fueron realimentados durante tres semanas. En ambos casos, ayuno y realimentación, se utilizó paralelamente un grupo control de animales. Los resultados, al final del ayuno, reflejaron una evidente pérdida de peso corporal, unida a una reducción importante del contenido en grasa perivisceral y del glucógeno hepático y muscular. Igualmente, se indujo una clara hipoglucemia, si bien, los niveles de glucosa plasmática fueron mantenidos por encima del nivel basal gracias a la glucogenolisis hepática y a la reducción en la tasa de utilización de este metabolito, tanto para glucólisis como para lipogénesis. También se observó un incrementado catabolismo lipídico hepático, lo que reflejaría el uso de las reservas lipídicas como fuente de energía fundamental para el mantenimiento del animal. En base a estos resultados, se podría afirmar que el patrón de respuesta de esta especie se corresponde con el observado en la mayoría de los peces, donde glucógeno y lípidos son los primeros sustratos utilizados para la supervivencia, mientras que las proteínas se emplean cuando las reservas anteriores han sido prácticamente agotadas. Por su parte, a diferencia del hígado, que parece constituirse como el principal órgano regulador desde un punto de vista metabólico, el resto de tejidos analizados (músculo blanco y corazón) tan sólo mostraron una depresión metabólica generalizada, posiblemente con el objetivo de minimizar el gasto energético bajo estas circunstancias.

Por otro lado, una de las principales consecuencias del conjunto de cambios metabólicos inducidos por el ayuno es un incremento en la generación de agentes oxidantes, especialmente ROS. Frente a esta situación, el dentón parece activar sus sistemas de defensa antioxidante, principalmente a nivel hepático. No obstante, dichas defensas no fueron eficaces para prevenir daños oxidativos a nivel lipídico en hígado y corazón, posiblemente como consecuencia de la inhibición de los principales enzimas responsables de la producción de poder reductor.

En cuanto a la capacidad de recuperación del dentón durante el proceso de realimentación se puede considerar óptima, de forma que los peces compensaron las pérdidas de masa corporal, produciéndose una respuesta considerada de crecimiento compensatorio completo, como consecuencia de una hiperfagia. Además, en términos generales, la mayoría del resto de parámetros evaluados se restablecieron tras esta fase. Por todo ello y en base al conjunto de resultados obtenidos, se puede afirmar que el dentón posee un alto grado de resistencia al ayuno prolongado, siendo incluso superior al de otras especies análogas.



## 2. SUMMARY

Common dentex (*Dentex dentex*) is a highly valued species by the consumers and therefore, appreciated for its commercialization. From the first studies carried out in this species, it was observed that is a sparid with a comparable growth rate to those observed in other cultured species, like sea bream. This fact, together with the potential use of the existing technology for traditionally reared Mediterranean species, locates the common dentex among the most important species for the diversification of Mediterranean marine aquaculture. Nevertheless, it is necessary to keep in mind that in order to a successful fish production, it is necessary to know their nutritional requirements and the physiology of the species in question. Thus, from this knowledge, it is possible to formulate balanced feeds that allow not only to obtain an optimum development of the production of the species, but also to minimize the losses to the environment and diminishing the feeding cost. Hence, the establishment of a specific feed for common dentex is an essential step for the development of the culture of this species.

In order to attain this objective, in the present work different growth and feed utilization trials, in which common dentex has been subjected to different nutritional situations, have been performed. Likewise, these trials were complemented with measurements of the activity of some key enzymes of the intermediary metabolism, besides evaluating the redox state of fish, in order to assess the ability for metabolic adaptation of the species.

Initially, and starting from the premise that, like most fish, common dentex is not able to synthesize an essential micronutrient as vitamin C, eight diets with increasing levels of this vitamin (0, 30, 60, 120, 240, 480, 960, 1920 mg ascorbic acid kg diet<sup>-1</sup>) were formulated. These diets were provided during eight weeks to common dentex which initial mean weight was  $2.05 \pm 0.02$  g. Results showed that the minimum levels for the correct development of this species are around 500 mg ascorbic acid kg diet<sup>-1</sup>. Thus, deficient levels generated an imbalance of the animal redox state, leading to oxidative damage to lipids and proteins integrity. This fact was clearly observed in the activity of most intermediary metabolism enzymes determined in liver that showed an alteration in their normal activity pattern, which had a negative effect in the utilization of diet.



On the other hand, although some authors consider that carnivorous fish are not able to use properly the dietary carbohydrates, the capacity to use this macronutrient to spare protein, one of the most expensive components in the feed manufacture, have been also reported. This would allow optimizing the protein/energy ratio, what would lead to an important economic saving for the production. The fish species and the kind and level of dietary carbohydrate are among the most important factors determining the utilization of this macronutrient. In order to know the ability of common dentex to use carbohydrates, nine experimental isoproteic (43%) and isoenergetic (22 MJ kg<sup>-1</sup>) diets containing different kind (pregelatinized starch, dextrin and maltodextrin) and levels (12%, 18% and 24%) of carbohydrates were formulated. Common dentex, with an initial mean weight of 9.76 ± 0.05 g, were fed during nine weeks, after which a digestibility trial was carried out. Results indicate that common dentex is able to use effectively the dietary carbohydrates, in their different forms and levels, so that as growth performance as feed efficiency were comparable and even higher than those obtained in previous studies with similar fish size. Although differences among groups were not clearly evident, it could be affirmed that the optimum combination between kind and level of dietary carbohydrates was 18% of maltodextrin. In addition, although the kind of carbohydrate influenced the activity of different intermediary metabolism enzymes, their effects were not reflected either in food utilization or in animal growth. Likewise, the carbohydrate utilization as alternative energy source did not induce negative effects on the common dentex oxidative state, contributing even to its protection, at least in the assayed inclusion levels.

Once confirmed the efficacy of the carbohydrates inclusion in diets for common dentex, it was considered to know which would be the minimum dietary protein level that could be used without negatively affecting the animal growth. In this sense, the partial replacement of protein is conditioned by the possibility of including other dietary energy sources. In order to establish the upper limit of carbohydrate and lipid inclusion, as well as knowing the more suitable macronutrient for the partial replacement of protein, four experimental diets with the same digestible energy (18 KJ g<sup>-1</sup>) were formulated. Diet composition was (%P/L/C): diet P<sub>43</sub>C<sub>28</sub>: 43/17/28; diet P<sub>43</sub>L<sub>24</sub>: 43/24/4; diet P<sub>38</sub>C<sub>28</sub>: 38/20/28; diet P<sub>38</sub>L<sub>24</sub>: 38/24/13. The diets were supplied, during thirteen weeks, to common dentex with an initial mean weight of 91.7 ± 1.4 g.

Results confirmed the possibility of diminishing protein content until 38%, within the experienced conditions, without growth parameters were affected. For this protein level, common dentex is able to use efficiently both carbohydrates and lipids as energy sources. Nevertheless, in terms of protein nutritive utilization, lipids were used in a more effective way than carbohydrates. Likewise, 28% of dietary carbohydrates induced an increase of the gluconeogenic process in the different tissues, what indicated that, as in the previous trial, high levels of this nutrient are not adequate for this species. On the other hand, utilization of different macronutrient combinations did not induce alterations in the animal redox equilibrium. Nevertheless, it is necessary to emphasize the existence of a direct relation between lipid or protein intake levels and the occurrence of oxidative damage on these tissue components.

Finally, common dentex, like most cultured species, can experience fasting processes, derived as from natural causes as imposed by the aquaculture producer. Knowing how this species faces these adverse situations is essential to optimize its production. In order to attain this objective, a last trial in which common dentex with an initial mean weight of  $323.9 \pm 2.1$  g were fasted for five weeks was carried out. After this time, fish were refed during three weeks. Results reflected an evident loss of body weight, together with an important reduction of perivisceral fat and hepatic and muscular glycogen. Likewise, a clear hypoglycaemia was induced, although plasma glucose levels were maintained over the basal levels for this species, through the hepatic glycogenolysis and the reduced use of this metabolite. It was also observed an increased catabolism of lipid in liver, which would reflect the use of these reserves like a fundamental energy source for the animal maintenance. Considering these results, the response pattern observed in this species would correspond with that observed in most fish, where glycogen and lipids are the first substrates used for the survival, whereas proteins are used when the previous reserves have practically been exhausted. Otherwise, unlike the liver, that acts as the main regulating organ from a metabolic point of view, the rest of analyzed tissues (white muscle and heart) showed a generalized metabolic depression, possibly with the aim of reducing the energetic cost under these circumstances.

On the other hand, one of the main consequences of the metabolic change induced by food deprivation is an increase in the generation of oxidant agents, especially ROS. Against this situation, common dentex seems to activate its antioxidant defense systems, mainly at hepatic level. However, these defenses were not effective to prevent lipid oxidative damage in liver and heart, possibly as a result of the reduced activity of the enzymes responsible for reducing power production. Regarding the capacity of common dentex to return to pre-starvation state during refeeding process, it can be considered optimum, taking place a full compensation growth response as consequence of a process of hyperphagia. In addition, in general terms, most parameters evaluated recovered after this refeeding period. Therefore and considering the whole results, it can be affirmed that common dentex has a high capacity to face prolonged fasting, being even more resistant than other analogous species.

### **3. CONCLUSIÓN GENERAL**

El conjunto de trabajos que conforman esta memoria permite profundizar en el conocimiento de la fisiología nutricional del dentón. Se trata de la primera aproximación a las necesidades de vitamina C para esta especie, encontrándose en torno a 500 mg de ácido ascórbico kg dieta<sup>-1</sup>, para los juveniles. Por otra parte, hemos constatado el buen uso que esta especie hace de los hidratos de carbono, que se pueden llegar a incorporar en la dieta a niveles bastante elevados, aunque pueden variar en función de la edad/tamaño del animal. No obstante, el efecto de “ahorro proteico” es más evidente cuando la proteína es sustituida por los lípidos. Además, es una especie cuyo metabolismo se adapta eficazmente a situaciones nutricionales extremas o adversas, como el ayuno prolongado.

### **4. GENERAL CONCLUSION**

The set of trials that conforms this memory allows deepening in the knowledge of the nutritional physiology of common dentex. It is the first approach to the vitamin C requirements for this species, being around 500 mg ascorbic acid kg diet<sup>-1</sup>, for fingerlings. Likewise, we have verified the effective use of carbohydrates in this species; although dependent of the animal age/size, this nutrient can be incorporated at quite high dietary levels. However, the protein sparing effect is more evident when lipids are used to replace protein. In addition, it is a species whose metabolism is adapted efficiently to extreme or adverse nutritional situations, like prolonged fasting.



## VI- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS





- Abdelkader, B. y Ktari, M.H. 1985. Régime alimentaire des dentés (Genre *Dentex*), poissons sparidés de Tunisie. Bull. Soc. Nat., Tunisie 17: 19-25.
- Abele, D., Roecken, D., Graeve, M. y Buck, B.H. 2007. Body growth, mitochondrial enzymatic capacities and aspects of the antioxidant system and redox balance under calorie restriction in young turbot (*Scophthalmus maximus*, L.). Aquac. Res., 38: 467-477.
- Abellán, E., García-Alcázar, A., Arizcun, M., Delgado, J. y Martín, P. 1997. Experiencias preliminares sobre reproducción y cultivo de dentón, (*Dentex dentex* L.). En: Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura, Julio 9-11, Cartagena. De Costa, J.A., García G.B., Ortega, R.A. y Zamora, N.S. (Eds.). Cartagena, España, pp. 477-482.
- Abellán, E. 2000. Culture of common dentex (*Dentex dentex* L.): Present knowledge, problems and perspectives. Recent advances in Mediterranean aquaculture finfish species diversification. Cah. Options Méditerran., 47: 157-168.
- Adham, Hashem, Abu-Shabana y Kamel. 2000. Vitamin C deficiency in the catfish *Clarias gariepinus*. Aquacult. Nutr., 6: 129-139.
- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. Methods Enzymol., 105: 121-126.
- Affonso, E.G., Silva, E.d.C., Tavares-Dias, M., de Menezes, G.C., de Carvalho, C.S.M., Nunes, E.d.S.S., Ituassu, D.R., Roubach, R., Ono, E.A., Fim, J.D.I. y Marcon, J.L. 2007. Effect of high levels of dietary vitamin C on the blood responses of matrinxá (*Brycon amazonicus*). Comp. Biochem. Physiol., 147A: 383-388.
- Aguirre, P. y Gatlin, D.M. 1999. Dietary vitamin C requirement of red drum *Sciaenops ocellatus*. Aquacult. Nutr., 5: 247-249.
- Ai, Q., Mai, K., Zhang, C., Xu, W., Duan, Q., Tan, B. y Liufu, Z. 2004. Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. Aquaculture, 242: 489-500.
- Ai, Q., Mai, K., Tan, B., Xu, W., Zhang, W., Ma, H. y Liufu, Z. 2006. Effects of dietary vitamin C on survival, growth, and immunity of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. Aquaculture, 261: 327-336.
- Aksnes, A. 1995. Growth, feed efficiency and slaughter quality of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., given feeds with different ratios of carbohydrate and protein. Aquacult. Nutr., 1: 241-248.
- Al-Amoudi, M.M., El-Nakkadi, A.M.N. y El-Nouman, B.M. 1992. Evaluation of optimum dietary requirement of vitamin C for the growth of *Oreochromis spilurus* fingerlings in water from the Red Sea. Aquaculture, 105: 165-173.
- Albrektsen, S., Lie, O. y Sandnes, K. 1988. Ascorbyl palmitate as a dietary vitamin C source for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Aquaculture, 71: 359-368.
- Ali, M., Cui, Y., Zhu, X. y Wootton, R.J. 2001. Dynamics of appetite in three fish species (*Gasterosteus aculeatus*, *Phoxinus phoxinus* and *Carassius auratus gibelio*) following feed deprivation. Aquac. Res., 32: 443-450.
- Ali, M., Nicieza, A. y Wootton, R.J. 2003. Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. Fish Fish., 4: 147-190.
- Almroth, B.C., Sturve, J., Berglund, A. y Forlin, L. 2005. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. Aquat. Toxicol., 73: 171-180.



- Alsted, N. y Jokumsen, A. 1989. The influence of dietary protein: fat ratio on the growth of rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). En: Proc. Third Symp. on Feeding and Nutrition in Fish, Toba, Japan, pp. 209-220.
- Álvarez, M.J., Lopez-Bote, C.J., Díez, A., Corraze, G., Arzel, J., Dias, J., Kaushik, S.J. y Bautista, S.J. 1998. Dietary fish oil and digestible protein modify susceptibility to lipid peroxidation in the muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Brit. J. Nutr., 80: 281-289.
- Álvarez, M.L., López-Bote, C.J., Díez, A., Corraze, G., Arzel, J., Dias, J., Kaushik, S.J. y Bautista, J.M. 1999. The partial substitution of digestible protein with gelatinized starch as an energy source reduces susceptibility to lipid oxidation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) muscle. J. Anim. Sci., 77: 3322-3329.
- Amici, A., Levine, R.L., Tsai, L. y Stadtman, E.R. 1989. Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed reactions. J. Biol. Chem., 264: 3341-3346.
- Andersen, F., Maage, A. y Julshamm, K. 1996. An estimation of iron requirement of Atlantic salmon (*Salmo Salar*). Aquacult. Nutr., 2: 41-47.
- Andersen, F., Lygren, B., Maage, A. y Waagbø, R. 1998. Interaction between two dietary levels of iron and two forms of ascorbic acid and the effect on growth, antioxidant status and some non-specific immune parameters in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. Aquaculture, 161: 437-451.
- Andrew, J.E., Holm, J. y Huntingford, F.A. 2004. The effect of pellet texture on the feeding behaviour of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Aquaculture, 232: 471-479.
- AOAC. 2000. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, Maryland, USA, 1018 pp.
- Arizcun, M. 2003. Desarrollo y crecimiento de la musculatura axial del dentón *Dentex dentex*, L. Influencia de la temperatura de incubación y cultivo larvario. Tesis Doctoral. Departamento de Anatomía y anatomía patológica comparada. Universidad de Murcia, España, 232 pp.
- Arnesen, P., Krogdahl, A. y Kristiansen, I.Ø. 1993. Lipogenic enzyme activities in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). Comp. Biochem. Physiol., 105B: 541-546.
- Arockiaraj, A.J., Muruganandam, M., Marimuthu, K. y Haniffa, M.A. 1999. Utilization of carbohydrates as a dietary energy source by striped murrel *Channa striatus* (Bloch) fingerlings. Acta Zoológica Taiwanica, 10: 103-111.
- Atienza, M.T., Chatzifotis, S. y Divanach, P. 2004. Macronutrient selection by sharp snout seabream (*Diplodus puntazzo*). Aquaculture, 232: 481-491.
- Bai, S.C. y Lee, K.J. 1996. Long-term feeding effects of different L-ascorbic acid levels on growth and tissue vitamin C concentrations in juvenile Korean rockfish. J. Korean Fish. Soc., 29: 643-650.
- Bainy, A.C.D., Saito, E., Carvalho, P.S.M. y Junqueira, V.B.C. 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. Aquat. Toxicol., 34: 151-162.
- Ballantyne, J.S. 1995. Metabolic organization of thermogenic tissues of fishes. En: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, vol. 4. Hochachka, P.W. y Mommsen, T.P. (Eds.). Elsevier Science B.V., pp. 242-258.
- Ballestrazzi, R., Lanari, D., D'Agaro, E. y Mion, A. 1994. The effect of dietary protein levels and source on growth, body composition, total ammonia and reactive phosphate excretion of growing sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture, 127: 197-206.

- Bánhegyi, G., Braun, L., Csala, M., Puskás, F. y Mandl, J. 1997. Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free Radical Bio. Med.*, 23: 793-803.
- Barja, G., López-Torres, M., Pérez-Campo, R., Rojas, C., Cadenas, S., Prat, J. y Pamplona, R. 1994. Dietary vitamin C decreases endogenous protein oxidative damage, malondialdehyde, and lipid peroxidation and maintains fatty acid unsaturation in the guinea pig liver. *Free Radical Bio. Med.*, 17: 105-115.
- Barroso, J.B., García-Salguero, L., Peragón, J., De la Higuera, M. y Lupiáñez, J.A. 1994. The influence of dietary protein on the kinetics of NADPH production systems in various tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 124: 47-59.
- Barroso, J.B., Peragón, J., Contreras-Jurado, C., García-Salguero, L., Corpas, F.J., Esteban, F.J., Peinado, M.A., De la Higuera, M. y Lupiáñez, J.A. 1998. Impact of starvation-refeeding on kinetics and protein expression of trout liver NADPH-production systems. *Am. J. Physiol.*, 274: R1578-R1587.
- Barroso, J.B., Peragón, J., García-Salguero, L., De la Higuera, M. y Lupiáñez, J.A. 2001. Carbohydrate deprivation reduces NADPH-production in fish liver but not in adipose tissue. *Int. J. Biochem. Cell B.*, 33: 785-796.
- Bastrop, R., Jirss, K. y Wacke, R. 1992. Biochemical parameters as a measure of food availability and growth in immature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 102A: 151-161.
- Basurco, B. y Abellán, E. 1999. Finfish species diversification in the context of Mediterranean marine fish farming development. En: *Marine Finfish Diversification: Current Situation and Prospects in Mediterranean Aquaculture. Options Méditerranéennes*. Abellan, E. y Basurco, B. (Eds.). FAO, serie B: Etudes et Recherches, pp. 9-25.
- Bauchot, M.L. y Hureau, J.C. 1986. Sparidae. En: *Fishes of the North-Eastern Atlantic and the Mediterranean*. Whitehead, P.J.P.B., M.L.; Hureau, J.C.; Nielsen, J. y Tortonese, E. (Eds.). UNESCO, Paris, pp. 883-907.
- Bazoco, J., García-Gallego, M., Suárez, M.D., Sanz, A. y Cardenete, G. 1993. Application of a settling column system to studies of digestibility in the eel. En: *Fish Nutrition in Practice*. Kaushik, S.J. y Luquet, P. (Eds.). INRA, Paris, pp. 437-441.
- Beauchamp, C.O. y Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 44: 276-287.
- Bell, G.R., Higgs, D.A. y Traxler, G.S. 1984. The effect of dietary ascorbate, zinc, and manganese on the development of experimentally induced bacterial kidney disease in sockeye salmon (*Onchorhynchus nerka*). *Aquaculture*, 36: 293-311.
- Bendich, A. 1990. Antioxidant micronutrients and immune response. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 587: 168-180.
- Berge, G.M. y Storebakken, T. 1991. Effect of dietary fat level on weight gain, digestibility, and fillet composition of Atlantic halibut. *Aquaculture*, 99: 331-338.
- Bergot, F. 1979. Problèmes particuliers posés pour l'utilisation des glucides chez la truite arc-en-ciel. *Ann. Nutr. Alim.*, 33: 247-257.
- Bergot, F. y Breque, J. 1983. Digestibility of starch by rainbow trout: effects of the physical state of starch and of the intake level. *Aquaculture*, 34: 203-212.
- Berlett, B.S. y Stadtman, E.R. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 272: 20313-20316.

- Bibiano Melo, J.F., Lundstedt, L.M., Metón, I., Baanante, I.V. y Moraes, G. 2006. Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 145A: 181-187.
- Bibiloni, G., Cladera, A., Gomila, M.A., Massutí, S. y Zaratiegui, I. 1993. Contribution to the growing of *Dentex dentex*. En: *From Discovery to Commercialization*. Carrillo, M.D., L.; Morales, J.; Sorgeloos, P.; Svennevig, N. y Wyban, J. (Eds.). EAS, Spec. Publ., Oostende, Belgium, 315 pp.
- Bini, G. 1968. Atlante de Pesci delle Coste Italiane. En: *Sparidae*. Sommerso, M. (Ed.). Milan, pp. 93-152.
- Black, D. y Love, R.M. 1986. The sequential mobilisation and restoration of energy reserves in tissues of Atlantic cod during starvation and refeeding. *J. Comp. Physiol.*, 156B: 469-479.
- Blasco, J., Fernández, J. y Gutiérrez, J. 1992. Fasting and refeeding in carp, *Cyprinus carpio* L.: the mobilization of reserves and plasma metabolite and hormone variations. *J. Comp. Physiol.*, 162B: 346-359.
- Blaxhall, P.C. y Daisley, K.W. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *J. Fish Biol.*, 5: 771-781.
- Blin, C., Panserat, S., Medale, F., Gomes, E., Breque, J., Kaushik, S. y Krishnamoorthy, R. 1999. Teleost liver hexokinase- and glucokinase-like enzymes: partial cDNA cloning and phylogenetic studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.*, 21: 93-102.
- Blom, S., Andersson, T.B. y Förlin, L. 2000. Effects of food deprivation and handling stress on head kidney 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone 21-hydroxylase activity, plasma cortisol and the activities of liver detoxification enzymes in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.*, 48: 265-274.
- Boonyaratpalin, M., Boonyaratpalin, S. y Supamataya, K. 1994. Ascorbyl-phosphate-Mg as a dietary vitamin C source for sea bass *Lates calcarifer*. En: *The Third Asian Fisheries Forum*. Singapore; October 27-31, 1992. Chou, L.M., Munro, A.D., Lam, T.J., Chen, T.W., Cheong, L.K.K., Ding, J.K., Hooi, K.K., Khoo, H.W., Phang, V.P.E., Shim, K.F. y Tan, C.H. (Eds.). Manila, Philippines: Asian Fisheries Society, pp. 725-728.
- Borrebaek, B. y Christophersen, B. 2001. Activities of glucose phosphorylation, glucose-6-phosphatase and lipogenic enzymes in the liver perch, *Perca fluviatilis* after different dietary treatment. *Aquac. Res.*, 32: 221-224.
- Borrebaek, B., Waagbø, R., Christophersen, B., Tranulis, M.A. y Hemre, G.I. 1993. Adaptable hexokinase with low affinity for glucose in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 106B: 833-836.
- Borrebaek, B., Christophersen, B. y Sundby, A. 2003. Metabolic function of hepatic hexokinase in perch, *Perca fluviatilis*. *Aquac. Res.*, 34: 235-239.
- Boujard, T., Gelineau, A., Coves, D., Corraze, G., Dutto, G., Gasset, E. y Kaushik, S. 2004. Regulation of feed intake, growth, nutrient and energy utilisation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed high fat diets. *Aquaculture*, 231: 529-545.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Brauge, C., Medale, F. y Corraze, G. 1994. Effect of dietary carbohydrate levels on growth, body composition and glycaemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in seawater. *Aquaculture*, 123: 109-120.
- Buccolo, G. y David, H. 1973. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin. Chem.*, 19: 476-482.

- Bucking, C. y Wood, C.M. 2005. Renal regulation of plasma glucose in the freshwater rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, 208: 2731-2739.
- Buddington, R.K., Chen, J.W. y Diamond, J. 1987. Genetic and phenotypic adaptation of intestinal nutrient transport to diet in fish. *J. Physiol.*, 393: 261-281.
- Buege, J.A. y Aust, S.D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, 52: 302-310.
- Buettner, G.R. y Jurkiewicz, B.A. 1995. Chemistry and biochemistry of ascorbic acid. En: *Handbook of Antioxidants*. Packer, L. y Cadenas, E. (Eds.). Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 91-115.
- Bureau, D. 1998. Partitioning of energy from digestible carbohydrates by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Diss. Abstr. Int.*, 58B: 3379.
- Burel, C., Boujard, T., Tulli, F. y Kaushik, S.J. 2000. Digestibility of extruded peas, extruded lupin, and rapeseed meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 188: 285-298.
- Butler, D.G. 1968. Hormonal control of gluconeogenesis in the North American eel (*Anguilla rostrata*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 10: 85-91.
- Cadenas, E. 1995. Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. En: *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. Ahmad, S. (Ed.). Chapman y Hall, New York, pp. 1-46.
- Capilla, E., Medale, F., Navarro, I., Panserat, S., Vachot, C., Kaushik, S. y Gutierrez, J. 2003. Muscle insulin binding and plasma levels in relation to liver glucokinase activity, glucose metabolism and dietary carbohydrates in rainbow trout. *Regul. Peptides*, 110: 123-132.
- Cardenete, G., Abellan, E., Skalli, A., Hidalgo, M.C. y Massuti, S. 1997a. Feeding *Dentex dentex* with dry diets: growth response and diet utilisation. *Feeding Tomorrow's Fish. Cah. Options Méditerr.*, 22: 141-151.
- Cardenete, G., Abellán, E., Hidalgo, M.C., Skalli, A. y Arizcun, M. 1997b. Relación proteína energía en dietas para juveniles de dentón (*Dentex dentex*). En: *Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura*, Julio 9-11, Cartagena. De Costa, J.A., García, G.B., Ortega, R.A. y Zamora, S. (Eds.). Murcia, España, pp. 581-586.
- Cardenete, G., Abellán, E., Hidalgo, M.C., Skalli, A. y García-Alcázar, A. 1997c. Utilización digestiva y nutritiva de niveles crecientes de carbohidratos en la dieta por el dentón (*Dentex dentex*). Resultados preliminares. En: *Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura*, Julio 9-11, Cartagena. De Costa, J.A., García, G.B., Ortega, R.A. y Zamora, S. (Eds.). Murcia, España, pp. 587- 592.
- Carlberg, I. y Mannervik, B. 1975. Purification and characterization of the flavo enzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 250: 5475-5480.
- Carrillo, M., Zanuy, S. y Herrera, E. 1982. Growth and diurnal variations in metabolic parameters in the starved bass, *Dicentrarchus labrax*, after experimental feeding. *Comp. Biochem. Physiol.*, 74A: 11-11.
- Caseras, A., Meton, I., Fernandez, F. y Baanante, I.V. 2000. Glucokinase gene expression is nutritionally regulated in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biochim. Biophys. Acta*, 1493: 135-141.
- Caseras, A., Metón, I., Vives, C., Egea, M., Fernández, F. y Baanante, I.V. 2002. Nutritional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in liver of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Brit. J. Nutr.*, 88: 607-614.

- Catacutan, M.R. y Coloso, R.M. 1997. Growth of juvenile Asian Sea bass, *Lates Calcarifer*, fed varying carbohydrate and lipid levels. *Aquaculture*, 149: 137-144.
- Cerna, O. y Ginter, E. 1978. Blood lipids and vitamin C status. *Lancet*, 121: 1055-1056.
- Chagas, E.C. y Val, A.L. 2006. Ascorbic acid reduces the effects of hypoxia on the Amazon fish tambaqui. *J. Fish Biol.*, 69: 608-612.
- Chakraborty, S., Nandi, A., Mukhopadhyay, C.K. y Chatterjee, I.B. 1992. Protective role of ascorbic acid against lipid peroxidation and myocardial injury. *Mol. Cell. Biochem.*, 111: 41-47.
- Chakraborty, S., Nandi, A., Mukhopadhyay, M., Mukhopadhyay, C.K. y Chatterjee, I.B. 1994. Ascorbate protects guinea pig tissues against lipid peroxidation. *Free Radical Bio. Med.*, 16: 417-426.
- Chatzifotis, S., Takeuchi, T. y Seikai, T. 1995. The effect of dietary L-carnitine on growth performance and lipid composition in red sea bream fingerlings. *Fisheries Sci.*, 61: 1004-1008.
- Chávez de Martínez, M. 1990. Vitamin C requirement of the Mexican native cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Gunther). *Aquaculture*, 86: 409-416.
- Chen, L.H. 1988. Ascorbic acid-stimulated peroxidation in hepatocytes and inhibition by antioxidants. *Biochem. Arch.*, 4: 373-380.
- Chen, R., Lochmann, R., Goodwin, A., Praveen, K., Dabrowski, K. y Lee, K.J. 2004. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). *Aquaculture*, 242: 553-569.
- Chevion, M., Berenshtein, E. y Stadtman, E.R. 2000. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radical Res.*, 33: S99-S108.
- Chien, L.T. y Hwang, D.F. 2001. Effects of thermal stress and vitamin C on lipid peroxidation and fatty acid composition in the liver of thornfish *Terapon jarbua*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 128B: 91-97.
- Chien, L.T., Hwang, D.F. y Jeng, S.S. 1999. Effect of thermal stress on dietary requirements of vitamin C in thornfish *Terapon jarbua*. *Fisheries Sci.*, 65: 731-735.
- Cho, C.Y. y Kaushik, S. 1983. Effects of protein intake of fish diets. En: *Nutrition and feeding fish*. Cowey, Mackie y Bell (Eds.). Academic Press, Londres, pp. 95-117.
- Cho, C.Y. y Kaushik, S.J. 1990. Nutritional energetics in fish: Energy and protein utilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *World Rev. Nutr. Diet.*, 61: 132-172.
- Cho, C.Y. y Cowey, C.B. 1993. Utilization of monophosphate esters of ascorbic acid by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). En: *Fish Nutrition in Practice*. 4. Int. Symp. Fish Nutrition and Feeding, 24- 27 June 1991, Biarritz, France. Kaushik, S.J. y Luquet, P. (Eds.). INRA, Paris, France, pp. 149-156.
- Cho, C.Y., Slinger, S.J. y Bayley, H.S. 1982. Bioenergetics of salmonid fishes: Energy intake, expenditure and productivity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73B: 25-41.
- Chou, R.L., Su, M.S. y Chen, H.Y. 2001. Optimal dietary protein and lipid levels for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 193: 81-89.
- Collins, A.L. y Anderson, T.A. 1997. The influence of changes in food availability on the activities of key degradative and metabolic enzymes in the liver and epaxial muscle of the golden perch. *J. Fish Biol.*, 50: 1158-1165.

- Company, R., Calduch-Giner, J.A., Pérez-Sánchez, J. y Kaushik, S.J. 1999a. Protein sparing effect of dietary lipids in common dentex (*Dentex dentex*): a comparative study with sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquat. Living Resour.*, 12: 23-30.
- Company, R., Sitjá-Bobadilla, R., Pujalte, M.J., Garay, E., Álvarez-Pellitero, P. y Pérez-Sánchez, J. 1999b. Bacterial and parasitic pathogens in cultured common dentex, *Dentex dentex* L. *J. Fish Dis.*, 22: 299-309.
- Company, R., Calduch-Giner, J.A., Kaushik, S. y Pérez-Sánchez, J. 1999c. Growth performance and adiposity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): risks and benefits of high energy diets. *Aquaculture*, 171: 279-292.
- Cook, J.T., Sutterlin, A.M. y McNiven, M.A. 2000. Effect of food deprivation on oxygen consumption and body composition of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 188: 47-63.
- Cottet, J. y Etienne, J. 1965. Determination of serum lipids by the sulfo-phospho-vanillic method of E. Chabrol and R. Charonnat. *Bull. Acad. Natl. Med.*, 149: 331-338.
- Cowey, C.B. 1980. Protein metabolism in fish. En: Protein deposition in animals. Butterly y Lindsay (Eds.). Butterworths, London, pp. 271-288.
- Cowey, C.B. y Sargent, J.R. 1977. Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 57B: 269-273.
- Cowey, C.B. y Sargent, J. 1979. Nutrition. En: Fish physiology vol. III. Hoar, Randall y Brett (Eds.). Academic Press, New York, pp. 1-69.
- Cowey, C.B. y Luquet, P. 1983. Protein metabolism and nutrition. INRA, Paris, pp. 365-384
- Cowey, C.B. y Walton, M.J. 1989. Intermediary metabolism. En: Fish Nutrition 2nd Ed. Halver, J.E. (Ed.). Academic Press, London, pp. 260-329.
- Cowey, C.B., De la Higuera, M. y Adron, J.W. 1977. The effect of dietary composition and of insulin on gluconeogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Brit. J. Nutr.*, 38: 385-395.
- Crespo, S., De Mateo, M.M., Santamaría, C.A., Sala, R., Grau, A. y Pastor, E. 2001. Histopathological observations during larval rearing of common dentex *Dentex dentex* L. (Sparidae). *Aquaculture*, 192: 121-132.
- Dabrowski, K. 1986. Ontogenetic aspects of nutritional requirements in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 85A: 639-655.
- Dabrowski, K. 1990. Ascorbic acid status in the early life of whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). *Aquaculture*, 84: 61-70.
- Dabrowski, K. 1991. Administration of gulonolactone does not evoke ascorbic acid synthesis in teleost fish. *Fish Physiol. Biochem.*, 9: 215-221.
- Dabrowski, K. y Ciereszko, A. 2001. Ascorbic acid and reproduction in fish: endocrine regulation and gamete quality. *Aquac. Res.*, 32: 623-638.
- Dabrowski, K. y Guderley, H. 2002. Intermediary metabolism. En: Fish Nutrition. Halver, J. E. y Hardy, R.W. (Eds.). Academic Press, London, pp. 310-365.
- Dabrowski, K., Matusiewicz, M. y Blom, J.H. 1994. Hydrolysis, absorption and bioavailability of ascorbic acid esters in fish. *Aquaculture*, 124: 169-191.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A. y Colombo, R. 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta*, 329: 23-38.

- D'Ancona, U. 1950. Il differenziamento delle gonade e l'ersione sessuale degli sparidi. Arch. Ocean. Limnol. Fasc. II-III: 97-163.
- Davies, K.J. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. J. Biol. Chem., 262: 9895-9901.
- Davies, K.J. y Delsignore, M.E. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. J. Biol. Chem., 262: 9908-9913.
- Davies, K.J., Delsignore, M.E. y Lin, S.W. 1987a. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. J. Biol. Chem., 262: 9902-9907.
- Davies, K.J., Lin, S.W. y Pacifici, R.E. 1987b. Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. J. Biol. Chem., 262: 9914-9920.
- Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis-II: Method and application to human serum protein. Ann. NY. Acad. Sci., 121: 404-427.
- De Andrade, J.I.A., Ono, E.A., De Menezes, G.C., Brasil, E.M., Roubach, R., Urbinati, E.C., Tavares-Dias, M., Marcon, J.L. y Affonso, E.G. 2007. Influence of diets supplemented with vitamins C and E on pirarucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. Comp. Biochem. Physiol., 146A: 576-580.
- De la Higuera, M. y Cárdenas, P. 1985. Influence of dietary composition on gluconeogenesis from L-(U-1C4) Glutamate in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol., 81A: 391-395.
- De Menezes, G.C., Tavares-Dias, M., Ono, E.A., de Andrade, J.I.A., Brasil, E.M., Roubach, R., Urbinati, E.C., Marcon, J.L. y Affonso, E.G. 2006. The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. Comp. Biochem. Physiol., 145A: 274-279.
- De Roos, R. 1994. Plasma ketone, glucose, lactate, and alanine levels in the vascular supply to and from brain of the spiny dogfish shark (*Squalus acanthias*). J. Exp. Zool., 268: 354-363.
- De Silva, S.S. y Perera, M.K. 1984. Digestibility in *Sarotherodon niloticus* fry: effect of dietary protein level and salinity with further observations on variability in daily digestibility. Aquaculture 38: 293-306.
- De Silva, S.S., Gunasekera, R.M., Collins, R.A. y Ingram, B.A. 2002. Performance of juvenile Murray cod, *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell), fed with diets of different protein to energy ratio. Aquacult. Nutr., 8: 79-85.
- Decker, E.A. y Hultin, H.O. 1992. Lipid Oxidation in Muscle Foods via Redox Iron. En: Lipid Oxidation in Food. Angelo, A.S. (Ed.). American Chemical Society, Washington, D.C.
- Deng, J.C., Matthews, R.F. y Watson, C.M. 1977. Effect of chemical and physical treatments on rancidity development of frozen mullet (*Mugil cephalus*) fillets. J. Food Sci., 42: 344-347.
- Deng, J.C., Watson, M., Bates, R.P. y Schroeder, E. 1978. Ascorbic acid as an antioxidant in fish flesh and its degradation. J. Food Sci., 43: 457-460.
- Deng, D.F., Refstie, S. y Hung, S.S.O. 2001. Glycemic and glycosuric responses in white sturgeon *Acipenser transmontanus* after oral administration of simple and complex carbohydrates. Aquaculture, 199: 107-117.
- Deng, L., Zhang, W.M., Lin, H.R. y Cheng, C.H.K. 2004. Effects of food deprivation on expression of growth hormone receptor and proximate composition in liver of black seabream *Acanthopagrus schlegeli*. Comp. Biochem. Physiol., 137B: 421-432.

- Di Giulio, R.T., Benson, W.H., Sanders, B.M. y Van Veld, P.A. 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. En: Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment. Rand, G. (Ed.). Taylor y Francis, London.
- Dias, J., Alvarez, M.J., Diez, A., Arzel, J., Corraze, G., Bautista, J.M. y Kaushik, S.J. 1998. Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein/energy in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 161: 169-186.
- Dias, J., Arzel, J., Aguirre, P., Corraze, G. y Kaushik, S. 2003. Growth and hepatic acetyl coenzyme-A carboxylase activity are affected by dietary protein level in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 135B: 183-196.
- Dieter, M.P. 1970. Enzyme changes in red and white muscle, liver, and plasma of exercised guinea pigs maintained on high or low levels of vitamin C. *Life Sci.*, 9: 301-311.
- Diraison, F. y Beylot, M. 1998. Role of human liver lipogenesis and reesterification in triglycerides secretion and in FFA reesterification. *Am. Physiol. Soc.*, E321-E327.
- Dobson, S.H. y Holmes, R.M. 1984. Compensatory growth in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.* 25: 649-656.
- Doraswamy Reddy, V., Bhaskar, M. y Govindappa, S. 1988. Influence of starvation and refeeding on hepatic tissue glycogen metabolism of freshwater fish, *Sarotherodon mossambicus* (Trevawas). *J. Environ. Biol.*, 9: 15-20.
- Durve, V.S. y Lovell, R.T. 1982. Vitamin C and disease resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 948-951.
- Echevarría, G., Martínez-Bebía, M. y Zamora, S. 1997. Evolution of biometric indices and plasma metabolites during prolonged starvation in European sea bass (*Dicentrarchus Labrax*, L). *Comp. Biochem. Physiol.*, 118A: 111-123.
- Efthimiou, S. 1996. Dietary Intake of  $\beta$ -1,3/1,6 Glucans in juvenile dentex (*Dentex dentex*), Sparidae: Effects on growth performance, mortalities and non-specific defense mechanisms. *J. Appl. Ichthyol.*, 12: 1-7.
- Efthimiou, S., Divanach, P. y Rosenthal, H. 1994. Growth, food conversion and agonistic behaviour in common dentex (*Dentex dentex*) juveniles fed on pelleted moist and dry diets. *Aquat. Living Resour.*, 7: 267-275.
- Einen, O. y Skrede, G.G. 1998. Quality characteristics in raw and smoked fillets of Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed high-energy diets. *Aquacult. Nutr.*, 4: 99-108.
- Einen, O. y Thomassen, M.S. 1998. Starvation prior to slaughter in Atlantic salmon (*Salmo salar*) II. White muscle composition and evaluation of freshness, texture and colour characteristics in raw and cooked fillets. *Aquaculture*, 169: 37-53.
- Elbaraasi, H., Mezes, M., Balogh, K., Horvath, L. y Csengeri, I. 2004. Effects of dietary ascorbic acid/iron ratio on some production traits, lipid peroxide state and amount/activity of the glutathione redox system in African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell) fingerlings. *Aquac. Res.*, 35: 256-262.
- Ellis, S.C. y Reigh, R.C. 1991. Effects of dietary lipid and carbohydrate levels on growth and body composition of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*, 97: 383-394.
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S. y Oliva-Teles, A. 2006. Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Comp. Biochem. Physiol.*, 143A: 89-96.



- Erfanullah y Jafri, A.K. 1995. Protein-sparing effect of dietary carbohydrate in diets for fingerling *Labeo rohita*. *Aquaculture*, 136: 331-339.
- Erfanullah y Jafri, A.K. 1998. Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratio on growth and body composition of walking catfish (*Clarias batrachus*). *Aquaculture*, 161: 159-168.
- Eroldogan, O.T., Kumlu, M., Kiris, G.A. y Sezer, B. 2006. Compensatory growth response of *Sparus aurata* following different starvation and refeeding protocols. *Aquacult. Nutr.*, 12: 203-210.
- Espinós, F.J., Tomás, A., Pérez, L.M., Balasch, S. y Jover, M. 2003. Growth of dentex fingerlings (*Dentex dentex*) fed diets containing different levels of protein and lipid. *Aquaculture*, 218: 479-490.
- Falkmer, S. y Matty, A.I. 1966. Blood sugar regulation in the hagfish *Myxine glutinosa*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 6: 334-346.
- FAO. 2007. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Departamento de Pesca y Acuicultura. <http://www.fao.org/fishery/species/3182>
- Farbridge, K.J. y Leatherland, J.F. 1992. Temporal changes in plasma thyroid hormone, growth hormone and free fatty acid concentrations, and hepatic 5'-monodeiodinase activity, lipid and protein content during chronic fasting and re-feeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.*, 10: 245-257.
- Farkas, T., Csengeri, I., Majoros, F., Olah, J. 1977. Metabolism of fatty acids in fish. I. Development of essential fatty acid deficiency in the carp, *Cyprinus carpio* Linnaeus 1758. *Aquaculture* 11, 147-157.
- Fauconneau, B. 1985. Protein synthesis and protein deposition in fish. En: *Nutrition and Feeding in Fish.* Cowey, C.B, Mackie, A.M. y Bell, J.G. (Eds.). Academic Press, London, pp. 17-45.
- Fernández, M.L., Vega, S., Ayala, M.T., Shen, H., Conde, K., Vergara-Jimenez, M. y Robbins, A. 1997. Vitamin C level and dietary fat saturation alter hepatic cholesterol homeostasis and plasma LDL metabolism in guinea pigs. *J. Nutr. Biochem.*, 8: 414-424.
- Fernández, F., Miquel, A.G., Guinea, J. y Martínez, R. 1998. Digestion and digestibility in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): The effect of diet composition and ration size. *Aquaculture*, 166: 67-84.
- Fessard, V. y Livingstone, D.R. 1998. Development of Western analysis of oxidised proteins as a biomarker of oxidative damage in liver of fish. *Mar. Environ. Res.*, 46: 407-410.
- Fideu, M.D., Soler, G. y Ruiz-Amil, M. 1983. Nutritional regulation of glycolysis in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 74B: 795-799.
- Figueiredo-Garutti, M.L., Navarro, I., Capilla, E., Souza, R., Moraes, G., Gutiérrez, J. y Vicentini-Paulinoe, M.L.M. 2002. Metabolic changes in *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae) during post-feeding and fasting. *Comp. Biochem. Physiol.*, 132A: 467-476.
- Figuroa, R.I., Rodríguez-Sabaris, R., Aldegunde, M. y Soengas, J.L. 2000. Effects of food deprivation on 24 h-changes in brain and liver carbohydrate and ketone body metabolism of rainbow trout. *J. Fish Biol.*, 57: 631-646.
- Firat, K., Saka, S. y Coban, D. 2003. The effect of light intensity on early life development of common dentex *Dentex dentex* (L. 1758) larvae. *Aquac. Res.*, 34: 727-732.
- Fletcher, T.C. 1997. Dietary effects on stress and health. En: *Fish Stress and Health in Aquaculture.* Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P. y Schreck, C.B. (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 223-246.

- Flohé, L. y Günzler, W.A. 1984. Assay of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*, 105: 115-121.
- Folch, J., Lees, M. y Sloane-Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226: 497-509.
- Forman, H.J. y Fridovich, I. 1973. On the stability of bovine superoxide dismutase: the effects of metals. *J. Biol. Chem.*, 248: 2645-2649.
- Forster, I. y Ogata, H.Y. 1998. Lysine requirement of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* and juvenile red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture*, 161: 131-142.
- Fountoulaki, E., Alexis, M.N., Nengas, I. y Venou, B. 2005. Effect of diet composition on nutrient digestibility and digestive enzyme levels of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquac. Res.*, 36: 1243-1251.
- Fracalossi, D.M., Allen, M.E., Yuyama, L.K. y Oftedal, O.T. 2001. Ascorbic acid biosynthesis in Amazonian fishes. *Aquaculture*, 192: 321-332.
- Franicevic, V. 1991. Preliminary results on the larval rearing of common dentex, *Dentex dentex* (Linnaeus, 1758). En: *Aquaculture and Environment*. De Pauw, N.Y.J. (Ed.). European Aquaculture Society, Special Publication, Bredene, Belgium, pp. 106-107.
- Fridovich, I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.*, 247: 1-11.
- Fu, S.J. 2005. The growth performance of southern catfish fed diets with raw, precooked cornstarch and glucose at two levels. *Aquacult. Nutr.*, 11: 257-261.
- Furuichi, M. y Yone, Y. 1982. Changes in activities of hepatic enzymes related to carbohydrate metabolism of fishes in glucose and insulin-glucose tolerance tests. *Nippon Suisan Gakk.*, 48: 463-466.
- Fynn-Aikins, K.H.S., Liu, W. y Li, H. 1992. Growth, lipogenesis and liver composition of juvenile white sturgeon fed different levels of D-glucose. *Aquaculture* 105: 61-72.
- Gaetani, G.F., Galiano, S., Canepa, L., Ferraris, A.M. y Kirkman, H.N. 1989. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*, 73: 334-339.
- Gaetani, G.F., Kirkman, H.N., Mangerini, R. y Ferraris, A.M. 1994. Importance of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*, 84: 325-330.
- Gallagher, M.L. 1999. Growth responses, tissue composition, and liver enzyme changes in juvenile sunshine bass, *Morone chrysops* × *M. saxatilis*, associated with dietary protein and lipid level. *J. Appl. Aquac.*, 9: 41-51.
- García-Gallego, M., Hidalgo, M.C., Suárez, M.D., Sanz, A. y De La Higuera, M. 1993. Feeding of the European eel *Anguilla anguilla* II. Influence of dietary lipid level. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105A: 171-175.
- García-Alcázar, A., Abellán, E. y Ortega, A. 1995. Alimentación de dorada (*Sparus aurata* L.) con piensos de distinta relación proteína/grasa. Influencia en el crecimiento y la composición corporal. En: *Actas del V Congreso Nacional de Acuicultura*, Mayo 10-13, Barcelona. Catelló, F. y Calderer, A. (Eds.). Universitat de Barcelona, Sant Carles de la Ràpita, pp. 492-497.
- Gas, N. 1972. Structural alterations in the white muscle of carp (*Cyprinus carpio* L.) during prolonged starvation. *C. R. Acad. Sci. Ser. D.*, 275: 1403-1406.
- Gaylord, T.G. y Gatlin, D.M. 2001. Dietary protein and energy modifications to maximize compensatory growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 194: 337-348.

- Gélineau, A., Corraze, G., Boujard, T., Larroquet, L. y Kaushik, S. 2001. Relation between dietary lipid level and voluntary feed intake, growth, nutrient gain and hepatic lipogenesis in rainbow trout. *Reprod. Nutr. Dev.*, 41: 487- 503.
- Gillis, T.E. y Ballantyne, J.S. 1996. The effects of starvation on plasma free amino acid and glucose concentrations in Lake Sturgeon. *J. Fish Biol.*, 49: 1306-1316.
- Ginter, E. 1978. Marginal vitamin C deficiency, lipid metabolism and atherogenesis. *Adv. Lipid. Res.*, 16: 167-215.
- Ginter, E. y Bobek, P. 1981. The influence of vitamin C on lipid metabolism. En: *Vitamin C/ Ascorbic Acid. Counsell, J.N. y Hornig, D.H. (Eds.). Applied Science Publishers, London*, pp. 299-347.
- Ginter, E., Cerna, O., Ondreicka, R., Roch, V. y Balaz, V. 1976. Vitamin C and plasma triglycerides in experimental animals and in humans. *Food Chem.*, 1: 23-31.
- Glamuzina, B., Jug-Dujakovic, J. y Katavic, I. 1989. Preliminary studies on reproduction and larval rearing on common dentex, *Dentex dentex* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 77: 75-84.
- Goede, R.W. y Barton, B.A. 1990. Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish. *Am. Fish. Soc. Symp.*, 8: 93-108.
- Gouveia, A., Oliva Teles, A., Gomes, E. y Peres, M.H. 1995. The effect of two dietary levels of raw and gelatinized starch on growth and food utilization by the European seabass. En: *Actas del V Congreso Nacional de Acuicultura, Mayo 10-13, Barcelona. Catelló, F. y Calderer, A. (Eds.). Universitat de Barcelona, Sant Carles de la Ràpita*, pp. 516-521.
- Grau, A., Morales-Nin, B., Quetglas, A., Riera, F., Massuti, E. y Pastor, E. 2001. El modelo reproductivo del dentón *Dentex dentex* (L): bisexualidad juvenil y gonocorismo tardío. En: *Convergencia entre Investigación y Empresa: Un reto para el siglo XXI. Fernández-Palacios, H. e Izquierdo, M. (Eds.). Serie Monografías del ICCM vol. 4*, pp. 555-560.
- Grigorakis, K. y Alexis, M.N. 2005. Effects of fasting on the meat quality and fat deposition of commercial-size farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed different dietary regimes. *Aquacult. Nutr.*, 11: 341-344.
- Grisdale-Helland, B. y Helland, S.J. 1997. Replacement of protein by fat and carbohydrate in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) at the end of the freshwater stage. *Aquaculture*, 152: 167-180.
- Grisdale-Helland, B. y Helland, S.J. 1998. Macronutrient utilization by Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): diet digestibility and growth of 1 kg fish. *Aquaculture*, 166: 57-65.
- Guderley, H., Lapointe, D., Bedard, M. y Dutil, J.D. 2003. Metabolic priorities during starvation: enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 135A: 347-356.
- Guillaume, J., Kaushik, S., Bergot, P. y Métailler, R. 2004. *Nutrición y alimentación de peces y crustáceos. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.*
- Gutiérrez, J., Pérez, J., Navarro, I., Zanuy, S. y Carrillo, M. 1991. Changes in plasma glucagon and insulin associated with fasting in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Physiol. Biochem.*, 9: 107-112.
- Ha, T.Y., Otsuka, M. y Arakawa, N. 1991. The effect of graded doses of ascorbic acid on the tissue carnitine and plasma lipid concentrations. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 136: 227-225.
- Ha, T.Y., Otsuka, M. y Arakawa, N. 1994. Ascorbate indirectly stimulates fatty acid utilization in primary cultured guinea pig hepatocytes by enhancing carnitine synthesis. *J. Nutr.*, 124: 732-737.

- Hajen, W.E., Higgs, D.A., Beames, R.M. y Dosanjh, B.S. 1993. Digestibility of various feedstuffs by post-juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in sea water. 2. Measurements of digestibility. *Aquaculture*, 112: 333-348.
- Halliwell, B. 1996. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo?. *Free Radical Res.*, 25: 439-454.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. 2000. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3ª Ed. Oxford University Press, New York.
- Halver, J.E. 2002. *Fish Nutrition*. Halver, J.E. y Hardy, R.W. (Eds.). Academic Press, London, 824 pp.
- Halver, J.E. y Hardy, R.W. 2002. Nutrient flow and retention. En: *Fish Nutrition*. Halver, J.E. y Hardy, R.W. (Eds.), Academic Press, London, pp. 756-770.
- Halver, J.E., Ashley, L.M. y Smith, R.E. 1969. Ascorbic acid requirements of coho salmon and rainbow trout. *T. Am. Fish. Soc.*, 98: 762-772.
- Hamre, K., Waagbø, R., Berge, R.K. y Lie, O. 1997. Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *Free Radical Bio. Med.*, 22: 137-149.
- Harmon, J.S. y Sheridan, M.A. 1992. Previous nutritional states and glucose modulate glucagon-mediated hepatic lipolysis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Zool. Sci.*, 9: 275-281.
- Harmon, J.S., Eilertson, C.D., Sheridan, M.A. y Plisetskaya, E.M. 1991. Insulin suppression is associated with hypersomatostatinemia and hyperglucagonemia in glucose-injected rainbow trout. *Am. J. Physiol.*, 261: R609-R613.
- Harpaz, S. 2005. L-Carnitine and its attributed functions in fish culture and nutrition-a review. *Aquaculture*, 249: 3- 21.
- Harris, W.S., Kottke, B.A. y Snbbiah, M.T. 1979. Bile acid metabolism in ascorbic acid-deficient guinea pigs. *Am. J. Clin. Nutr.*, 32: 1837-1841.
- Hatlen, B., Grisdale Helland, B. y Helland, S.J. 2005. Growth, feed utilization and body composition in two size groups of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed diets differing in protein and carbohydrate content. *Aquaculture*, 249: 401-408.
- Hayward, R.S., Noltie, D.B. y Wang, N. 1997. Use of compensatory growth to double hybrid sunfish growth rates. *T. Am. Fish Soc.*, 126: 316-322.
- Hemila, H. 1972. Vitamin C and plasma cholesterol. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32: 33-57.
- Hemre, G.I., Sandnes, K., Lie, Ø., Torrissen, O. y Waagbø, R. 1995. Carbohydrate nutrition in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., growth and feed utilisation. *Aquac. Res.*, 26: 149-154.
- Hemre, G.I., Mommsen, T.P. y Krogdahl, A. 2002. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquacult. Nutr.*, 8: 175-194.
- Henrique, M.M.F., Gomes, E.F., Gouillou-Coustans, M.F., Oliva-Teles, A. y Davies, S.J. 1998. Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 161: 415-426.
- Herzberg, G.R. 1991. The 1990 Borden award lecture. Dietary regulation of fatty acid and triglyceride metabolism. *Can. J. Physiol. Pharm.*, 69: 1637-1647.
- Hidalgo, M.C., Sanz, A., Gallego, M.G., Suárez, M.D. y De la Higuera, M. 1993. Feeding of the European eel *Anguilla anguilla*. I. Influence of dietary carbohydrate level. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105A: 165-169.

- Hidalgo, M.C., Urea, E. y Sanz, A. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, 170: 267-283.
- Hidalgo, M.C., Expósito, A., Palma, J.M. y De la Higuera, M. 2002. Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 34: 183-193.
- Hidalgo, M.C., Skalli, A., Abellán, E., Arizcun, M. y Cardenete, G. 2006. Dietary intake of probiotics and maslinic acid in juvenile dentex (*Dentex dentex* L.): effects on growth performance, survival and liver proteolytic activities. *Aquacult. Nutr.*, 12: 256-266.
- Hillestad, M. y Johnsen, F. 1994. High-energy/low-protein diets for Atlantic salmon: effects on growth, nutrient retention and slaughter quality. *Aquaculture*, 124: 109-116.
- Hillestad, M., Johnsen, F. y Asgard, T. 2001. Protein to carbohydrate ratio in high-energy diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac. Res.*, 32: 517-529.
- Hilton, J.W. y Atkinson, J.L. 1982. Response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to increased levels of available carbohydrate in practical trout diets. *Brit. J. Nutr.*, 47: 597.
- Hilton, J.W., Cho, C.Y. y Slinger, S.J. 1977. Factors affecting the stability of supplemental ascorbic acid in practical trout diets. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 34: 683-687.
- Hilton, J.W., Cho, C.Y. y Slinger, S.J. 1978. Effect of graded levels of supplemental ascorbic acid in practical diets fed to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 35: 431-436.
- Hilton, J.W., Cho, C.Y., Brown, R.G. y Slinger, S.J. 1979. The synthesis, half-life and distribution of ascorbic acid in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.*, 63A: 447-453.
- Hochachka, P.W. y Mommsen, T.P. 1995. *Metabolic biochemistry*. Elsevier, Netherlands.
- Hochachka, P.W. y Somero, G.N. 2002. Cellular metabolism, regulation and homeostasis. En: *Biochemical adaptation. Mechanism and process in physiological evolution*. Hochachka, P.W. y Somero (Eds.). Oxford Univ. Press., 20-100.
- Hogendoorn, H. 1983. Growth and production of the African catfish, *Clarias lazera* (C. and V.): III. Bioenergetic relations of body weight and feeding level. *Aquaculture*, 35: 1-17.
- Houlihan, D.F., McMillan, D.N. y Laurent, P. 1986. Growth rates, protein synthesis, and protein degradation rates in rainbow trout- effects of body size. *Physiol. Zool.*, 59: 482-493.
- Houlihan, D.F., Hall, S.J., Gray, C. y Noble, B.S. 1988. Growth rates and protein turnover in atlantic cod, *Gadus morhua*. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 45: 951-964.
- Hsieh, S.L. y Shiau, S.Y. 2000. Effects of diets containing different carbohydrates on starved condition in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Fisheries Sci.*, 66: 32-37.
- Hudecova, A. y Ginter, E. 1992. The influence of ascorbic acid on lipid peroxidation in guinea pigs intoxicated with cadmium. *Food Chem. Toxicol.*, 30: 1011-1013.
- Hulse, J.D., Ellis, S.R. y Henderson, L.M. 1978. Carnitine biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 253: 1654-1661.
- Hung, S.S.O., Liu, W., Li, H.B., Storebakken, T. y Cui, Y.B. 1997. Effect of starvation on some morphological and biochemical parameters in white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Aquaculture*, 151: 357-363.
- Hutchings, J.A., Pickle, A., McGregor-Shaw, C.R. y Poirier, L. 1999. Influence of sex, body size, and reproduction on overwinter lipid depletion in brook trout. *J. Fish Biol.*, 55: 1020-1028.

- Hutchins, C.G., Rawles, S.D. y Gatlin, D.M. 1998. Effects of dietary carbohydrate kind and level on growth, body composition and glycemic response of juvenile sunshine bass (*Morone chrysops* female  $\times$  *M. saxatilis* male). *Aquaculture*, 161: 187-199.
- Hwang, D.F. y Lin, T.K. 2002. Effect of temperature on dietary vitamin C requirement and lipid in common carp. *Comp. Biochem. Physiol.*, 131B: 1-7.
- Ikeda, S., Takasu, M., Matsuda, T., Kakinuma, A. y Horio, F. 1997. Ascorbic acid deficiency decreases the renal level of kidney fatty acid-binding protein by lowering the  $\alpha_2\mu$ -globulin gene expression in liver in scurvy-prone ODS rats. *J. Nutr.*, 127: 2173-2178.
- Ishibashi, Y., Ikeda, S., Murata, O., Nasu, T. y Harada, T. 1992. Optimal supplementary ascorbic acid level in the Japanese parrot fish diet. *Nippon Suisan Gakk.*, 58: 267-270.
- Ito, T., Murata, H., Tsuda, T., Yamada, T., Yanauchi, K., Ukawa, M., Yamaguchi, T., Yoshida, T. y Sakai, T. 1999. Effects of  $\alpha$ -tocopherol levels in extrusion pellets on in vivo lipid peroxidation levels and antioxidant activities in cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata* injected with the causative bacteria of fish jaundice. *Fisheries Sci.*, 65: 679-683.
- Jacob, R.A. 1995. The integrated antioxidant system. *Nutr. Res.*, 15: 755-766.
- Jauncey, K. 1982. The effects of varying dietary protein level on the growth, food conversion, protein utilization and body composition of juvenile tilapias (*Sarotherodon mossambicus*). *Aquaculture*, 27: 43-54.
- Jauncey, K., Soliman, A. y Roberts, R.J. 1985. Ascorbic acid requirements in relations to wound healing in the cultured tilapia *Oreochromis niloticus* (Trewavas). *J. Fish. Manag.*, 16: 139-149.
- Ji, H., Om, A.D., Umino, T., Nakagawa, H., Sasaki, T., Okada, K., Asano, M. y Nakagawa, A. 2003a. Effect of dietary ascorbate fortification on lipolysis activity of juvenile black sea bream *Acanthopagrus schlegeli*. *Fisheries Sci.*, 69: 66-73.
- Ji, H., Om, A.D., Yoshimatsu, T., Hayashi, M., Umino, T., Nakagawa, H., Asano, M. y Nakagawa, A. 2003b. Effect of dietary vitamins C and E fortification on lipid metabolism in red sea bream *Pagrus major* and black sea bream *Acanthopagrus schlegeli*. *Fisheries Sci.*, 69: 1001-1009.
- Jobling, M. 1980. Effects of starvation on proximate chemical composition and energy utilization in plaice, *Pleuronectes platessa* L. *J. Fish Biol.*, 17: 325-334.
- Jobling, M. 1985. Growth. En: *Fish Energetics: New Perspective*. Tyler, P. y Calow, P. (Eds.). Croom Helm, London, pp. 213-230.
- Jobling, M. y Koskela, J. 1996. Interindividual variations in feeding and growth in rainbow trout during restricted feeding and in a subsequent period of compensatory growth. *J. Fish Biol.*, 49: 658-667.
- Johansen, S.J.S., Ekli, M., Stanges, B. y Jobling, M. 2001. Weight gain and lipid deposition in Atlantic salmon, *Salmo salar*, during compensatory growth: evidence for lipostatic regulation? *Aquac. Res.*, 32: 963-974.
- John, T.M., George, J.C., Hilton, J.W. y Slinger, S.J. 1979. Influence of dietary ascorbic acid on plasma lipid levels in the rainbow trout. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 49: 400-405.
- Johnsen, F., Hillestad, M. y Austreng, E. 1993. High energy diets for Atlantic salmon. Effects on pollution. En: *Fish Nutrition in Practice*. Kaushik, S.J. y Luquet, P. (Eds.). INRA (Les Colloques, no. 61), Paris, pp. 391-401.
- Johnston, C.S., Monte, W.C., Bolton, R.S. y Chard, M.H. 1994. A comparison of L-ascorbic acid and L-ascorbyl 6-palmitate utilization in guinea pigs and humans. *Nutr. Res.*, 14: 1465-1471.

- Johnston, D.J., Calvert, K.A., Crear, B.J. y Carter, C.G. 2003. Dietary carbohydrate/lipid ratios and nutritional condition in juvenile southern rock lobster, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture*, 220: 667-682.
- Jover, M., Riera, F., Grau, A., Pastor, E., Espinós, F.J. y Pérez, L. 1999. Resultados preliminares de crecimiento del dentón (*Dentex dentex*) en jaulas flotantes alimentado con piensos extrusionados de diferente relación proteína/lípidos. <http://aquatic.unizar.es>, 7: 1-7.
- Jureczuk, M., Brzoska, M.M., Moniuszko-Jakoniuk, J. 2007. Hepatic and renal concentrations of vitamins E and C in lead- and ethanol-exposed rats. An assessment of their involvement in the mechanisms of peroxidative damage. *Food Chem. Toxicol.*, 45: 1478-1486.
- Jürss, K. y Bastrop, R. 1995. Amino acid metabolism in fish. En: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, vol. 4. Hochachka, P.W. y Mommsen, T.P. (Eds.). Elsevier Science B.V, pp. 159-189.
- Jürss, K., Bittorf, T.H. y H., V.T. 1985. Influence of salinity and ratio of lipid to protein in diets on certain enzyme activities in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 81B: 73-79.
- Kalderon, B., Mayorek, N., Berry, E., Zevit, N. y Bar-Tana, J. 2000. Fatty acid cycling in the fasting rat. *Am. J. Physiol.*, 279: E221-E227.
- Kaushik, S.J. 1990. Importance des lipides dans l'alimentation des poissons. *Aqua. Revue.*, 29: 9-16.
- Kaushik, S.J. y Oliva-Teles, A. 1985. Effect of digestible energy on nitrogen and energy balance in rainbow trout. *Aquaculture*, 50: 89-101.
- Kawai, S. e Ikeda, S. 1972. Studies on digestive enzymes of fishes-II. Effect of dietary change on the activities of digestive enzymes in carp intestine. *Nippon Suisan Gakk.*, 38: 265-270.
- Kiessling, A., Kiessling, K.H., Storebakken, T. y Asgard, T. 1991. Changes in the structure and function of the epaxial muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age: II. Activity of key enzymes in energy metabolism. *Aquaculture*, 93: 357-372.
- Kim, J.D. y Kaushik, S.J. 1992. Contribution of digestible energy from carbohydrates and estimation of protein/energy requirements for growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 106: 161-169.
- Kim, M.K. y Lovell, R.T. 1995. Effect of restricted feeding regimens on compensatory weight gain and body tissue changes in channel catfish *Ictalurus punctatus* in ponds. *Aquaculture*, 135: 285-293.
- Kindschi, G.A. 1988. Effect of intermittent feeding on growth of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Aquat. Fish. Manage.*, 19: 213-215.
- Kirchner, S., Kaushik, S. y Panserat, S. 2003. Low protein intake is associated with reduced hepatic gluconeogenic enzyme expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Nutr.*, 133: 2561-2564.
- Kirchner, S., Seixas, P., Kaushik, S. y Panserat, S. 2005. Effects of low protein intake on extra-hepatic gluconeogenic enzyme expression and peripheral glucose phosphorylation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 140B: 333-340.
- Kirkman, N.H. y Gaetani, G.F. 1984. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 4343-4347.
- Kirkman, H.N., Rolfo, M., Ferraris, A.M. y Gaetani, G.F. 1999. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. kinetics and stochiometry. *J. Biol. Chem.*, 274: 13908-13914.
- Knox, D., Walton, M.J. y Cowey, C.B. 1980. Distribution of enzymes of glycolysis and gluconeogenesis in fish tissues. *Mar. Biol.*, 56: 7-10.

- Kono, Y. y Fridovich, I. 1982. Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.*, 257: 5751-5754.
- Koumoundouros, G., Divanach, P. y Kentouri, M. 1999. Osteological development of the vertebral column and of the caudal complex in *Dentex dentex*. *J. Fish Biol.*, 54: 424-436.
- Koumoundouros, G., Divanach, P. y Kentouri, M. 2001. The effect of rearing conditions on development of saddleback syndrome and caudal fin deformities in *Dentex dentex L.* *Aquaculture*, 200: 285-304.
- Krogdahl, A., Sundby, A. y Olli, J.J. 2004. Atlantic salmon (*Salmo salar*, L) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) digest and metabolize nutrients differently depending on water salinity and dietary starch level. *Aquaculture*, 229: 335-360.
- Krogdahl, A., Hemre, G.I. y Mommsen, T.P. 2005. Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquacult. Nutr.*, 11: 103-122.
- Kumar, J., Banudevi, S., Sharmila, M., Murugesan, P., Srinivasan, N., Balasubramanian, K., Aruldas, M.M. y Arunakaran, J. 2004. Effects of Vitamin C and E on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress, androgen binding protein and lactate in rat Sertoli cells. *Reprod. Toxicol.*, 19: 201-208.
- Kumar, S., Sahu, N.P., Pal, A.K., Choudhury, D., Yengkokpam, S. y Mukherjee, S.C. 2005. Effect of dietary carbohydrate on haematology, respiratory burst activity and histological changes in *L. rohita* juveniles. *Fish Shellfish Immun.*, 19: 331-344.
- Kuz'mina, V.V. 1996. Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. *Aquaculture*, 148: 25-37.
- Lanari, D., Poli, B.M., Ballestrazzi, R., Lupi, P., D'Agaro, E. y Mecatti, M. 1999. The effects of dietary fat and NFE levels on growing European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). Growth rate, body and fillet composition, carcass traits and nutrient retention efficiency. *Aquaculture*, 179: 351-364.
- Lanno, R.P., Slinger, S.J. y Hilton, J.W. 1985. Effect of ascorbic acid on dietary copper toxicity in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture*, 49: 269-287.
- Le Grusse, J. y Watier, B. 1993. Les vitamines. Données biochimiques, nutritionnelles et cliniques. Centre d'Etude et d'Information sur les Vitamines, Neuilly-Sur-Seine.
- LeBlanc, P.J. y Ballantyne, J.S. 1993. 3-hidroxybutyrate dehydrogenase in teleost fish. *J. Exp. Zool.*, 267: 356-358.
- Lee, D.J. y Putnam, G.B. 1980. The response of rainbow trout to varying protein and energy ratios in a test diet. *J. Nutr.*, 103: 916-922.
- Lee, S.M. y Lee, J.H. 2004. Effect of dietary glucose, dextrin and starch on growth and body composition of juvenile starry flounder *Platichthys stellatus*. *Fisheries Sci.*, 70: 53-58.
- Lee, C.M., Weindruch, R. y Aiken, J.M. 1997. Age-associated alterations of the mitochondrial genome. *Free Radical Bio. Med.*, 22: 1259-1269.
- Lee, K.J., Kim, K.W. y Bai, S.C. 1998. Effect of different dietary levels of L-ascorbic acid on growth and tissue vitamin C concentration in juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Aquac. Res.*, 29: 237-244.
- Lee, S.M., Kim, D.J. y Cho, S.H. 2002a. Effects of dietary protein and lipid level on growth and body composition of juvenile ayu (*Plecoglossus altivelis*) reared in seawater. *Aquacult. Nutr.*, 8: 53-58.



- Lee, S.M., Jeon, I.G. y Lee, J.Y. 2002b. Effects of digestible protein and lipid levels in practical diets on growth, protein utilization and body composition of juvenile rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquaculture*, 211: 227-239.
- Lenaz, G. 1998. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim. Biophys. Acta*, 1366: 53-67.
- Leopold, J.A. y Loscalzo, J. 2000. Cyclic strain modulates resistance to oxidant stress by increasing G6PDH expression in smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.*, 279: H2477- H2485.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S. y Stadtman, E.R. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*, 186: 464-478.
- Li, Y. y Lovell, R.T. 1985. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune response in channel catfish. *J. Nutr.*, 115: 123-131.
- Likimani, T.A. y Wilson, R.P. 1982. Effects of diet on lipogenic enzyme activities in channel catfish hepatic and adipose tissue. *J. Nutr.*, 112: 112-117.
- Lim, C. y Lovell, R.T. 1978. Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J. Nutr.*, 108: 1137-1146.
- Lin, J.H. y Shiau, S.Y. 1995. Hepatic enzyme adaptation to different dietary carbohydrates in juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *Fish Physiol. Biochem.*, 14: 165-170.
- Lin, M.F. y Shiau, S.Y. 2004. Requirements of vitamin C (L-ascorbyl-2-monophosphate-Ma and L-ascorbyl-2-monophosphate-Na) and its effects on immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquacult. Nutr.*, 10: 327-333.
- Lin, M.F. y Shiau, S.Y. 2005a. Dietary L-ascorbic acid affects growth, nonspecific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture*, 244: 215-221.
- Lin, M.F. y Shiau, S.Y. 2005b. Requirements of vitamin C (l-ascorbyl-2-sulphate and l-ascorbyl-2-polyphosphate) and its effects on non-specific immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquacult. Nutr.*, 11: 183-189.
- Lin, H., Romsos, D.R., Tack, P.I. y Leveille, G.A. 1977. Influence of dietary lipid on lipogenic enzyme activities in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum). *J. Nutr.*, 107: 846- 854.
- Linnaeus, C. 1758. *Nantes and Pisces*. En: *Systema Naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Holmiae (Ed.). pp. 230-338.
- Liu, P.R., Plumb, J.A., Guerin, M. y Lovell, R.T. 1989. Effect of mega-levels of dietary vitamin C on the immune response of channel catfish *Ictalurus punctatus* in ponds. *Dis. Aquat. Organ.*, 7: 191-194.
- Livingstone, D.R. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, 42: 656-666.
- Lo Bianco, S. 1909. Notizie biologiche riguardanti specialmente il periodo di maturità sessuale degli animali del golfo di Napoli. *Mitt. Zool. Stat. Neapel.*, 19: 513-761.
- Loir, M., Le Gac, F., Somarakis, S. y Pavlidis, M. 2001. Sexuality and gonadal cycle of the common dentex (*Dentex dentex*) in intensive culture. *Aquaculture*, 194: 363-381.
- Love, R.M. 1980. *The chemical biology of fishes*. Academic Press, New York, 943 pp.

- Lovell, R.T. 1979. Factors affecting voluntary food consumption by channel catfish. Proc. World Symp. Finfish Nutr. Fishfeed Technol., 1: 555-564.
- Lovell, R.T. 1989. Nutrition and Feeding of Fish. New York, USA, 260 pp.
- Lovell, R.T. y Lim, C. 1978. Vitamin C in pond diets for channel catfish. T. Am. Fish. Soc., 107: 321-325.
- Lowery, M.S., Roberts, S.J. y Somero, G.N. 1987. Effects of starvation on the activities and localization of glycolytic enzymes in the white muscle of the barred sand bass *Paralabrax nebulifer*. Physiol. Zool., 60: 538-549.
- Lozano-Rey, L. 1930. Los "Dentex" de España y del Marruecos Español. Trabajos del Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid, Serie Zoológica 55: 5-26.
- Lundstedt, L.M., Fernando Bibiano Melo, J. y Moraes, G. 2004. Digestive enzymes and metabolic profile of *Pseudoplatystoma corruscans* (Teleostei: Siluriformes) in response to diet composition. Comp. Biochem. Physiol., 137B: 331-339.
- Lupatsch, Kissil, Sklan y Pfeffer. 2001. Effects of varying dietary protein and energy supply on growth, body composition and protein utilization in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Aquacult. Nutr., 7: 71-80.
- Lupiañez, M.J., Sánchez-Lozano, L., García, R. y De La Higuera, M. 1989. Long-term effect of a high protein/non carbohydrate diet on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout (*Salmo gairdineri*). Aquaculture, 79: 91-101.
- Lygren, B. y Hemre, G.I. 2002. Influence of dietary carbohydrate on antioxidant enzyme activities in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquacult. Int., 9: 421-427.
- Lykkesfeldt, J. 2002. Increased Oxidative damage in vitamin C deficiency is accompanied by induction of ascorbic acid recycling capacity in young but not mature Guinea Pigs. Free Radical Res., 36: 567-574.
- Maage, A., Waagbø, R., Olsson, P.E., Julshamn, K. y Sandnes, K. 1990. Ascorbate-2-sulphate as a dietary vitamin C source for Atlantic salmon (*Salmo salar*): 2. Effects of dietary levels and immunisation on the metabolism of trace elements. Fish Physiol. Biochem., 8: 429-436.
- Mac Farlane, B.R., Harvey, H.R., Bowers, M.J. y Patton, J.S. 1990. Serum lipoproteins in striped bass (*Morone saxatilis*): Effects of starvation. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 47: 739-745.
- Machado, C.R., Garofalo, M.A.R., Roselino, J.E.S., Kettelhut, I.C. y Migliorini, R.H. 1988. Effects of starvation, refeeding and insulin on energy-linked metabolic processes in catfish (*Rhamdia hilarii*) adapted to a carbohydrate-rich diet. Gen. Comp. Endocrinol., 71: 429-437.
- Machielis, M.A.M. y Henken, A.M. 1985. Growth rate, feed utilization and energy metabolism of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), as affected by dietary protein and energy content. Aquaculture, 44: 271-284.
- Mæland, A. y Waagbø, R. 1998. Examination of the qualitative ability of some cold water marine teleosts to synthesise ascorbic acid. Comp. Biochem. Physiol., 121A: 249-255.
- Mannervik, B. 1985. Glutathione peroxidase. Methods Enzymol., 113: 491-495.
- Martínez-Álvarez, R., Morales, A. y Sanz, A. 2005. Antioxidant Defenses in Fish: Biotic and Abiotic Factors. Rev. Fish Biol. Fisher., 15: 75-88.
- Martino, R.C., Cyrino, J.E.P., Portz, L. y Trugo, L.C. 2005. Performance, carcass composition and nutrient utilization of surubim *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz) fed diets with varying carbohydrate and lipid levels. Aquacult. Nutr., 11: 131-137.

- Mazik, P.M., Brandt, T.M. y Tomasso, J.R. 1987. Effects of dietary vitamin C on growth, caudal fin development, and tolerance of aquaculture-related stressors in channel catfish. *The Progressive Fish-Culturist* 49: 13-16.
- McCord, J.M. y Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte. *J. Biol. Chem.*, 244: 6049-6055.
- McGoogan, B.B. y Gatlin III, D.M. 1999. Dietary manipulations affecting growth and nitrogenous waste production of red drum, *Sciaenops ocellatus*: I. Effects of dietary protein and energy levels. *Aquaculture*, 178: 333- 348.
- McMeniman, N. 2003. Digestibility and utilisation of starch by barramundi. En: *Aquaculture Diet Development Subprogram: Ingredient Evaluation, Project 1996-391, Final Report to the Fisheries R&D Corporation*. Allan, G.L., Stone, D.A.J. y Anderson, A.J. (Eds.). Canberra, Australia, pp. 135-139.
- Mehmet, K., Omer, C., Ferah, A., Yesim, H. y Gulnur, K. 2005. Protective effects of vitamin C, alone or in combination with vitamin A, on endotoxin-induced oxidative renal tissue damage in rats. *The Tohoku J. Exp. Med.*, 206: 155-162.
- Meiattini, F., Prencipe, L., Bardelli, F., Giannini, G. y Tarli, P. 1978. The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone chromogenic system used in the enzymic determination of serum cholesterol. *Clin. Chem.*, 24: 2161-2165.
- Méndez, G. y Wieser, W. 1993. Metabolic responses to food deprivation and refeeding in juveniles of *Rutilus rutilus* (Teleostei: Cyprinidae). *Environ. Biol. Fish.*, 36: 73-81.
- Méndez, E., Anastasiadis, P., Kentouri, M., Pavlidis, M. y Divanach, P. 1995. Preliminary data on spawning activity of five mediterranean teleost species kept in captivity, in Crete (Greece). En: *Actas del V Congreso Nacional de Acuicultura*. Castelló, F.Y.C. (Ed.). Sant Carles de la Ràpita, España, pp. 398-403.
- Merchie, G., Lavens, P., Storch, V., Ubel, U., Nelis, H., De Leenheer, A. y Sorgeloos, P. 1996. Influence of dietary vitamin C dosage on turbot (*Scophthalmus maximus*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) nursery stages. *Comp. Biochem. Physiol.*, 114A: 123-133.
- Merchie, G., Lavens, P. y Sorgeloos, P. 1997. Optimization of dietary vitamin C in fish and crustacean larvae: a review. *Aquaculture*, 155: 165-181.
- Metón, I., Mediavilla, D., Caseras, A., Cantó, E., Fernández, F. y Baanante, I.V. 1999. Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Brit. J. Nutr.*, 82: 223-232.
- Metón, I., Caseras, A., Fernández, F. y Baanante, I.V. 2000. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene expression is regulated by diet composition and ration size in liver of gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1491: 220-228.
- Metón, I., Fernández, F. y Baanante, I.V. 2003. Short- and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 225: 99-107.
- Miyasaki, T., Sato, M., Yoshinaka, R. y Sakaguchi, M. 1995. Effect of vitamin C on lipid and carnitine metabolism in rainbow trout. *Fisheries Sci.*, 61: 501-506.
- Mohapatra, M., Sahu, N.P. y Chaudhari, A. 2003. Utilization of gelatinized carbohydrate in diets of *Labeo rohita* fry. *Aquacult. Nutr.*, 9: 189-196.

- Mokoginta, I., Takeuchi, T., Hadadi, A. y Dedi, J. 2004. Different capabilities in utilizing dietary carbohydrate by fingerling and subadult giant gouramy *Osphronemus gouramy*. Fisheries Sci., 70: 996-1002.
- Montano, C.E., Fernandez, M.L. y McNamara, D.J. 1998. Regulation of apolipoprotein B-containing lipoproteins by vitamin C level and dietary fat saturation in guinea pigs. Metabolism, 47: 883-891.
- Montero, D., Marrero, M., Izquierdo, M.S., Robaina, L., Vergara, J.M. y Tort, L. 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. Aquaculture, 171: 269-278.
- Moon, T.W. y Johnston, I.A. 1980. Starvation and the activities of glycolytic and gluconeogenic enzymes in skeletal muscles and liver of the plaice, *Pleuronectes platessa*. J. Comp. Physiol., 136B: 31-38.
- Moon, T.W. y Foster, G.D. 1995. Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. En: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, vol. 4. Hochachka, P.W. y Mommsen, T.P. (Eds.). Elsevier Science B.V, pp. 393-434.
- Moon, T.W., Foster, G.D. y Plisetskaya, E.M. 1989. Changes in peptide hormones and liver enzymes in the rainbow trout deprived of food for 6 weeks. Can. J. Zool., 67: 2189- 2193.
- Moore, M.J. y Stegeman, J.J. 1992. Bromodeoxyuridine uptake in hydropic vacuolation and neoplasms in winter flounder liver. Mar. Environ. Res., 34: 13-18.
- Moore, M.J., Shea, D., Hillman, R.E. y Stegeman, J.J. 1996. Trends in hepatic tumours and hydropic vacuolation, fin erosion, organic chemicals and stable isotope ratios in winter flounder from Massachusetts, USA. Mar. Pollut. Bull., 32: 458-470.
- Morais, S., Torten, M., Nixon, O., Lutzky, S., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T., Tandler, A. y Koven, W. 2006. Food intake and absorption are affected by dietary lipid level and lipid source in seabream (*Sparus aurata* L.) larvae. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 331: 51-63.
- Morales, A.E. 1993. Valoración de la utilización nutritiva de materias primas alternativas a la harina de pescado como componentes de dietas comerciales para la trucha (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis Doctoral. Departamento de Biología Animal y Ecología. Universidad de Granada, España, 282 pp.
- Morales, A.E., García-Rejón, L. y De la Higuera, M. 1990. Influence of handling and/or anaesthesia on stress response in rainbow trout. Effects on liver primary metabolism. Comp. Biochem. Physiol., 95A: 87-93.
- Morales, A.E., Pérez-Jiménez, A., Hidalgo, M.C., Abellán, E. y Cardenete, G. 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. Comp. Biochem. Physiol., 139C: 153-161.
- Morales-Nin, B. y Moranta, J. 1997. Life history and fishery of the common dentex (*Dentex dentex*) in Mallorca (Balearic Islands, western Mediterranean). Fish. Res., 30: 67-76.
- Morata, P., Vargas, A.M., Sánchez-Medina, F., García, M., Cardenete, G. y Zamora, S. 1982. Evolution of gluconeogenic enzyme activities during starvation in liver and kidney of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol., 71B: 65-70.
- Moreau, R. y Dabrowski, K. 1996. The primary localization of ascorbate and its synthesis in the kidneys of acipenserid (Chondrostei) and teleost (Teleostei) fishes. J. Comp. Physiol., 166B: 178-183.

- Moreau, R., Drabrowski, K., Czesny, S. y Cihla, F. 1999. Vitamin C-vitamin E interaction in juvenile lake sturgeon (*Acipenser fulvescens* R.), a fish able to synthesize ascorbic acid. *J. Appl. Ichthyol.*, 15: 250-257.
- Mourente, G., Tocher, D.R., Diaz-Salvago, E., Grau, A. y Pastor, E. 1999a. Study of the n-3 highly unsaturated fatty acids requirement and antioxidant status of *Dentex dentex* larvae at the *Artemia* feeding stage. *Aquaculture*, 179: 291-307.
- Mourente, G., Rodríguez, A., Grau, A. y Pastor, E. 1999b. Utilization of lipids by *Dentex dentex* L. (Osteichthyes, Sparidae) larvae during lecithotrophia and subsequent starvation. *Fish Physiol. Biochem.*, 21: 45-58.
- Mukhopadhyay, C., Ghosh, M. y Chatterjee, I. 1995. Ascorbic acid prevents lipid peroxidation and oxidative damage of proteins in guinea pig extrahepatic tissue microsomes. *Mol. Cell. Biochem.*, 142: 71-78.
- Mustin, W.G. y Lovell, R.T. 1992. Na-L-ascorbyl-2-monophosphate as a source of vitamin C for channel catfish. *Aquaculture*, 105: 95-100.
- Nagababu, E. y Rifking, J.M. 2000. Heme degradation during autoxidation of oxyhemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 273: 839-845.
- Nagayama, F. y Ohshima, H. 1974. Studies on the enzyme system of carbohydrate metabolism in fish- I. Properties of liver hexokinase. *Nippon Suisan Gakk.*, 40: 285-290.
- Nagayama, F., Oshima, K. y Umesawa, K. 1972. Distribution of glucose-6-phosphate from carp, eel and rainbow trout. *Nippon Suisan Gakk.*, 55.
- Nagayama, F., Ohshima, H. y Takeuchi, T. 1973. Activities of hexokinase and glucose dehydrogenase in fish liver. *Nippon Suisan Gakk.*, 39: 1349.
- Naito H. High-density lipoprotein (HDL) cholesterol. En: *J. Clinical Chemistry. Theory, analysis and correlation*. 2ª Ed. Kaplan, L.A. Mosby Co, St. Louis. 1989: 983-990.
- Navarre, O. y Halver, J.E. 1989. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture*, 79: 207-221.
- Navarro, I. y Gutiérrez, J. 1995. Fasting and starvation. En: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Hochachka, P.W. y Mommsen, T.P. (Ed.). Elsevier, Amsterdam, pp. 393-434.
- Navarro, I., Gutiérrez, J. y Planas, J. 1992. Changes in plasma glucagon, insulin and tissue metabolites associated with prolonged fasting in brown trout (*Salmo trutta fario*) during two different seasons of the year. *Comp. Biochem. Physiol.*, 102A: 401-407.
- Navarro, I., Blasco, J., Baños, N. y Gutiérrez, J. 1997. Effects of fasting and feeding on plasma amino acid levels in brown trout. *Fish Physiol. Biochem.*, 16: 303-309.
- Navarro-Arévalo, A., Canavate, C. y Sánchez Del Pino, M.J. 1999. Myocardial and skeletal muscle aging and changes in oxidative stress in relationship to rigorous exercise training. *Mech. Ageing Dev.*, 108: 207-217.
- Nelson, P.J., Pruitt, R.E., Henderson, L.L., Jenness, R. y Henderson, L.M. 1981. Effect of ascorbic acid deficiency on the in vivo synthesis of carnitine. *BBA-Gen. Subjects*, 672: 123-127.
- Nicieza, A.G. y Metcalfe, N.B. 1997. Growth compensation in juvenile Atlantic salmon: responses to depressed temperature and food availability. *Ecol. Freshw. Fish*, 78: 2385-2400.
- Niki, E. 1987. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids*, 44: 227-253.

- Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y. y Noguchi, N. 2005. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 338: 668-676.
- Nikki, J., Pirhonen, J., Jobling, M. y Karjalainen, J. 2004. Compensatory growth in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), held individually. *Aquaculture*, 235: 285-296.
- Nose, T. 1967. On the metabolic fecal nitrogen in young rainbow trout. *Bull. Freshw. Fish Res. Lab.*, 17: 97-105.
- Novak, C.M., Jiang, X., Wang, C., Teske, J.A., Kotz, C.M. y Levine, J.A. 2005. Caloric restriction and physical activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci. Lett.*, 383: 99-104.
- NRC. 1993. Nutrient requirements of fish. Washington DC. USA, 114 pp.
- Ogata, H., Arai, S. y Más-Alvarez, B. 1985. Effect of dietary protein levels on free amino acid contents of juvenile European eel (*Anguilla anguilla*). *Nippon Suisan Gakk.*, 51: 573- 578.
- Ogino, C. y Chen, M.S. 1973. Protein nutrition in fish III: apparent and true digestibility of dietary proteins in carp. *Nippon Suisan Gakk.*, 39: 649-651.
- Okada, M., Matsui, H., Ito, Y., Fujiwara, A. y Inano, K. 1998. Low-density lipoprotein cholesterol can be chemically measured: A new superior method. *J. Lab. Clin. Med.*, 132: 195-201.
- Oliva-Teles, A. 2000. Recent advances in European sea bass and gilthead sea bream nutrition. *Aquacult. Int.*, 8: 477-492.
- Ornstein, L. 1964. Disc electrophoresis: Background and theory. *Ann. New York Acad. Sci.*, 121: 404-427.
- Ortuño, J., Esteban, M.A. y Meseguer, J. 1999. Effect of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immun.*, 9: 429-443.
- Ortuño, J., Cuesta, A., Angeles Esteban, M. y Meseguer, J. 2001. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Vet. Immunol. Immunop.* 79: 167-180.
- Öztürk-Ürek, R., Bozkaya, L.A. y Tarhan, L. 2001. The effects of some antioxidant vitamin- and trace element-supplemented diets on activities of SOD, CAT, GSH-Px and LPO levels in chicken tissues. *Cell Biochem. Funct.*, 19: 125-132.
- Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.-H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, S.K. y Levine, M. 2003. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J. Am. Coll. Nutr.* 22: 18-35.
- Paglia, D.E. y Valentine, W. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, 70: 158-169.
- Pandolfi, P., Sonatí, F., Rivi, R., Mason, P., Grosveld, F. y Luzzatto, J. 1995. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *EMBO J.*, 14: 5209-5215.
- Panserat, S., Médale, F., Blin, C., Brèque, J., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Gomes, E., Krishnamoorthy, R. y Kaushik, S. 2000. Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), gilthead seabream (*Sparus aurata*), and common carp (*Cyprinus carpio*). *Am. J. Physiol.*, 278: R1164-R1170.

- Panserat, S., Capilla, E., Gutiérrez, J., Frappart, P.O., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Aguirre, P., Breque, J. y Kaushik, S. 2001. Glucokinase is highly induced and glucosa 6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucosa. *Comp. Biochem. Physiol.*, 128B: 275-283.
- Panserat, S., Plagnes-Juan, E. y Kaushik, S. 2002. Gluconeogenic enzyme gene expression is decreased by dietary carbohydrates in common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). *BBA-Gene Struct. Expr.*, 1579: 35-42.
- Papadopoulos, M.C., Koumenis, I.L., Dugan, L.L. y Giffard, R.G. 1997. Vulnerability to glucose deprivation injury correlates with glutathione levels in astrocytes. *Brain Res.*, 748: 151-156.
- Párrizas, M., Baños, N., Baró, J., Planas, J. y Gutiérrez, J. 1994. Up-regulation of insulin binding in fish skeletal muscle by high insulin levels. *Regul. Peptides*, 53: 211-222.
- Parvez, S. y Raisuddin, S. 2005. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ. Toxicol. Phar.*, 20: 112-117.
- Parvez, S., Pandey, S., Ali, M. y Raisuddin, S. 2006. Biomarkers of oxidative stress in *Wallago attu* (Bl. and Sch.) during and after a fish-kill episode at Panipat, India. *Sci. Total Environ.*, 368: 627-636.
- Pascual, P., Pedrajas, J.R., Toribio, F., López-Barea, J. y Peinado, J. 2003. Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chem.-Biol. Interact.*, 145: 191-199.
- Pastor, E., Riera, F., Pou, S., Grau, A.M. y Grau, A. 1995. Summary of investigations on reproduction and larval rearing of common dentex (*Dentex dentex* L.). *ICES Mar. Sci. Symp.*, 201: 148-152.
- Pavlidis, M., Loir, M., Fostier, A., Mölsa, H. y Scott, A. 2000a. Recent advances in reproductional aspects of *Dentex dentex*. Recent advances in Mediterranean aquaculture finfish species diversification. *Cash. Options Méditerr.*, 47: 169-176.
- Pavlidis, M., Greenwood, L., Mourot, B., Kokkari, C., Le Menn, F., Divanach, P. y Scott, A.P. 2000b. Seasonal variations and maturity stages in relation to differences in serum levels of gonadal steroids, vitellogenin, and thyroid hormones in the Common Dentex (*Dentex dentex*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 118: 14-25.
- Pavlidis, M., Greenwood, L. y Scott, A.P. 2004. The role of sex ratio on spawning performance and on the free and conjugated sex steroids released into the water by common dentex (*Dentex dentex*) broodstock. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 138: 255-262.
- Pedrajas, J.R., Peinado, J. y López-Barea, J. 1995. Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu,Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chem.-Biol. Interact.*, 98: 267-282.
- Pedrajas, J.R., Gavilanes, F., López-Barea, J. y Peinado, J. 1998. Incubation of superoxide dismutase with malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal forms new active isoforms and adducts. An evaluation of xenobiotics in fish. *Chem.-Biol. Interact.*, 116: 1-17.
- Peragón, J., Barroso, J.B., García-Salguero, L., De la Higuera, M. y Lupiáñez, J.A. 1999. Carbohydrates affect protein-turnover rates, growth, and nucleic acid content in the white muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 179: 425-437.
- Peres, H. y Oliva-Teles, A. 1999a. Influence of temperature on protein utilization in juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 170: 337-348.
- Peres, H. y Oliva-Teles, A. 1999b. Effect of dietary lipid level on growth performance and feed utilization by European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 179: 325-334.

- Peres, H. y Oliva-Teles, A. 2002. Utilization of raw and gelatinized starch by European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 205: 287-299.
- Pérez, L., González, H., Jover, M. y Fernández-Carmona, J. 1997. Growth of European sea bass fingerlings (*Dicentrarchus labrax*) fed extruded diets containing varying levels of protein, lipid and carbohydrate. *Aquaculture*, 156: 183-193.
- Pérez-Jiménez, A., Guedes, M.J., Morales, A.E. y Oliva-Teles, A. 2007. Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. *Aquaculture*, 265: 325-335.
- Pirhonen, J. y Forsman, L. 1998. Effect of prolonged feed restriction on size variation, feed consumption, body composition, growth and smolting of brown trout, *Salmo trutta*. *Aquaculture*, 162: 203-217.
- Polakof, S., Míguez, J.M. y Soengas, J.L. 2007. Daily changes in parameters of energy metabolism in liver, white muscle, and gills of rainbow trout: Dependence on feeding. *Comp. Biochem. Physiol.*, 147A: 363-374.
- Pottinger, T.G., Rand-Weaver, M. y Sumpter, J.P. 2003. Overwinter fasting and re-feeding in rainbow trout: plasma growth hormone and cortisol levels in relation to energy mobilisation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 136B: 403-417.
- Power, D.M., Melo, J. y Santos, C.R.A. 2000. The effect of food deprivation and refeeding on the liver, thyroid hormones and transthyretin in sea bream. *J. Fish Biol.*, 56: 374-387.
- Qian, X., Cui, Y., Xiong, B. y Yang, Y. 2000. Compensatory growth, feed utilization and activity in gibel carp, following feed deprivation. *J. Fish Biol.*, 56: 228-232.
- Quinton, J.C. y Blake, R.W. 1990. The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Fish Biol.*, 37: 33-41.
- Radi, A.A.R., Hay, D.Q., Matkovics, B. y Gabrielak, T. 1985. Comparative antioxidant enzyme study in freshwater fish with different types of feeding behaviour. *Comp. Biochem. Physiol.*, 81B: 395-399.
- Radi, A.A.R., Matkovics, B. y Csengeri, I. 1987. Comparative studies of the phospholipid fatty acids and the antioxidant enzyme activities in fish with different feeding habits. *Comp. Biochem. Physiol.*, 87B: 49-54.
- Ramasarma, T. 1982. Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in biomembranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 694: 69-93.
- Ramos-Esplá, A.A. y Bayle-Sempere, J.T. 1991. Estatuto del *Dentex dentex* (Linnaeus, 1758) en el Mediterráneo. En: *Les Espèces Marines à Protéger en Méditerranée*. Boudouresque, C.F., Avon, M. y Gravez, V. (Eds.). GIS Posidonie Publ., Francia, pp. 238-244.
- Rasmussen, R.S., Ostefeld, T.H. y McLean, E. 2000. Growth and feed utilisation of rainbow trout subjected to changes in feed lipid concentrations. *Aquacult. Int.*, 8: 531-542.
- Rawles, S.D. y Gatlin III, D.M. 1998. Carbohydrate utilization in striped bass (*Morone saxatilis*) and sunshine bass (*M. chrysops* female × *M. saxatilis* male). *Aquaculture*, 161: 201-212.
- Reinitz, G. 1983. Relative effect of age, diet, and feeding rate on the body composition of young rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 35: 19-27.
- Reinitz, G.L., Orme, L.E., Lemm, C.A. y Hitzel, F.N. 1978. Influence of varying lipid concentrations with two protein concentrations in diets for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *T. Am. Fish. Soc.*, 107: 751-754.



- Requena, J.R., Levine, R.L. y Stadtman, E.R. 2003. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino Acids*, V25: 221-226.
- Riera, F., Pastor, E., Grau, A.M., Pou, S., Grau, A. y Massuti, E. 1993. Experiencias en el cultivo del dentón, *Dentex dentex* (L.). En: Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura, Septiembre 21-24, Vilanova de Arousa. Cerviño, A., Landín, A., De Coó, A., Guerra, A. y Torre, M. (Eds.). Centro de Investigaciones Marinas: Pontevedra, España., pp. 143-148.
- Riera, F., Pastor, E., Grau, A.M., Grau, A., Massuti, E., Valencia, J.M., Palmer, G. y Pou, S. 1995. Resultados preliminares del engorde de dentón, *Dentex dentex*, en jaulas flotantes con diferentes tipos de dieta. En: Actas del V Congreso Nacional de Acuicultura, Mayo 10-13, Barcelona. Catelló, F. y Calderer, A. (Eds.). Universitat de Barcelona, Sant Carles de la Rápita, pp. 606-611.
- Robbins, K.R., Norton, H.W. y Baker, D.H. 1979. Estimation of nutrient requirements from growth data. *J. Nutr.*, 109: 1710-1714.
- Robinson, M.K., Rustum, R.R., Chambers, E.A., Rounds, J.D., Wilmore, D.W. y Jacobs, D.O. 1997. Starvation enhances hepatic free radical release following endotoxemia. *J. Surg. Res.*, 69: 325-330.
- Roche, E. y Romero-Alvira, D. 1996. Alteraciones del ADN inducidas por el estrés oxidativo. *Med. Clin.*, 106: 144-153.
- Roehrig, K.L. y Allred, J.B. 1974. Direct enzymatic procedure for the determination of liver glycogen. *Anal. Biochem.*, 58: 414-421.
- Rojas, C., Cadenas, S., Pérez-Campo, R., López-Torres, M. y Barja, G. 1994. Effect of vitamin C on antioxidants, lipid peroxidation, and GSH system in the normal guinea pig heart. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 40: 411-420.
- Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J. y Madrid, J.A. 2005. Fish macronutrient selection through post-ingestive signals: Effect of selective macronutrient deprivation. *Physiol. Behav.*, 84: 651-657.
- Rueda, F.M. y Martínez, F.M. 2001. A review on the biology and potential aquaculture of *Dentex dentex*. *Rev. Fish Biol. Fisher.*, 11: 57-70.
- Rueda, F.M., Martínez, F.J., Zamora, S., Kentouri, M. y Divanach, P. 1998. Effects of fasting and refeeding on growth and body composition of red porgy, *Pagrus pagrus* L. *Aquac. Res.*, 29: 447-452.
- Rueda-Jasso, R., Conceição, L.E.C., Dias, J., De Coen, W., Gomes, E., Rees, J.F., Soares, F., Dinis, M.T. y Sorgeloos, P. 2004. Effect of dietary non-protein energy levels on condition and oxidative status of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Aquaculture*, 231: 417-433.
- Ruiz-Carrera, X. 2004. Situación actual del desarrollo de la metodología de cultivo del Dentón (*Dentex dentex* L.). III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura, 10-17.
- Ruohonen, K., Koskela, J., Vielma, J. y Kettunen, J. 2003. Optimal diet composition for European whitefish (*Coregonus lavaretus*): analysis of growth and nutrient utilisation in mixture model trials. *Aquaculture*, 225: 27-39.
- Russell, P.M., Davies, S.J., Gouveia, A. y Tekinay, A.A. 2001. Influence of dietary starch source on liver morphology in juvenile cultured European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquac. Res.*, 32: 306-314.
- Saether, B.S. y Jobling, M. 1999. The effects of ration level on feed intake and growth, and compensatory growth after restricted feeding, in turbot *Scophthalmus maximus* L. *Aquac. Res.*, 30: 647-653.
- Sagone, A.L., Greenwald, J., Kraut, E.H., Bianchine, J. y Singh, D. 1983. Glucose: A role as a free radical scavenger in biological systems. *J. Lab. Clin. Med.*, 101: 97-103.

- Sahin, T., Akbulut, B. y Aksungur, M. 2000. Compensatory growth in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), sea bream (*Sparus aurata*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Turk. J. Zool., 24: 81-86.
- Saka, S., Firat, K. y Coban, D. 2004. Development of the common dentex (*Dentex dentex*) eggs in relation to temperature. Aquac. Res., 35: 224-231.
- Saltman, P. 1989. Oxidative stress: A radical view. Semin. Hematol., 26: 249-256.
- Salvemini, F., Franzé, A., Iervolino, A., Filosa, S., Salzano, S. y Ursini, M.V. 1999. Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression. J. Biol. Chem., 274: 2750-2757.
- Sánchez-Muros, M.J., García-Rejón, L., García-Salguero, De la Higuera, M. y Lupiáñez, J.A. 1998. Long-term nutritional effects on the primary liver and kidney metabolism in rainbow trout. Adaptive response to starvation and a high-protein, carbohydrate-free diet on glutamate dehydrogenase and alanine aminotransferase kinetics. Int. J. Biochem. Cell B., 30: 55-63.
- Sandnes, K. 1991. Vitamin C in fish nutrition: a review. Fisk. Dir. Skr. Ser. Ernaering, 4: 3-32.
- Sandnes, K., Torrissen, O.J. y Waagbø, R. 1992. The minimum dietary requirement of vitamin C in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry using Ca ascorbate-2-monophosphate as dietary source. Fish Physiol. Biochem., 10: 315-319.
- Santamaría, C., Sala, R., Grau, A., Pastor, E. y Crespo, S. 2001. Aspectos cuantitativos del crecimiento y desarrollo de la larva de dentón, *Dentex dentex*. En: Convergencia entre Investigación y Empresa: un reto para el Siglo XXI. Fernández-Palacios, H. e Izquierdo, M. (Eds.). Serie Monografías del ICCM, vol. 4, pp. 242-247.
- Santillo, M., Mondola, P., Milone, A., Gioielli, A. y Bifulco, M. 1996. Ascorbate administration to normal and cholesterol-fed rats inhibits in vitro TBARS formation in serum and liver homogenates. Life Sci., 58: 1101-1108.
- Santinha, P.J.M. Médale, F., Corraze, G. y Gomes, E.F.S. 1999. Effects of the dietary protein: lipid ratio on growth and nutrient utilization in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Aquacult. Nutr., 5: 147-156.
- Santulli, A., Messina, C.M. y D'Amelio, V. 1997. Variations of lipid and apolipoprotein content in lipoproteins during fasting in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Comp. Biochem. Physiol., 118A: 1233-1239.
- Sanz, A., Suárez, M.D., Hidalgo, M.C., García Gallego, M. y De la Higuera, M. 1993. Feeding of the european eel *Anguilla anguilla*. III. Influence of the relative proportions of the energy yielding nutrients. Comp. Biochem. Physiol., 105A: 177-182.
- Sargent, J., McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G., Bell, M., Henderson, J. y Tocher, D. 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. Aquaculture, 179: 217-229.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R. y Bell, J.G. 2002. The lipids. En: Fish Nutrition. Halver, J. E. y Hardy, R.W. (Eds.). Academic Press, London, pp. 182-257.
- Sato, M., Yoshinaka, R., Yamamoto, Y. y Ikeda, S. 1978. Non-essentiality of ascorbic acid in the diet of carp. Nippon Suisan Gakk., 44: 1151-1156.
- Sato, M., Kondo, T., Yashinaka, R. y Ikeda, S. 1982. Effect of dietary ascorbic acid levels on collagen formation in rainbow trout. Nippon Suisan Gakk., 48: 553-556.
- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R. y Raisuddin, S. 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). Ecotox. Environ. Safe., 56: 295-301.

- Schwarz, F.J., Plank, J. y Kirchgessner, M. 1985. Effects of protein or energy restriction with subsequent realimentation on performance parameters of carp *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture*, 48: 23-33.
- Segner, H., Dolle, A. y Bohm, R. 1997. Ketone body metabolism in the carp *Cyprinus carpio*: biochemical and <sup>1</sup>H NMR spectroscopical analysis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 116B: 257-262.
- Sheridan, M.A. y Mommsen, T.P. 1991. Effects of nutritional state on in vivo lipid and carbohydrate metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 81: 473-483.
- Shiau, S.Y. 1997. Utilization of carbohydrates in warmwater fish - with particular reference to tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquaculture*, 151: 79-96.
- Shiau, S.Y. y Jan, F.L. 1992. Dietary ascorbic acid requirement of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Nippon Suisan Gakk.*, 58: 671- 675.
- Shiau, S.Y. y Hsu, T.S. 1993. Stability of ascorbic acid in shrimp feed during analysis. *Nippon Suisan Gakk.*, 59: 1535-1537.
- Shiau, S.Y. y Peng, C.Y. 1993. Protein-sparing effect by carbohydrates in diets for tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquaculture*, 117: 327-334.
- Shiau, S.Y. y Chuang, J.C. 1995. Utilization of disaccharides by juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquaculture*, 133: 249-256.
- Shiau, S.Y. y Hsu, T.S. 1995a. Tissue storage of ascorbic acid in tilapia, *Oreochromis niloticus* × *aureus* fed L-ascorbic acid, L-ascorbyl-2-sulfate or L-ascorbyl-2-monophosphate. *Fisheries. Sci.*, 61: 1043-1044.
- Shiau, S.Y. y Hsu, T.S. 1995b. -ascorbyl-2-sulfate has equal antiscorbutic activity as -ascorbyl-2-monophosphate for tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquaculture*, 133: 147-157.
- Shiau, S.Y. y Lan, C.W. 1996. Optimal dietary protein level and protein to energy ratio for growth of grouper (*Epinephelus malabaricus*). *Aquaculture*, 145: 259-266.
- Shiau, S.Y. y Hsu, T.S. 1999. Quantification of vitamin C requirement for juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*, with -ascorbyl-2-monophosphate-Na and -ascorbyl-2-monophosphate-Mg. *Aquaculture*, 175: 317-326.
- Shiau, S.Y. y Lin, Y.H. 2002. Utilization of glucose and starch by the grouper *Epinephelus malabaricus* at 23°C. *Fisheries Sci.*, 68: 991-995.
- Shiau, S.Y. y Hsu, C.Y. 2002. Vitamin E sparing effect by dietary vitamin C in juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquaculture*, 210: 335-342.
- Shimeno, S. 1982. Studies on carbohydrate metabolism in fish. Bakelma, Rotterdam, 123 pp.
- Shimeno, S. y Takeda, M. 1972. Studies on hexose monophosphate shunt of fish. I Properties of hepatic glucose-6-phosphate dehydrogenase of barracuda. *Nippon Suisan Gakk.*, 38: 645-650.
- Shimeno, S. y Takeda, M. 1973. Studies on hexose monophosphate shunt of fish. II Distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nippon Suisan Gakk.*, 39: 461-466.
- Shimeno, S., Hosokawa, H., Hirata, H. y Takeda, M. 1977. Comparative studies of carbohydrate metabolism of yellowtail and carp. *Nippon Suisan Gakk.*, 43: 213-217.
- Shimeno, S., Takeda, M., Takayama, S., Fukui, A., Sasaki, H. y Kajiyama, H. 1981. Adaptation of hepatopancreas enzymes to dietary carbohydrate in carp. *Nippon Suisan Gakk.*, 47: 71-77.
- Shimeno, S., Kheyyali, D. y Takeda, M. 1990. Metabolic adaptation to prolonged starvation in carp. *Nippon Suisan Gakk.*, 56: 35-41.

- Shimeno, S., Duan-Cun-Ming y Takeda, M. 1993. Regulation of carbohydrate metabolism in fish XVI. Metabolic response to dietary carbohydrate to lipid ratios in *Oreochromis niloticus*. Nippon Suisan Gakk., 59: 827-833.
- Shimeno, S., Shikata, T., Hosokawa, H., Masumoto, T. y Kheyyali, D. 1997. Metabolic response to feeding rates in Common Carp, *Cyprinus Carpio*. Aquaculture, 151: 371-377.
- Shyong, W.J., Huang, C.H. y Chen, H.C. 1998. Effects of dietary protein concentration on growth and muscle composition of juvenile *Zacco barbata*. Aquaculture, 167: 35-42.
- Sies, H. 1985. Oxidative stress: introductory remarks. En: Oxidative stress. Sies, H. (Ed.). Academic Press, London, pp. 1-8.
- Sies, H. 1986. Biochemistry of oxidative stress. Angew. Chem., Int. Ed., 25: 1058-1071.
- Sies, H. 1993. Strategies of antioxidant defense. Eur. J. Biochem., 215: 213-219.
- Simon, J.A. 1992. Vitamin C and cardiovascular disease: A review. J. Am. Coll. Nutr., 11: 107-124.
- Singer, T.D., Mahadevappa, V.G. y Ballantyne, J.S. 1990. Aspects of the energy metabolism of lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, with special emphasis on lipid and ketone body metabolism. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 47: 873-881.
- Singh, R.P. y Nose, T. 1967. Digestibility of carbohydrates in young rainbow trout. Bull. Freshw. Fish Res. Lab., 17: 21-25.
- Skalli, A. 2001. Estudio fisiológico y nutricional de una nueva especie de espárido para el cultivo intensivo: el dentón (*Dentex dentex*). Tesis Doctoral. Departamento de Biología Animal y Ecología. Universidad de Granada, España, 285 pp.
- Skalli, A., Hidalgo, M.H., Abellán, E., Arizcun, M. y Cardenete, G. 2004. Effects of the dietary protein/lipid ratio on growth and nutrient utilization in common dentex (*Dentex dentex* L.) at different growth stages. Aquaculture, 235: 1-11.
- Soengas, J.L., Strong, E.F., Fuentes, J., Veira, J.A.R. y Andres, M.D. 1996. Food deprivation and refeeding in Atlantic Salmon, *Salmo salar*: effects on brain and liver carbohydrate and ketone bodies metabolism. Fish Physiol. Biochem., 15: 491-511.
- Soengas, J.L., Strong, E.F. y Andrés, M.D. 1998. Glucose, lactate, and  $\beta$ -hydroxybutyrate utilization by rainbow trout brain: changes during food deprivation. Physiol. Zool., 71: 285-293.
- Soengas, J.L., Polakof, S., Chen, X., Sangiao-Alvarellos, S. y Moon, T.W. 2006. Glucokinase and hexokinase expression and activities in rainbow trout tissues: changes during food deprivation and refeeding. Am. J. Physiol., 291: R810-R821.
- Soliman, A.K., Jauncey, K. y Roberts, R.J. 1985. Qualitative and quantitative identification of L-gulonolactone oxidase activity in some teleosts. Aquacult. Fisheries Man., 1: 249-256.
- Soliman, A.K., Jauncey, K. y Roberts, R.J. 1987. Stability of L-ascorbic acid (vitamin C) and its forms in fish feeds during processing, storage and leaching. Aquaculture, 60: 73-83.
- Soljan, T. y Ribe, J. 1965. Pisces, Maris Adriatici, Beograd, 451 pp.
- Spannhof, L. y Plantikow, H. 1983. Studies on carbohydrate digestion by rainbow trout. Aquaculture, 30: 95-108.
- Spies, J.R. 1957. Colorimetric procedures for amino acids. En: Methods in enzymology. Colowick, S.P. y Kaplan, N.O. (Eds.). Academic Press, New York, pp. 467-471.

- Stadtman, E.R. 1990. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Bio. Med.*, 9: 315-325.
- Stadtman, E.R. 1991. Ascorbic acid and oxidative inactivation of protein. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54: 1125S-1128S.
- Stadtman, E.R. 2006. Protein oxidation and aging. *Free Radical Res.*, 40: 1250-1258.
- Steffens, W. 1989. *Principles of Fish Nutrition*. Ellis Horwood, Chichester, pp. 384.
- Stéphan, G., Guillaume, J. y Lamour, F. 1995. Lipid peroxidation in turbot (*Scophthalmus maximus*) tissue: effect of dietary vitamin E and dietary n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture*, 130: 251-268.
- Stephanis, J. y Divanach, P. 1993. Farming of Mediterranean finfish species. Present status and potentials. En: *From discovery to commercialization*. Carrillo, M.D., Morales, J., Sorgeloos, P., Svennevig, N. y Wyban, J. (Eds.). European Aquaculture Society. Special Publication, Oostende, Belgium, pp. 290-291.
- Stieber, S.T. y Cvancara, V.A. 1977. Tissue deamination of L-aminoacids in the teleost *Stizostedion vitreum*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 56B: 285-287.
- Stone, D.A.J. 2003. Dietary carbohydrate utilization by fish. *Rev. Fish. Sci.*, 11: 337-369.
- Stone, D.A.J., Allan, G.L. y Anderson, A.J. 2003. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). III. The protein-sparing effect of wheat starch-based carbohydrates. *Aquac. Res.*, 34: 123-134.
- Storebakken, T., Shearer, K.D., Refstie, S., Lagocki, S. y McCool, J. 1998. Interactions between salinity, dietary carbohydrate source and carbohydrate concentration on the digestibility of macronutrients and energy in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 163: 347-359.
- Storey, K.B. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 29: 1715-1733.
- Suárez, R.K. y Mommsen, T.P. 1987. Gluconeogenesis in teleost fishes. *Can. J. Zool.*, 65: 1869-1882.
- Suárez, M.D., Hidalgo, M.C., García Gallego, M., Sanz, A. y De la Higuera, M. 1995. Influence of the relative proportions of energy yielding nutrients on liver intermediary metabolism of the European eel. *Comp. Biochem. Physiol.*, 111A: 421-428.
- Suárez, M.D., Sanz, A., Bazoco, J. y García-Gallego, M. 2002. Metabolic effects of changes in the dietary protein: carbohydrate ratio in eel (*Angilla anguilla*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquacult. Int.*, 10: 143-156.
- Sundby, A., Hemre, G.I., Borrebæk, B., Christophersen, B. y Blom, A.K. 1991. Insulin and glucagon family peptides in relation to activities of hepatic hexokinase and other enzymes in fed and starved Atlantic salmon (*Salmo salar*) and cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 100B: 467-470.
- Sweetman, J.W. 1992. Larviculture of Mediterranean marine fish species: current status and future trends. *J. World Aquacult. Soc.*, 23: 330-337.
- Tacon, A.G.J. 1994. Feed ingredients for carnivorous fish species: Alternatives to fishmeal and other dietary resources. *FAO-Fish. Circ.*, 881: 35.
- Tacon, A.G.J. 2003. Global trends in aquaculture and compound aquafeed production - a review. *International Aquafeed Directory and Buyers Guide 2003*, 8-23. World Aquaculture Society, Turret RAI plc.

- Tacon, A.G.J. y Cowey, C.B. 1985. Protein and amino acid requirements. En: Fish Energetics: New Perspectives. Tyler, P. y Calow, P. (Eds.). Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp. 155-184.
- Tan, Q., Xie, S., Zhu, X., Lei, W. y Yang, Y. 2006. Effect of dietary carbohydrate sources on growth performance and utilization for gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) and Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris* Günther). *Aquacult. Nutr.*, 12: 61-70.
- Tanaka, K., Hashimoto, T., Tokumaru, S., Iguchi, H. y Kojo, S. 1997. Interactions between vitamin C and vitamin E are observed in tissues of inherently scorbutic rats. *J. Nutr.*, 127: 2060-2064.
- Tappel, A.L. 1962. Vitamin E as the biological lipid antioxidant. *Vitam. Horm.*, 20: 493-510.
- Teshima, S.I., Kanazawa, A., Koshio, S. e Itoh, S. 1993. L-Ascorbyl-2-phosphate-Mg as vitamin C source for the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). En: Fish Nutrition in Practice, Biarritz, France, 24-27 June 1991. Kaushik, S.J. y Luquet, P. (Eds.). INRA Editions, Les Colloques, France, pp. 157-166.
- Thibault, M., Blier, P.U. y Guderley, H. 1997. Seasonal variation of muscle metabolic organization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.*, 16: 139-155.
- Thomas, P., Bally, M.B. y Neff, J.M. 1985. Influence of some environmental variables on the ascorbic acid status of mullet, *Mugil cephalus* L. tissues. II. Seasonal fluctuations and biosynthetic ability. *J. Fish Biol.*, 27: 47-57.
- Thompson, I., White, A., Fletcher, T.C., Houlihan, D.F. y Secombes, C.J. 1993. The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets containing different amounts of vitamin C. *Aquaculture*, 114: 1-18.
- Thophon, S., Kruatrachue, M., Upatham, E.S., Pokethitiyook, P., Sahaphong y S., Jaritkhuan, S. 2003. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ. Pollut.*, 121: 307-320.
- Tian, X. y Qin, J.G. 2003. A single phase of food deprivation provoked compensatory growth in barramundi *Lates calcarifer*. *Aquaculture*, 224: 169-179.
- Tian, W.N., Braunstein, L.D., Apse, K., Pang, J., Rose, M., Tian, X. y Stanton, R.C. 1999. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *Am. J. Physiol.*, 276: C1121-C1131.
- Tibaldi, E., Beraldo, P., Volpelli, L.A. y Pinosa, M. 1996. Growth response of juvenile dentex (*Dentex dentex* L.) to varying protein level and protein to lipid ratio in practical diets. *Aquaculture*, 139: 91-99.
- Tidwell, J.H. y Allan, G.L. 2001. Fish as food: aquaculture's contribution. *EMBO J.*, 2: 958-963.
- Tiidus, P.M. y Houston, M.E. 1994. Antioxidant and oxidative enzyme adaptations to vitamin E deprivation and training. *Med. Sci. Sport Exer.*, 26: 354-359.
- Tocher, D.R., Mourente, G., Van der Eecken, A., Evjemo, J.O., Diaz, E., Bell, J.G., Geurden, I., Lavens, P. y Olsen, Y. 2002. Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.), halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquacult. Nutr.*, 8: 195-207.
- Tokur, B. y Korkmaz, K. 2007. The effects of an iron-catalyzed oxidation system on lipids and proteins of dark muscle fish. *Food Chem.*, 104: 754-760.
- Tortonese, E. 1975. Osteichthyes (Pesci Ossei), Part 2. En: Fauna d' Italia. Calderini (Ed.). Bologna, pp. 97-98.

- Tranulis, M.A., Christophersen, B., Biota, A.K. y Borrebaek, B. 1991. Glucose dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase in liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) effects of starvation and temperature variations. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99B: 687-691.
- Tranulis, M.A., Dregni, O., Christophersen, B., Krogdahl, A. y Borrebaek, B. 1996. A glucokinase-like enzyme in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 114B: 35-39.
- Trenzado, C.E. 2004. Selección parental y dieta como estrategias de atenuación del estrés crónico en trucha *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). Tesis Doctoral. Departamento de Biología Animal. Universidad de Granada, España, 350 pp.
- Trenzado, C.E., De la Higuera, M. y Morales, A.E. 2007. Influence of dietary vitamins E and C and HUFA on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) performance under crowding conditions. *Aquaculture*, 263: 249-258.
- Trinder, P. 1969. Determination of glucose blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.*, 6: 24-27.
- Tulli, F. y Tibaldi, E. 1997. Changes in amino acids and essential fatty acids during early larval rearing of dentex. *Aquacult. Int.*, 5: 229-236.
- Valenzuela, A. 1991. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci.*, 48: 301-309.
- Van Kampen, E.J. y Zijlstra, W.J. 1961. Standardization of hemoglobinometry. *Clin. Chim. Acta*, 6: 538-544.
- Van Waarde, A. 1983. Aerobic and anaerobic ammonia production by fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 74B: 675-684.
- Vendemiale, G., Grattagliano, I., Caraceni, P., Caraccio, G., Domenicali, M., Dall'Agata, M., Trevisani, F., Guerrieri, F., Bernardi, M. y Altomare, E. 2001. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: Effect of the nutritional status. *Hepatology*, 33: 808-815.
- Venkataraman, P., Muthuvel, R., Krishnamoorthy, G., Arunkumar, A., Sridhar, M., Srinivasan, N., Balasubramanian, K., Aruldas, M.M. y Arunakaran, J. 2007. PCB (Aroclor 1254) enhances oxidative damage in rat brain regions: Protective role of ascorbic acid. *Neurotoxicology*, 28: 490-498.
- Venou, B., Alexis, M.N., Fountoulaki, E., Nengas, I., Apostolopoulou, M. y Castritsi-Cathariou, I. 2003. Effect of extrusion of wheat and corn on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth, nutrient utilization efficiency, rates of gastric evacuation and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 225: 207-223.
- Vergara, J.M., Robaina, L., Izquierdo, M. y De la Higuera, M. 1996. Protein sparing effect of lipids in diets for fingerlings of gilthead seabream. *Fisheries Sci.*, 62.
- Vergara, J.M., Lopez-Calero, G., Robaina, L., Caballero, M.J., Montero, D., Izquierdo, M.S. y Aksnes, A. 1999. Growth, feed utilization and body lipid content of gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed increasing lipid levels and fish meals of different quality. *Aquaculture*, 179: 35-44.
- Verlhac, V. y Gabaudan, F. 1994. Influence of vitamin C on the immune system of salmonids. *Aquat. Fish Manage.*, 25: 21-36.
- Verlhac, V. y Gabaudan, J. 1997. The effect of vitamin C on Fish Health. Roche Technical Buletin, Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland, 30 pp.
- Vieira, V.P., Inoue, L.A.K. y Moraes, G. 2005. Metabolic responses of matrinxa (*Brycon cephalus*) to dietary protein level. *Comp. Biochem. Physiol.* 140A, 337-342.

- Vielma, J., Koskela, J., Ruohonen, K., Jokinen, I. y Kettunen, J. 2003. Optimal diet composition for European whitefish (*Coregonus lavaretus*): carbohydrate stress and immune parameter responses. *Aquaculture*, 225: 3-16.
- Viganò, L., Arillo, A., Bagnasco, M., Bennicelli, C. y Melodia, F. 1993. Xenobiotic metabolizing enzymes in uninduced and induced rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects of diets and food deprivation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104C: 51-55.
- Vigliano, F.A., Quiroga, M.I. y Nieto, J.M. 2002. Adaptaciones metabólicas al ayuno y realimentación en peces. *Rev. Ictiol.*, 10: 79-108.
- Vijayan, M.M., Ballantine, J.S. y Leatherland, J.F. 1990. High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture*, 88: 371-381.
- Vijayan, M.M., Maule, A.G., Schreck, C.B. y Moon, T.W. 1993. Hormonal control of hepatic glycogen metabolism in food-deprived, continuously swimming coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50: 1676-1682.
- Vivas, M., Sánchez-Vázquez, F.J., García, B.G. y Madrid, J.A. 2003. Macronutrient self-selection in European sea bass in response to dietary protein or fat restriction. *Aquac. Res.*, 34: 271-280.
- Vivas, M., Rubio, V.C., Sánchez-Vázquez, F.J., Mena, C., García-García, B. y Madrid, J.A. 2006. Dietary self-selection in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) fed paired macronutrient feeds and challenged with protein dilution. *Aquaculture*, 251: 430-437.
- Vulliamy, T., Mason, P. y Luzzatto, L. 1992. The molecular basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Trends Genet.*, 4: 138-143.
- Waagbø, R. 1997. The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: A review. *Aquacult. Fish. Manage.*, 25: 175-197.
- Waagbø, R., Glette, J., Raa-Nilsen, E. y Sandnes, K. 1993. Dietary vitamin C, immunity and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.*, 12: 61-73.
- Waagbø, R., Glette, J., Sandnes, K. y Hemre, G.I. 1994. Influence of dietary carbohydrate on blood chemistry, immunity and disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, 17: 245-258.
- Walton, M.J. 1986. Metabolic effects of feeding of a high protein/low carbohydrate diet as compared to a low protein/high carbohydrate diet to rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Fish Physiol. Biochem.*, 1: 7-15.
- Walton, M.J. y Cowey, C.B. 1982. Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73B: 59-79.
- Wang, Y., Cui, Y., Yang, Y. y Cai, F. 2000. Compensatory growth in hybrid tilapia, *Oreochromis mossambicus* × *O. niloticus*, reared in seawater. *Aquaculture*, 189: 101-108.
- Wang, X., Kangwoong, K. y Bai, S.C. 2002. Effects of different dietary levels of L-ascorbyl-2-polyphosphate on growth and tissue vitamin C concentrations in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquac. Res.*, 33: 261-267.
- Wang, X., Kim, K.W., Bai, S.C., Huh, M.D. y Cho, B.Y. 2003a. Effects of the different levels of dietary vitamin C on growth and tissue ascorbic acid changes in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Aquaculture*, 215: 203-211.
- Wang, X.J., Kim, K.W., Park, G.J., Choi, S.M., Jun, H.K. y Bai, S.C. 2003b. Evaluation of L-ascorbyl-2-glucose as the source of vitamin C for juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Aquac. Res.*, 34: 1337-1341.



- Wang, J.T., Liu, Y.J., Tian, L.X., Mai, K.S., Du, Z.Y., Wang, Y. y Yang, H.J. 2005a. Effect of dietary lipid level on growth performance, lipid deposition, hepatic lipogenesis in juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 249: 439-447.
- Wang, Y., Liu, Y.J., Tian, L.X., Du, Z.Y., Wang, J.T., Wang, S. y Xiao, W.P. 2005b. Effects of dietary carbohydrate level on growth and body composition of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquac. Res.*, 36: 1408-1413.
- Wang, Y., Guo, J.L., Li, K. y Bureau, D.P. 2006a. Effects of dietary protein and energy levels on growth, feed utilization and body composition of cuneate drum (*Nibea miichthioides*). *Aquaculture*, 252: 421-428.
- Wang, C., Xie, S., Zhu, X., Lei, W., Yang, Y. y Liu, J. 2006b. Effects of age and dietary protein level on digestive enzyme activity and gene expression of *Pelteobagrus fulvidraco* larvae. *Aquaculture*, 254: 554-562.
- Warman, A.W. y Bottino, N.R. 1978. Lipogenic activity of catfish liver, lack of response to dietary changes and insulin administration. *Comp. Biochem. Physiol.*, 59B: 153-161.
- Watanabe, T. 1982. Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73B: 3-15.
- Watanabe, T. 2002. Strategies for further development of aquatic feeds. *Fisheries Sci.*, 68: 242-252.
- Weatherley, A.H. y Gill, H.S. 1981. Recovery growth following periods of restricted rations and starvation in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Biol.*, 18: 195-208.
- Weatherley, A.H. y Gill, H.S. 1987. *The biology of fish growth*. Academic Press, London, 443 pp.
- Weight, M.J., Kotze, J.P., de Klerk, W.A. y Weight, N. 1974. The effect of dietary ascorbic acid on cholesterol biosynthesis in vitro. *Int. J. Biochem.*, 5: 287-290.
- Weisigner, R.A. y Fridovich, I. 1973. Superoxide dismutase: organelle specificity. *J. Biol. Chem.*, 248: 3582-3592.
- Wendelaar-Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77: 591-625.
- Wilson, R.P. 1973. Absence of ascorbic acid synthesis in channel catfish *Ictalurus punctatus* and blue catfish *Ictalurus frucatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 46B: 635-638.
- Wilson, R.P. 1994. Utilization of dietary carbohydrate by fish. *Aquaculture*, 124: 67-80.
- Wilson, R.P. y Poe, W.E. 1973. Impaired collagen formation in the scorbutic channel catfish. *J. Nutr.*, 103: 1359-1364.
- Wilson, R.P., Poe, W.E. y Robinson, E.H. 1989. Evaluation of L-ascorbyl-2-polyphosphate (AsPP) as a dietary ascorbic acid source for channel catfish. *Aquaculture*, 81: 129-136.
- Winston, G.W. y Di Giulio, R.T. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, 19: 137-161.
- Winter, M.L. y Liehr, J.G. 1991. Free radical-induced carbonyl content in protein of estrogen-treated hamsters assayed by sodium Boro [<sup>3</sup>H] hydride reduction. *Biol. Chem.*, 266: 14446-14450.
- Wom, J.K., No, J.K., Ikeno, Y., Yu, B.P., Choi, J.S., Yokozawa, T. y Chung, H.Y. 2002. Age-related changes in redox status of rat serum. *Arch. Gerontol. Geriat.*, 34: 9-17.
- Wolf, S.P., Crabba, M.J.C. y Thornalley, P.J. 1984. The autoxidation of simple monosaccharides. *Experientia.*, 40: 244-246.

- Xie, S., Zhu, X., Cui, Y., Wootton, R.J., Lei, W. y Yang, Y. 2001. Compensatory growth in the gibel carp following feed deprivation: temporal patterns in growth, nutrient deposition, feed intake and body composition. *J. Fish Biol.*, 58: 999-1009.
- Xie, Z., Niu, C., Zhang, Z. y Bao, L. 2006. Dietary ascorbic acid may be necessary for enhancing the immune response in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*), a species capable of ascorbic acid biosynthesis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 145A: 152-157.
- Yamamoto, Y.K., Ishii, T., Sato, M. y Ikeda, S. 1977. Effect of dietary ascorbic acid on the accumulation of copper in carp. *Nippon Suisan Gakk.*, 43: 989-995.
- Yamamoto, Y., Sato, M. y Ikeda, S. 1978. Existence of L-gulonolactone oxidase in some teleosts. *Nippon Suisan Gakk.*, 44: 775-779.
- Yamamoto, Y.K., Hayama, K. y Ikeda, S. 1981. Effect of dietary ascorbic acid on copper poisoning in rainbow trout. *Nippon Suisan Gakk.*, 47: 1085-1089.
- Yamamoto, T., Unuma, T. y Akiyama, T. 2000. The influence of dietary protein and fat levels on tissue free amino acid levels of fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 182: 353-372.
- Yamamoto, T., Konishi, K., Shima, T., Furuita, H., Suzuki, N. y Tabata, M. 2001. Influence of dietary fat and carbohydrate levels on growth and body composition of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* under self-feeding conditions. *Fisheries Sci.*, 67: 221-227.
- Yamamoto, T., Shima, T., Furuita, H. y Suzuki, N. 2002. Influence of dietary fat level and whole body adiposity on voluntary energy intake by juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) under selffeeding conditions. *Aquac. Res.*, 33: 715-723.
- Yang, T.H. y Somero, G.N. 1993. Effects of feeding and food deprivation on oxygen consumption, muscle protein concentration and activities of energy metabolism enzymes in muscle and brain of shallow-living (*Scorpaena guttata*) and deep-living (*Sebastolous alascanus*) scorpaenid fishes. *J. Exp. Biol.*, 181: 213-232.
- Young, I.S., Torney, J.J. y Trimble, E.R. 1992. The effect of ascorbate supplementation on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. *Free Radical Bio. Med.*, 13: 41-46.
- Yousef, M.I., Awad, T.I., Elhag, F.A. y Khaled, F.A. 2007. Study of the protective effect of ascorbic acid against the toxicity of stannous chloride on oxidative damage, antioxidant enzymes and biochemical parameters in rabbits. *Toxicology*, 235: 194-202.
- Zammit, V.A. y Newsholme, E.A. 1979. Activities of enzymes of fat and ketone-body metabolism and effects of starvation on blood concentrations of glucose and fat fuels in teleost and elasmobranch fish. *Biochem. J.*, 184: 313-322.
- Zhu, X., Cui, Y., Ali, M. y Wootton, R.J. 2001. Comparison of compensatory growth responses of juvenile three-spined stickleback and minnow following similar food deprivation protocols. *J. Fish Biol.*, 58: 1149-1165.
- Zhu, X., Wu, L., Cui, Y., Yang, Y. y Wootton, R.J. 2003. Compensatory growth response in three-spined stickleback in relation to feed-deprivation protocols. *J. Fish Biol.*, 62: 195-205.



## VII- ANEXOS





# 1. ANEXO I: MÉTODOS ANALÍTICOS

## ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN

Los análisis de composición de las materias primas, dietas, heces y animales se realizaron de acuerdo con los métodos establecidos por la AOAC (2000).

- Humedad: El contenido en agua de las muestras fue determinado por diferencia de peso antes y después de desecación en estufa a 105 °C hasta peso constante.
- Cenizas: Las muestras fueron sometidas a incineración en horno mufla a 500 °C durante 16 horas. El contenido en minerales fue dado por la diferencia de peso de las muestras sin incinerar e incineradas.
- Lípidos: La grasa contenida en las muestras se determinó por el método Soxhlet. Para ello, las muestras fueron pesadas y mezcladas con sulfato sódico anhidro ( $\text{SO}_4\text{Na}_2$ ) a fin de desecarlas y facilitar la extracción de los lípidos. Tras colocarlas en cartuchos de papel de filtro fueron lavadas continuamente con éter dietílico durante el tiempo suficiente para obtener la totalidad de la fracción lipídica (mínimo 3 horas). La grasa extraída fue recogida en matraces de forma que tras la completa evaporación del éter se calculó el contenido en lípidos por diferencia de peso con el matraz vacío.
- Proteína: El análisis de la fracción proteica se realizó según el método Kjeldahl mediante digestión ácida de las muestras con ácido sulfúrico al 96% utilizando como catalizador una mezcla de sulfato de cobre, sulfato potásico y selenio, en proporciones 100:6:1. Las muestras digeridas fueron llevadas a un volumen final de 100 ml. De éstos, se tomó una alícuota que, fue destilada junto con hidróxido sódico al 40%. El amoniaco generado fue recogido en un matraz que contenía indicador Büchi compuesto por rojo de metilo, verde de bromocresol y ácido bórico. Finalmente el destilado fue valorado con ácido clorhídrico 0.01 N. Como factor de conversión del nitrógeno a proteína se empleó el valor 6.25.

- MELN: La materia extractiva libre de nitrógeno fue calculada por diferencia a partir de los valores obtenidos para las cenizas, lípidos y proteína según la siguiente expresión:

$$\% \text{ MELN} = 100 - (\% \text{ Cenizas} + \% \text{ Lípidos} + \% \text{ Proteína})$$

## DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN CROMO

El contenido en cromo de las muestras de dietas y heces fue determinado por espectrofotometría de absorción atómica (espectrofotómetro Pye Unicam SP-1900). La solución sometida a análisis fue, en el caso de las dietas, una alícuota de la muestra digerida y enrasada a 100 ml. Para las heces, fue necesaria una dilución en proporción 1:2 con agua destilada de la muestra digerida y enrasada a 100 ml.

## PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

### Hematocrito

Para el cálculo del hematocrito se centrifugó la sangre muestreada, usando microcapilares heparinizados, a 1500 g durante 10 minutos (Blaxhall y Daisley, 1973). Una vez sedimentados los elementos formes, se midieron las longitudes correspondientes a la sangre total (L1) y a la fracción aislada de glóbulos rojos (L2), de forma que el hematocrito se determinó por la siguiente expresión:

$$\text{Hcto (\%)} = \frac{L2}{L1} \times 100$$

## Hemoglobina

La concentración de hemoglobina fue determinada mediante el método colorimétrico de la cianmetahemoglobina (Van Kampen y Zijlstra, 1961), cuyo principio se basa en la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina por la acción de ferrocianuro, la cual es convertida mediante cianuro a cianmetahemoglobina. Para este análisis se empleó reactivo comercial Drabkin (Dipal, 28.105). La absorbancia de la muestra fue medida a una longitud de onda de 540 nm. Para los cálculos se empleó la siguiente conversión:

$$\text{Hb (g dl}^{-1}\text{)} = 36.77 \times \text{Abs. 540 nm}$$

## DETERMINACIÓN DE METABOLITOS PLASMÁTICOS

### Glucosa

La concentración de glucosa en plasma se determinó mediante kit comercial (Dipal, 28.160) basado en el método enzimático-colorimétrico GOD-POD (Trinder, 1969), cuyo principio consiste en la oxidación de la glucosa existente en una muestra en presencia de glucosa oxidasa (GOD), dando lugar a la formación de ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Este peróxido de hidrógeno reacciona a su vez con aceptor cromogénico de oxígeno (fenol-4aminofenazona) en presencia de peroxidasa (POD), generando un compuesto rosado de quinona. La absorbancia de la muestra fue medida a una longitud de onda de 505 nm frente a blanco de reactivo. Para el cálculo de la concentración de glucosa se utilizó un patrón de glucosa (100 mg dl<sup>-1</sup>). Los resultados se expresaron en mg de glucosa dl de plasma<sup>-1</sup>.



## Colesterol Total

Para determinar el colesterol total en plasma se utilizó un kit comercial (Dipal, 28.601), basado en el método enzimático-colorimétrico CHOD-POD (Meiattini et al., 1978), cuyo principio consiste en la escisión de los ésteres de colesterol presentes en la muestra, en presencia del enzima colesterol esterasa, dando lugar a la formación de ácidos grasos y colesterol. A continuación, la colesterol oxidasa (CHOD) transforma el colesterol en 4-colestenona, con producción de peróxido de hidrógeno que a su vez reacciona con un aceptor cromogénico de oxígeno (fenol-4aminofenazona) en presencia de peroxidasa (POD) generando un compuesto rosado de quinona. La absorbancia de la muestra fue medida a una longitud de onda de 505 nm frente a blanco de reactivo. Para el cálculo de la concentración de colesterol total se utilizó un patrón de colesterol (200 mg dl<sup>-1</sup>). Los resultados se expresaron en mg de colesterol total dl de plasma<sup>-1</sup>.

## Colesterol LDL

La concentración de colesterol LDL en plasma se determinó usando un kit comercial (Dipal, 28.610) basado en el método enzimático-colorimétrico directo (Okada et al., 1998) sin necesidad de un pretratamiento de la muestra. La determinación consta de dos pasos: en el primero se eliminan quilomicrones, VLDL y HDL en condiciones específicas para estas lipoproteínas en presencia de colesterol esterasa formando colesterol. Este colesterol es oxidado por el enzima colesterol oxidasa a colesteno y peróxido de hidrógeno, que es degradado por la catalasa. En el segundo paso valoramos específicamente el LDL que permanece en solución con el mismo procedimiento seguido para el colesterol total, generando un compuesto rosado de quinona. La absorbancia final de la muestra resultante fue medida a una longitud de onda de 600 nm. Para el cálculo de la concentración se empleó un patrón de colesterol LDL (95 mg dl<sup>-1</sup>). Los resultados se expresaron en mg de colesterol LDL dl de plasma<sup>-1</sup>.

## Colesterol HDL

La concentración de colesterol HDL en plasma se determinó usando un kit comercial (Dipal, 28.628) basado en un método enzimático-colorimétrico directo (Naito, 1989), sin necesidad de un pretratamiento o centrifugado de la muestra. El método se basa en las propiedades de un detergente que solubiliza sólo la fracción HDL, de forma que éste se libera reaccionando con la colesterol esterasa, la colesterol oxidasa y los cromógenos tal y como se ha descrito para el colesterol total. Las lipoproteínas LDL, VLDL y quilomicrones son inhibidas debido a la adsorción del detergente en sus superficies haciéndolas resistentes al enzima. Las absorbancias de la muestra resultantes de cada una de las dos reacciones implicadas en el proceso de medida fueron determinadas a una longitud de onda de 600 nm. La diferencia de absorbancias entre las reacciones fue empleada para el cálculo de las concentraciones, junto con un patrón de colesterol HDL (36 mg dl<sup>-1</sup>). Los resultados se expresaron en mg de colesterol HDL dl de plasma<sup>-1</sup>.

## Triglicéridos

Para determinar el contenido de triglicéridos en plasma se utilizó un kit comercial (Dipal, 28.761), basado en el método enzimático-colorimétrico GPO-POD (Buccolo y David, 1973), donde los triglicéridos incubados con lipoproteinlipasa liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerol fosfato oxidasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y ADP. El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato y peróxido de hidrógeno por GPO. Al final el peróxido de hidrógeno reacciona con 4-aminofenazona y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD), generando quinona de color rosado. La absorbancia de la muestra fue medida a una longitud de onda de 505 nm frente a blanco de reactivo. Para el cálculo de la concentración de triglicéridos se utilizó un patrón de triglicéridos (200 mg dl<sup>-1</sup>). Los resultados se expresaron en mg de triglicéridos dl de plasma<sup>-1</sup>.

## Lípidos Totales

La concentración de lípidos totales en plasma se determinó mediante un kit comercial (Dipal, 28.215), basado en el método colorimétrico de la sulfa-fosfo-vainillina (Cottet y Etienne, 1965), cuyo principio consiste en el tratamiento de la muestra con ácido sulfúrico a 100 °C de forma que los lípidos insaturados presentes en la muestra reaccionan con él formando iones carbono. En una segunda fase, éstos, en presencia de fosfovainillina, generan una coloración rosada valorada a una longitud de onda de 520 nm frente a blanco de reactivo. Para el cálculo de la concentración de lípidos totales se utilizó un patrón de lípidos totales (750 mg dl<sup>-1</sup>). Los resultados se expresaron en mg de lípidos totales dl de plasma<sup>-1</sup>.

## Proteínas solubles

Las proteínas solubles presentes en el plasma se determinaron por el método Bradford (1976) según se describe más abajo. Los resultados se expresaron en mg de proteína dl de plasma<sup>-1</sup>.

## Aminoácidos Totales

### *Fundamento*

Para la determinación de aminoácidos totales en plasma se empleó el método colorimétrico de la ninhidrina descrito por Spies (1957). Se basa en la producción de color azul por la reacción de la ninhidrina con los grupos amino libres presentes en la muestra.

### *Reactivos*

- Tampón citrato 0.2 M pH 5.0.
- Solución de ninhidrina: mezcla al 50% de siguientes soluciones:
  - Sol 1 (extemporánea): Cl<sub>2</sub>Sn·2H<sub>2</sub>O 7.1 mM en tampón citrato 0.2 M pH 5.0.
  - Sol 2 (protegida de la luz): Ninhidrina 225 mM en etilenglicol monoetil.
- Disolvente: Solución de n-propanol con agua destilada al 50%.
- Solución de leucina 8 mM.

*Procedimiento*

- Preparación de la curva patrón:

<b>Conc. leucina (<math>\mu\text{g ml}^{-1}</math>)</b>	<b>Sol. leucina (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>H<sub>2</sub>O destilada (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>Vol. final (<math>\mu\text{l}</math>)</b>
0	0.0	50.0	50
50	2.4	47.6	50
100	4.8	45.2	50
200	9.5	40.5	50
300	14.3	35.7	50
400	19.0	31.0	50
600	28.6	21.4	50
800	38.1	11.9	50

- Preparación de las muestras:

En tubos de ensayo se añadieron 50 $\mu\text{l}$  de muestra plasmática diluída 1:9 con agua destilada.

En todos los tubos (muestras y curva patrón) se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de la solución de ninhidrina. Fueron agitados e incubados en baño a 100 °C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se les añadió 2.5 ml del disolvente. Se agitaron de nuevo y se dejaron reposando durante 15 minutos. Finalmente, la lectura de la absorbancia de las muestras y la curva patrón se realizó a una longitud de onda de 570 nm frente a blanco de reactivo (punto 0 de la curva patrón).

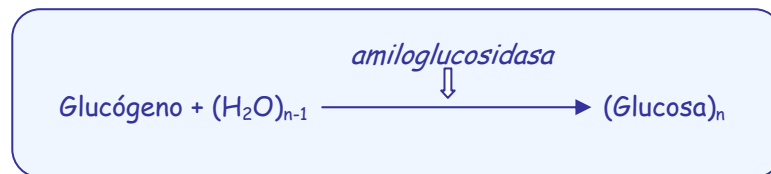
*Cálculos*

La concentración de aminoácidos de las muestras se obtuvo a partir de la recta obtenida por la representación de la densidad óptica de las distintas concentraciones de la curva patrón, y considerando la dilución (1:9) inicial de las muestras. Los resultados se expresaron en mg aminoácidos totales dl de plasma<sup>-1</sup>.

## DETERMINACIÓN DE GLUCÓGENO TISULAR

### Fundamento

La técnica empleada para la determinación de la cantidad de glucógeno hepático y muscular fue una modificación a la original propuesta por Roehrig y Allred (1974). El fundamento de la misma se encuentra en la hidrólisis enzimática producida con amiloglucosidasa sobre el glucógeno de la muestra, actuando a nivel de las uniones  $\alpha$ -D (1 $\rightarrow$  4) y  $\alpha$ -D (1 $\rightarrow$  6), generando como producto de la reacción glucosa libre. La degradación total del glucógeno nos permite su valoración midiendo directamente la cantidad de glucosa final generada en el proceso.



### Reactivos

- Tampón acetato 0.05 M pH 4.5.
- Amiloglucosidasa: 35 UI/ml tampón acetato 0.05 M pH 4.5.
- Test comercial para determinación de glucosa (Dipal, 28.160).
- Patrón de glucosa (concentración original 100 mg dl<sup>-1</sup>).

### Procedimiento

Las cantidades de extracto y reactivos a emplear variaron en función del tipo de tejido a analizar (hígado ó músculo blanco), por lo que se describen individualmente dentro de cada fase del procedimiento:

### 1. Hidrólisis del glucógeno

En tubos de ensayo se añade lo siguiente:

▪ Hígado:

50 µl extracto conc. + 850 µl agua destilada + 100 µl amiloglucosidasa

Para el patrón de glucosa necesario para los cálculos posteriores en este tejido:

500 µl estándar glucosa + 400 µl agua destilada + 100 µl amiloglucosidasa

▪ Músculo blanco:

200 µl extracto conc. + 700 µl agua destilada + 100 µl amiloglucosidasa

Para el patrón de glucosa necesario para los cálculos posteriores en este tejido:

50 µl estándar glucosa + 850 µl agua destilada + 100 µl amiloglucosidasa

Tras la agitación de los tubos, fueron introducidos en un baño a 55 °C durante 10 minutos. Pasado este tiempo se dejaron enfriar y se centrifugaron a 1000 g durante 15 minutos.

### 2. Determinación del contenido en glucosa

Con el sobrenadante obtenido del paso anterior se determinó el contenido en glucosa mediante el método enzimático-colorimétrico GOD-POD descrito anteriormente. Según el tejido, las cantidades empleadas para el análisis fueron las siguientes:

▪ Hígado:

10 µl sobrenadante de los extractos + 1000 µl test glucosa

10 µl sobrenadante del estándar de glucosa + 1000 µl test glucosa

▪ Músculo blanco:

100 µl sobrenadante de los extractos + 1000 µl test glucosa

50 µl sobrenadante del estándar de glucosa + 1000 µl test glucosa

## Cálculos

La concentración de glucógeno tisular fue calculada a partir de los resultados del análisis de glucosa, considerando las concentraciones finales de los patrones empleados en cada caso ( $0.5 \text{ mg ml}^{-1}$  para el hígado y  $0.05 \text{ mg ml}^{-1}$  para el músculo blanco) y los volúmenes de extracto de los distintos tejidos añadidos al inicio del proceso. Los resultados fueron expresados en  $\text{mg glucosa g de tejido}^{-1}$ .

## ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LÍPIDOS TISULARES

### Fundamento

En el análisis del contenido lipídico del hígado y músculo blanco se empleó el método descrito por Folch et al. (1957), según el cual una fracción lipídica pura es obtenida mediante homogeneización y sucesivos “lavados” de un tejido, usando para ello una mezcla extractora compuesta por disolventes.

### Reactivos

- Cloroformo.
- Metanol.
- Ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N.

### Procedimiento

Aproximadamente 400 mg de tejido fueron homogeneizados en un potter de vidrio con 4 ml de una mezcla extractora compuesta por cloroformo, metanol y HCl 0.1 N en proporciones 200:100:1, respectivamente. El homogenado resultante fue trasvasado a un tubo de ensayo, añadiendo además 3 ml de HCl 0.1 N. El contenido del tubo fue agitado vigorosamente y posteriormente centrifugado durante 10 minutos a 700 g.

Tras la centrifugación, se obtuvieron tres fracciones claramente definidas en el tubo. Una fase superior acuosa que fue eliminada. Una fase inferior clorofórmica conteniendo el extracto lipídico, que fue recuperada cuidadosamente mediante ayuda de pipetas pasteur y depositada en un tubo de ensayo previamente pesado. Por último, una fase intermedia compuesta por restos del tejido, la cual fue sometida a un proceso de “lavado” añadiendo 2 ml de mezcla extractora y 1 ml de HCl 0.1 N, siendo agitada y centrifugada de nuevo en las mismas condiciones anteriormente descritas. Este paso fue repetido dos veces más para asegurar la completa extracción de los lípidos tisulares. Todas las fases clorofórmicas recuperadas de los sucesivos centrifugados fueron depositadas en el mismo tubo de ensayo, para ser posteriormente desecadas a 40 °C bajo una corriente de nitrógeno.

## Cálculos

El contenido en lípidos de un tejido fue determinado por diferencia de peso del tubo de ensayo antes y después de contener la fracción lipídica. Los resultados fueron expresados en mg de lípidos 100 mg de tejido<sup>-1</sup>.

## DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES

### Fundamento

La concentración de proteínas solubles de una muestra se determinó según la técnica de Bradford (1976), basada en la unión directa del colorante azul de Coomassie a la estructura terciaria de las proteínas. En función de la cantidad de proteína se producirá un cambio de color de marrón a azul más o menos intenso. La sensibilidad es de 1 µg.

### Reactivos

- Reactivo de Bradford comercial Kit Bio-Rad (nº cat. 500-0006).
- Solución de albúmina bovina al 0.06%.



## Procedimiento

- Preparación de la curva patrón:

Conc. albúmina ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Sol. albúmina ( $\mu\text{l}$ )	H <sub>2</sub> O destilada ( $\mu\text{l}$ )	Kit Bio-Rad ( $\mu\text{l}$ )	Vol. final ( $\mu\text{l}$ )
0	0	800	200	1000
3	5	795	200	1000
6	10	790	200	1000
12	20	780	200	1000
24	40	760	200	1000
48	80	720	200	1000

- Preparación de las muestras:

En tubos de ensayo se añadieron 5  $\mu\text{l}$  de extracto diluido 1:4 de hígado, músculo blanco o corazón, o bien 5  $\mu\text{l}$  dilución 1:19 de plasma. A continuación, se añadió la cantidad de agua destilada necesaria para ajustar el volumen a 800  $\mu\text{l}$  y finalmente se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de reactivo de Bradford.

Tanto los tubos de ensayo de la curva patrón como los de las muestras fueron agitados para conseguir una buena mezcla de los componentes. Tras esto, se dejaron reposando 5 minutos. Finalmente se procedió a la lectura a una longitud de onda de 595 nm, frente a blanco de reactivo (punto 0 de la curva patrón).

## Cálculos

A partir de la recta obtenida por la representación de la densidad óptica de las distintas concentraciones de la curva patrón, y por interpolación de los valores de densidad óptica de las muestras, se calcula la concentración de proteína soluble contenida en cada una de ellas, considerando la cantidad de muestra que fue añadida, así como la dilución realizada. Los resultados se expresaron en mg de proteína ml de extracto<sup>-1</sup>.

---

## DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO

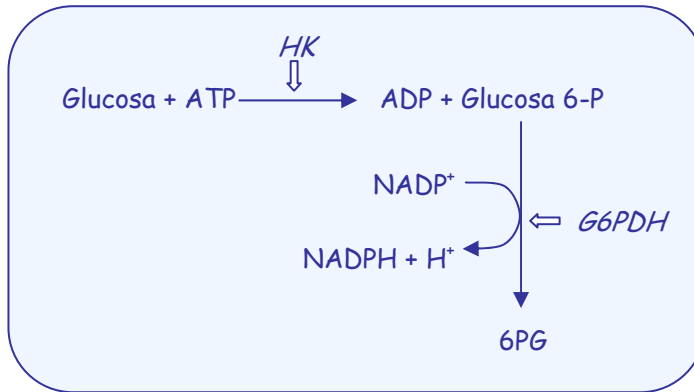
La determinación de la actividad de todos los enzimas analizados implicados en el metabolismo intermediario se realizó mediante lectura de cambios en la absorbancia de una determinada “mezcla de reacción”, según el enzima a analizar. Para ello se usó un espectrofotómetro lector de microplacas PowerWave<sub>x</sub>, de Bio-Tek Instruments (Inc., USA). Las condiciones de temperatura (25 °C) y volumen final de la “mezcla de reacción” (200 µl) fueron las mismas en todas los enzimas analizados. La concentración óptima de sustrato, así como la dilución más apropiada del extracto de un determinado tejido, fueron establecidas en base a análisis preliminares. La reacción enzimática siempre fue iniciada por adición del extracto de muestra. Todas las soluciones fueron elaboradas con agua destilada, salvo en los casos en los que se especificó lo contrario.

La descripción completa de la metodología para la determinación de la actividad de estos enzimas se encuentra recogida a continuación.

## Hexoquinasa (HK, E.C. 2.7.1.1)

### Fundamento

La determinación de la actividad HK fue realizada según el método descrito por Vijayan et al. (1990), basado en la medida espectrofotométrica de la reducción de  $\text{NADP}^+$  según las reacciones descritas a continuación:



### Reactivos

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4.
- Solución de  $\text{MgCl}_2$  100 mM.
- Solución extemporánea de ATP 50 mM.
- Solución extemporánea de NADP 8 mM.
- Glucosa 6-P deshidrogenasa comercial (G6PDH).
- Solución extemporánea de glucosa 20 mM.

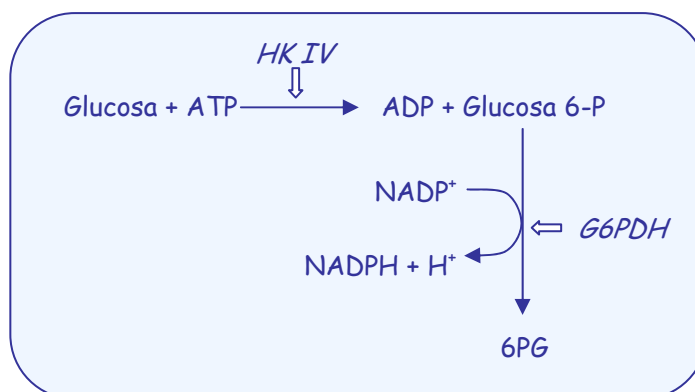
### Procedimiento

$\lambda = 340 \text{ nm}$	Concentración en pocillo	Volumen ( $\mu\text{l}$ ) de 200 $\mu\text{l}$
Tampón Imidazol	50 mM	140
$\text{MgCl}_2$	5 mM	10
ATP	2.5 mM	10
NADP	0.4 mM	10
G6PDH	2 UI $\text{ml}^{-1}$	0.57
Glucosa	1 mM	10
Extracto		20

## Glucocuinasa (HK IV; E.C. 2.7.1.2)

### Fundamento

La determinación de la actividad HK IV fue realizada según el método descrito por Vijayan et al. (1990), basado en la medida espectrofotométrica de la reducción de  $\text{NADP}^+$  según las reacciones descritas a continuación:



### Reactivos

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4.
- Solución de  $\text{MgCl}_2$  100 mM.
- Solución extemporánea de ATP 50 mM.
- Solución extemporánea de NADP 8 mM.
- Glucosa 6-P deshidrogenasa comercial (G6PDH).
- Solución extemporánea de glucosa 2 M.

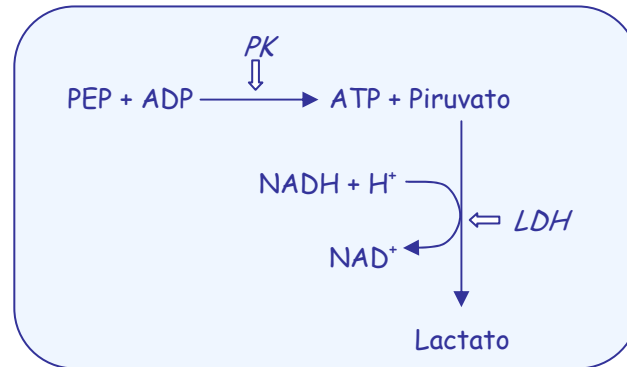
### Procedimiento

$\lambda = 340 \text{ nm}$	Concentración en pocillo	Volumen ( $\mu\text{l}$ ) de 200 $\mu\text{l}$
Tampón Imidazol	50 mM	140
$\text{MgCl}_2$	5 mM	10
ATP	2.5 mM	10
NADP	0.4 mM	10
G6PDH	2 UI $\text{ml}^{-1}$	0.57
Glucosa	100 mM	10
Extracto		20

## Piruvato quinasa (PK, E.C. 2.7.1.40)

### Fundamento

La actividad PK se determinó siguiendo el método descrito por Morales et al. (1990), basado en la medida de la disminución de densidad óptica producida por la oxidación de NADH según las siguientes reacciones:



### Reactivos

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4.
- Solución de  $\text{MgCl}_2$  100 mM.
- Solución de ClK 2 M.
- Solución extemporánea de NADH 3 mM.
- Solución extemporánea de ADP 20 mM.
- Lactato deshidrogenasa comercial (LDH).
- Solución extemporánea de fosfoenol piruvato (PEP) 40 mM.

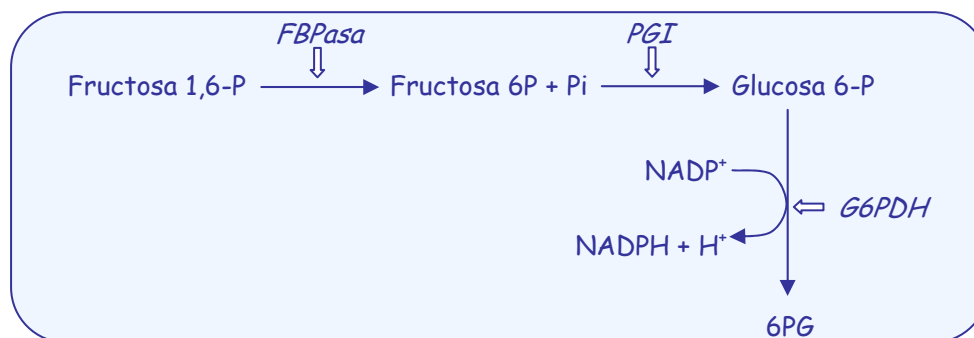
### Procedimiento

$\lambda = 340 \text{ nm}$	Concentración en pocillo	Volumen ( $\mu\text{l}$ ) de 200 $\mu\text{l}$
Tampón Imidazol	50 mM	140
$\text{MgCl}_2$	5 mM	10
ClK	100 mM	10
NADH	0.15 mM	10
ADP	1 mM	10
LDH	2 UI $\text{ml}^{-1}$	0.15
PEP	2 mM	10
Extracto		10

## Fructosa 1-6 bifosfatasa (FBPasa, E.C. 3.1.3.11)

*Fundamento*

Se empleó el método descrito por Morales et al. (1990), basado en la medida espectrofotométrica de la reducción de  $\text{NADP}^+$ .

*Reactivos*

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4.
- Solución de  $\text{MgCl}_2$  100 mM.
- Solución extemporánea de NADP 10 mM.
- Solución extemporánea de  $\beta$ - mercaptoetanol 240 mM.
- Fosfoglucosa isomerasa comercial (PGI).
- Glucosa 6-P deshidrogenasa (G6PDH).
- Solución extemporánea de fructosa 1,6-bisfosfato (FBP) 5 mM.

*Procedimiento*

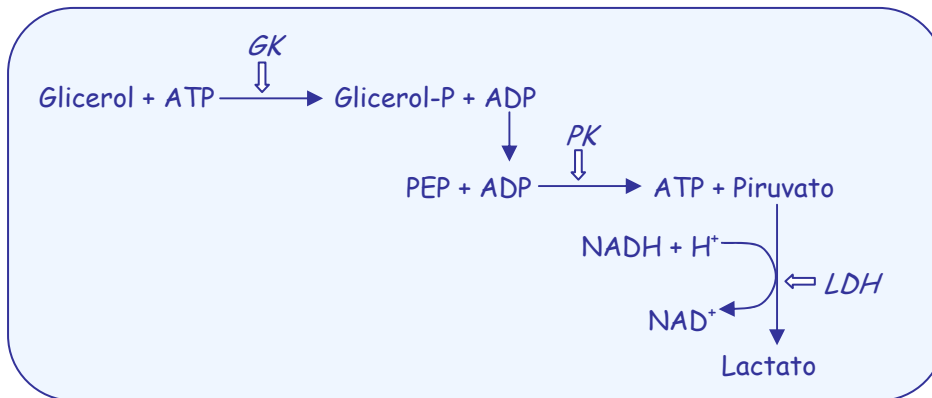
$\lambda = 340 \text{ nm}$	Concentración en pocillo	Volumen ( $\mu\text{l}$ ) de 200 $\mu\text{l}$
Tampón Imidazol	42.84 mM	120
$\text{MgCl}_2$	5 mM	10
NADP	0.5 mM	10
$\beta$ - mercaptoetanol	12 mM	10
PGI	2 UI $\text{ml}^{-1}$	0.57 $\mu\text{l}$
G6PDH	2 UI $\text{ml}^{-1}$	0.57 $\mu\text{l}$
FBP	0.5 mM	20
Agua destilada		20
Extracto		10

Nota: en el caso del corazón, la concentración de FBP en cubeta fue de 1 mM.

## Glicerol quinasa (GK, E.C. 2.7.1.30)

### Fundamento

La determinación de la actividad GK fue realizada según el método descrito por Vijayan et al. (1990), basado en la medida de la disminución de densidad óptica producida por la oxidación de NADH según las siguientes reacciones:



### Reactivos

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4.
- Solución de MgCl<sub>2</sub> 100 mM.
- Solución extemporánea de NADH 15 mM.
- Solución extemporánea de ATP 100 mM.
- Solución extemporánea de fosfoenol piruvato (PEP) 200 mM.
- Piruvato quinasa (PK) y lactato deshidrogenasa comercial (LDH).
- Solución extemporánea de glicerol 50 mM.

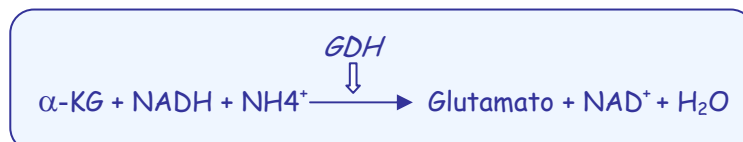
### Procedimiento

$\lambda = 340 \text{ nm}$	Concentración en pocillo	Volumen ( $\mu\text{l}$ ) de 200 $\mu\text{l}$
Tampón Imidazol	50 mM	140
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	10
NADH	0.75 mM	10
ATP	5 mM	10
PEP	10 mM	10
PK	4 UI ml <sup>-1</sup>	0.8
LDH	4 UI ml <sup>-1</sup>	0.3
Glicerol	2.5 mM	10
Extracto		10

## Glutamato deshidrogenasa (GDH, E.C. 1.4.1.2)

### Fundamento

Para la determinación de la actividad GDH se empleó el método descrito por Morales et al. (1990), basado en la medida de la disminución de densidad óptica producida por la oxidación de NADH según las siguientes reacciones:



### Reactivos

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 8.
- Solución de acetato amónico 3.3 M.
- Solución extemporánea de NADH 2.9 mM y ADP 14.3 mM.
- Lactato deshidrogenasa comercial (LDH).
- Solución extemporánea de  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG) 200 mM.

### Procedimiento

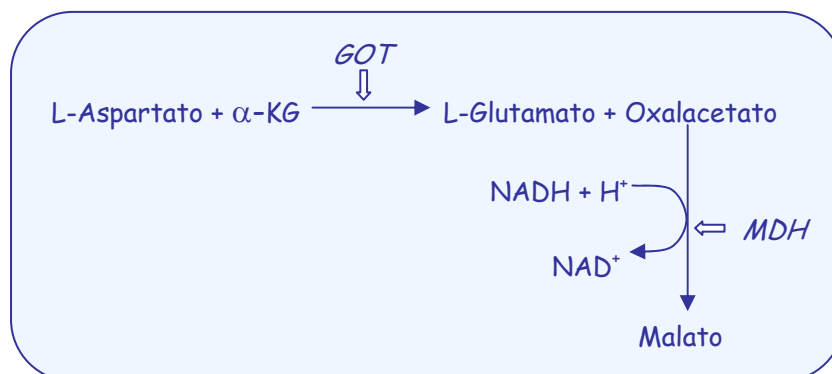
$\lambda = 340 \text{ nm}$	Concentración en pocillo	Volumen ( $\mu\text{l}$ ) de 200 $\mu\text{l}$
Tampón Imidazol	50 mM	140
Acetato amónico	100 mM	6
NADH/ADP	0.2 mM / 1 mM	14
LDH	2 UI $\text{ml}^{-1}$	0.15
$\alpha$ -KG	10 mM	10
Extracto		30



## Glutamato oxalacetato transaminasa (GOT, E.C. 2.6.1.1)

### Fundamento

La actividad GOT se determinó siguiendo el método descrito por Singer et al. (1990), basado en la medida de la disminución de densidad óptica producida por la oxidación de NADH según las siguientes reacciones:



### Reactivos

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4.
- Solución extemporánea de  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG) 200 mM.
- Solución extemporánea de NADH 6 mM.
- Solución extemporánea de piridoxal fosfato 1 mM.
- Malato deshidrogenasa (MDH).
- Solución extemporánea de L-Aspartato 500 mM.

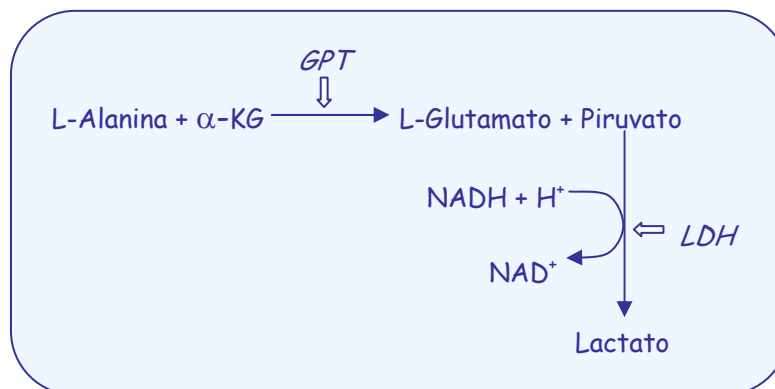
### Procedimiento

$\lambda = 340 \text{ nm}$	Concentración en pocillo	Volumen ( $\mu\text{l}$ ) de 200 $\mu\text{l}$
Tampón Imidazol	50 mM	140
$\alpha$ -KG	10 mM	10
NADH	0.3 mM	10
Piridoxal fosfato	0.05 mM	10
MDH	3 UI $\text{ml}^{-1}$	0.10
L-Aspartato	25 mM	10
Agua destilada		10
Extracto		10

## Glutamato piruvato transaminasa (GPT, E.C. 2.6.1.2)

### Fundamento

La actividad GPT se determinó siguiendo el método descrito por Morales et al. (1990), basado en la medida de la disminución de densidad óptica producida por la oxidación de NADH según las siguientes reacciones:



### Reactivos

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4.
- Solución extemporánea de  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG) 200 mM.
- Solución extemporánea de NADH 4 mM.
- Solución extemporánea de piridoxal fosfato 1 mM.
- Lactato deshidrogenasa comercial (LDH).
- Solución extemporánea de L-Alanina 250 mM.

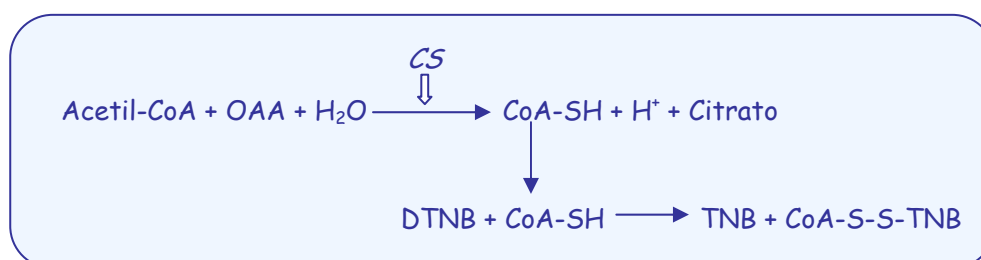
### Procedimiento

$\lambda = 340 \text{ nm}$	Concentración en pocillo	Volumen ( $\mu\text{l}$ ) de 200 $\mu\text{l}$
Tampón Imidazol	50 mM	140
$\alpha$ -KG	10 mM	10
NADH	0.2 mM	10
Piridoxal fosfato	0.05 mM	10
LDH	2 UI ml <sup>-1</sup>	0.15
L-Alanina	25 mM	20
Extracto		10

## Citrato sintasa (CS, E.C. 4.1.3.7)

### Fundamento

Para la determinación de la actividad CS se empleó el método descrito por Thibault et al. (1997), basado en la medida espectrofotométrica de la producción de 5-tio-2-ácido nitrobenzóico (TNB) a partir del 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) según las reacciones descritas a continuación:



### Reactivos

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 8.
- Solución extemporánea DTNB 2 mM.
- Solución extemporánea de acetil-CoA 4 mM.
- Solución extemporánea de ácido oxalacético (OAA) 4 mM.

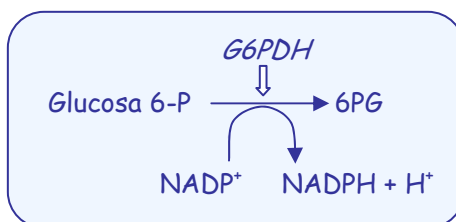
### Procedimiento

$\lambda = 412 \text{ nm}$	Concentración en pocillo	Volumen ( $\mu\text{l}$ ) de 200 $\mu\text{l}$
Tampón Imidazol	50 mM	140
DTNB	0.1 mM	10
Acetil-CoA	0.2 mM	10
OAA	0.2 mM	10
Agua destilada		20
Extracto		10

## Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, E.C. 1.1.1.49)

### Fundamento

La actividad G6PDH se determinó siguiendo el método descrito por Morales et al. (1990), basado en la medida espectrofotométrica de la reducción de  $\text{NADP}^+$  según las reacciones descritas a continuación:



### Reactivos

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4.
- Solución de  $\text{MgCl}_2$  100 mM.
- Solución extemporánea de NADP 20 mM en  $\text{HCO}_3\text{Na}$  119 mM.
- Solución extemporánea de glucosa 6-P (G6P) 10 mM.

### Procedimiento

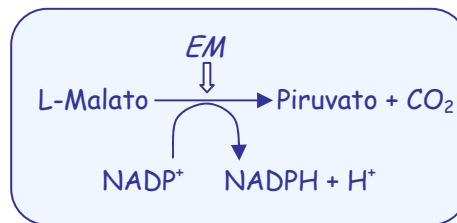
$\lambda = 340 \text{ nm}$	Concentración en pocillo	Volumen ( $\mu\text{l}$ ) de 200 $\mu\text{l}$
Tampón Imidazol	50 mM	140
$\text{MgCl}_2$	5 mM	10
NADP	2 mM	20
G6P	1 mM	20
Extracto		10

Nota: la solución de  $\text{HCO}_3\text{Na}$  119mM añadida junto al NADP tiene una concentración en el pocillo de 11.9 mM.

## Enzima málico (EM, E.C. 1.1.1.40)

### Fundamento

Para la determinación de la actividad EM se empleó el método descrito por Singer et al. (1990), basado en la medida espectrofotométrica de la reducción de  $\text{NADP}^+$  según las reacciones descritas a continuación:



### Reactivos

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4.
- Solución de  $\text{MgCl}_2$  100 mM.
- Solución extemporánea de NADP 8 mM.
- Solución extemporánea de L-Malato 40 mM.

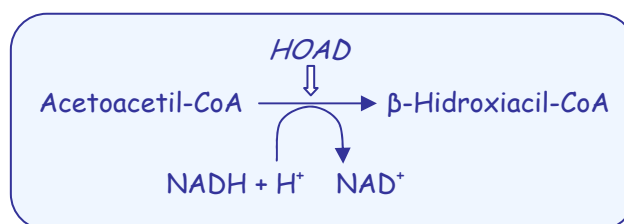
### Procedimiento

$\lambda = 340 \text{ nm}$	Concentración en pocillo	Volumen ( $\mu\text{l}$ ) de 200 $\mu\text{l}$
Tampón Imidazol	50 mM	140
$\text{MgCl}_2$	5 mM	10
NADP	0.4 mM	10
L-Malato	2 mM	10
Agua destilada		10
Extracto		20

## $\beta$ -Hidroxiacil CoA deshidrogenasa (HOAD, E.C. 1.1.1.35)

### Fundamento

La actividad HOAD se determinó siguiendo el método descrito por Singer et al. (1990), basado en la medida de la disminución de densidad óptica producida por la oxidación de NADH según las siguientes reacciones:



### Reactivos

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 8.
- Solución extemporánea de NADH 2 mM.
- Solución extemporánea de acetoacetil CoA 2 mM.

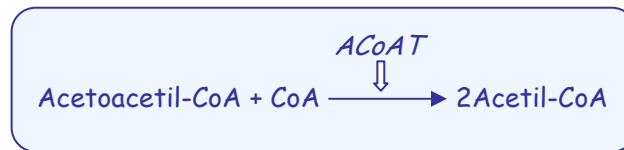
### Procedimiento

$\lambda = 340 \text{ nm}$	Concentración en pocillo	Volumen ( $\mu\text{l}$ ) de 200 $\mu\text{l}$
Tampón Imidazol	50 mM	140
NADH	0.1 mM	10
Acetoacetil CoA	0.1 mM	10
Agua destilada		30
Extracto		10

## Acetoacetyl-CoA tiolasa (ACoAT, E.C. 2.3.1.9)

### Fundamento

La actividad ACoAT se determinó siguiendo el método descrito por Singer et al. (1990), basado en la medida espectrofotométrica de la desaparición del acetoacetyl-CoA según la siguiente reacción:



### Reactivos

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 8.
- Solución de MgCl<sub>2</sub> 100 mM.
- Solución extemporánea de acetoacetyl CoA 2.8 mM.
- Solución extemporánea de CoA 4.8 mM.

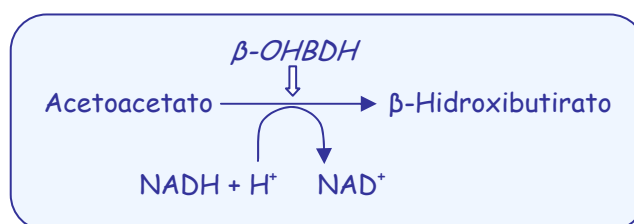
### Procedimiento

$\lambda = 313 \text{ nm}$	Concentración en pocillo	Volumen ( $\mu\text{l}$ ) de 200 $\mu\text{l}$
Tampón Imidazol	50 mM	140
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	10
Acetoacetyl CoA	0.14 mM	10
CoA	0.24 mM	10
Agua destilada		20
Extracto		10

## $\beta$ -Hidroxibutirato deshidrogenasa ( $\beta$ -OHBDH, E.C. 1.1.1.30)

### Fundamento

La actividad  $\beta$ -OHBDH se determinó siguiendo el método descrito por Singer et al. (1990), basado en la medida de la disminución de densidad óptica producida por la oxidación de NADH según las siguientes reacciones:



### Reactivos

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 8.
- Solución extemporánea de NADH 2 mM.
- Solución extemporánea de acetoacetato 40 mM.

### Procedimiento

$\lambda = 340 \text{ nm}$	Concentración en pocillo	Volumen ( $\mu\text{l}$ ) de 200 $\mu\text{l}$
Tampón Imidazol	50 mM	140
NADH	0.1 mM	10
Acetoacetato	2 mM	10
Agua destilada		30
Extracto		10

Nota: en el caso de la medición en hígado, la concentración de acetoacetato en cubeta fue de 4 mM.



## Cálculos de las actividades enzimáticas

La actividad específica del enzima fue expresada en mU mg de proteína<sup>-1</sup>. Una unidad de actividad fue definida como la cantidad de enzima requerido para transformar un μmol de sustrato por minuto bajo las condiciones analíticas descritas. Para el cálculo de dicha actividad se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{mU mg proteína}^{-1} = (\text{nmol min}^{-1}) \text{ mg proteína}^{-1} = \frac{(\Delta \text{DO} / \Delta t) \times V_t \times f}{\epsilon_x \times 10^3 \times 10^{-9} \times V_e \times d \times P}$$

Donde:

$\Delta \text{DO} / \Delta t$ : decremento o incremento de densidad óptica/minuto

$V_t$ : volumen total de reacción en ml

f: factor de corrección por dilución del extracto

$\epsilon_x$ : coeficiente extinción molar. Según la longitud de onda de lectura de cada enzima:

$$\epsilon_{340} = 6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1} \text{ (NADH, NADPH)}$$

$$\epsilon_{313} = 20,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1} \text{ (Acetoacetil-CoA)}$$

$$\epsilon_{412} = 13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1} \text{ (DTNB)}$$

$10^3$ : factor de conversión de litro a mililitro

$10^{-9}$ : factor de conversión de mol a nmol

$V_e$ : volumen del extracto añadido en ml

d: longitud de paso de luz. Para las microplacas el valor es 0.6 cm

P: mg de proteína por ml

## DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

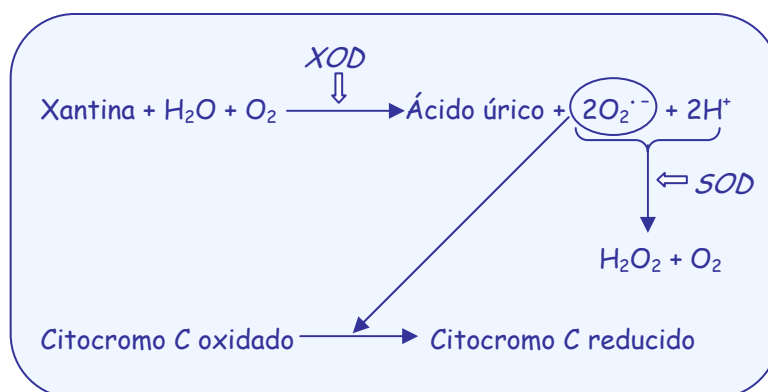
La determinación de la actividad de los enzimas antioxidantes analizados se realizó por el mismo sistema y condiciones descritas anteriormente para los enzimas implicados en el metabolismo intermediario, con la excepción de que la reacción enzimática fue iniciada por adición del sustrato en lugar del extracto de muestra.

### Superóxido dismutasa (SOD, E.C. 1.15.1.1)

#### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD SOD

##### *Fundamento*

La actividad superóxido dismutasa (SOD) se determinó según el método de McCord y Fridovich (1969), basado en el cambio de absorbancia a 550 nm de la mezcla reacción, provocado por la inhibición del proceso de reducción del citocromo C en presencia de SOD. La reducción del citocromo C es producida por acción de radicales superóxido, generados por el sistema enzimático xantina-xantina oxidasa (XOD). Sin embargo, la reacción de reducción del citocromo C se inhibe en presencia de SOD, ya que este enzima retira los radicales superóxido formando peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular.



### Reactivos

- Tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8.
- Solución de EDTA 0.1 mM.
- Solución extemporánea de xantina 0.6 mM (disuelta con calentamiento).
- Solución extemporánea de citocromo C 0.5 mM (proteger de la luz).
- Solución extemporánea de xantina oxidasa comercial (XOD) 1 UI ml<sup>-1</sup>.
- Ditionito sódico (hidrosulfito sódico).

Para realizar el análisis fue necesario preparar volumen suficiente de una “solución de reacción” compuesta por EDTA, xantina y citocromo C, diluidos en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8, en proporciones 30:6:1, respectivamente. Esta solución, protegida de la luz y mantenida a 25 °C, fue llevada a saturación de oxígeno mediante un aireador, durante 45 minutos, a fin de conseguir la total oxidación del citocromo C.

### Procedimiento

Se realizaron tres tipos de medidas:

- *Comprobación de la “solución de reacción”*: A 200 µl de la “solución de reacción” se le añadió una cantidad suficiente de hidrosulfito sódico para reducir la totalidad del citocromo C. La absorbancia de esta mezcla fue medida a 550 nm. Los valores obtenidos debían encontrarse entre 0.20 DO y 0.24 DO, siendo la longitud del paso de luz (d) de 1 cm.
- *Reacción control*: A 195 µl de la “solución de reacción” se le añadieron 5 µl de la solución de XOD, la cual inició la reacción de reducción del citocromo C que fue seguida mediante lectura del cambio de absorbancia a 550 nm. Para aceptar los resultados de la reacción control, los valores obtenidos debían encontrarse entre 0.023 y 0.028  $\Delta$ DO/minuto (d = 1 cm).
- *Reacción problema*: Se añadieron las siguientes cantidades de reactivos y extracto en cada pocillo de las microplacas, de forma que al igual que en la reacción control, la adición de la solución de XOD inició la reacción:

	$\lambda = 550 \text{ nm}$	Concentración en pocillo	Volumen ( $\mu\text{l}$ ) de 200 $\mu\text{l}$
"Solución de reacción"	EDTA	0.079 mM	150
	Xantina	0.090 mM	30
	Citocromo C	0.012 mM	5
	XOD	0.025 UI ml <sup>-1</sup>	5
	Extracto		10

Nota: la concentración total del tampón fosfato potásico pH 7.8 en el pocillo es de 47.5 mM, ya que fue añadido con las soluciones de EDTA, xantina, citocromo C y XOD preparadas disolviendo los reactivos en este tampón. Por otra parte, la cantidad de solución XOD empleada fue ajustada en función de los resultados de la reacción control en cada día de medida, el valor reflejado en la tabla es orientativo.

### Cálculos

Una unidad de actividad SOD fue definida como la cantidad de enzima requerido para inhibir la tasa de reducción de citocromo C un 50% bajo las condiciones analíticas descritas. La actividad específica fue expresada en U mg de proteína<sup>-1</sup> (U mg de hemoglobina<sup>-1</sup> en el caso del hemolisado). Para el cálculo de dicha actividad se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\Delta \text{DO} / \text{min} (\text{control}) - \Delta \text{DO} / \text{min} (\text{problema})}{\Delta \text{DO} / \text{min} (\text{control})} \times 100$$

$$\text{U SOD mg proteína}^{-1} = \frac{\% \text{ Inhibición}}{50\%} \times \frac{f}{V_e \times P}$$

Donde:

$\Delta \text{DO}/\text{min}$ : incremento de densidad óptica por minuto

f: factor de corrección por dilución del extracto

$V_e$ : volumen del extracto añadido en ml

P: mg de proteína por ml

## ANÁLISIS DE LOS ISOENZIMAS DE LA SOD

### *Fundamento*

La determinación de la existencia de los distintos isoenzimas de la SOD se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, utilizando el procedimiento vertical de geles en placa, según el método descrito por Ornstein (1964) y Davis (1964). Tras el proceso de desplazamiento electroforético, los geles fueron incubados y revelados siguiendo el protocolo descrito por Beauchamp y Fridovich (1971), basado en una primera incubación de los geles en riboflavina y TEMED, dando lugar a la liberación de radicales superóxido. Por otra parte, una segunda incubación en nitro blue tetrazolium (NBT) produce una tonalidad azul en el gel, en presencia de luz, por su reducción al reaccionar con los radicales superóxido generados en la primera incubación, excepto en determinadas bandas acromáticas, donde la actividad de los isoenzimas de la SOD, que quedaron retenidos en la matriz de acrilamida, se pone de manifiesto al evitar la reducción del NBT por la retirada de los radicales superóxido, generando peróxido de hidrógeno y oxígeno. Por otro lado, la incubación en CNK del gel nos permitió diferenciar entre los isoenzimas CuZn-SOD, que fueron inhibidos por el CNK y los Mn-SOD, que no se vieron afectados por este inhibidor (Fridovich, 1986).

### *Reactivos*

- Tampón de la muestra (extemporáneo): Solución de sacarosa al 40% (p/v) y azul de bromofenol 0.005% (p/v).
- Tampones Tris-HCl 0.375 M, pH 8.9 y Tris-HCl 0.062 M, pH 6.8.
- Acrilamida y Bis-acrilamida.
- Teramilen-etilen-diamina (TEMED).
- Solución extemporánea de persulfato amónico al 10% (p/v).
- Isobutanol.
- Tampón electrodos: Solución de glicina 38 mM y Tris-HCl 4.95 mM, pH 8.3.
- Solución de NBT 2.45 mM en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8.
- Solución de riboflavina 28  $\mu$ M y TEMED 0.4% (v/v) en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8.
- Solución de CNK 5 mM en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8.

### *Procedimiento*

Se utilizó un equipo Mini Protean II de Bio Rad, en el que se prepararon dos tipos de geles de 0.75 mm de espesor: separador y concentrador, dispuesto sobre el anterior.

- *Preparación del gel separador:* En tampón Tris-HCl 0.375 M, pH 8.9 se disolvieron acrilamida al 12% y bis-acrilamida al 0.45%. Para preparar dos geles separadores, se tomaron 10 ml de esta mezcla. Tras ser desgasificada durante 10 minutos y mantenida en hielo durante 5, se añadieron 200 µl de la solución persulfato amónico y 20 µl de TEMED, dando lugar a la gelificación.
- *Preparación del gel concentrador:* En tampón Tris-HCl 0.062 M, pH 6.8 se disolvieron acrilamida al 4% y bis-acrilamida al 0.21%. Para preparar dos geles concentradores, se tomaron 5 ml de esta mezcla. Tras ser desgasificada durante 10 minutos y mantenida en hielo durante 5 más, se añadieron 100 µl de la solución persulfato amónico y 10 µl de TEMED, dando lugar a la gelificación.

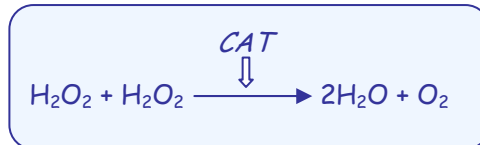
Una vez preparados los geles, se inyectó el extracto de la muestra, previamente mezclado con el tampón de la muestra, depositando en cada uno de los pocillos la misma cantidad de proteína. A continuación se preparó el soporte de geles y la cubeta, llenándola con el tampón de electrodos. Durante los primeros 10 minutos se empleó un amperaje constante de 20 mA. Transcurrido este tiempo el amperaje se subió a 40 mA, dando por finalizado el proceso cuando el frente se situó a 1 cm del extremo anódico (aproximadamente 40 minutos). Todo el proceso se llevó a cabo a 4 °C. Concluida la electroforesis, los geles fueron incubados a temperatura ambiente y en oscuridad en la solución de NBT, durante 20 minutos, tras los cuales se retiró esta solución, pasándose a incubar de nuevo en la solución de riboflavina y TEMED, durante 15 minutos más en las mismas condiciones. Transcurrido este tiempo, se retiró la solución anterior, y se enjuagaron los geles con tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8. Para la diferenciación entre los isoenzimas CuZn-SOD y Mn-SOD, los geles fueron incubados con la solución de CNK durante 30 minutos para conseguir la inhibición del isoenzima CuZn-SOD. Finalmente, los geles se iluminaron hasta conseguir un buen contraste entre las bandas acromáticas de SOD y el fondo azul, correspondiente al NBT reducido por los radicales superóxido.

## Catalasa (CAT, E.C. 1.11.1.6)

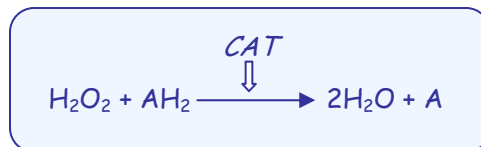
### Fundamento

La catalasa (CAT) puede ejercer una doble función:

- Actividad catalítica:



- Actividad peroxidásica: A pH alcalino, se produce la oxidación de compuestos reducidos (metanol, etanol, ácido fórmico y fenoles).



En nuestro caso, se determinó la actividad catalítica del enzima según el método descrito por Aebi (1984), basado en la lectura, a 240 nm, del decremento en la absorbancia producido por la disminución de la concentración del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

### Reactivos

- Solución extemporánea de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 10.5 mM en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.0.

*Procedimiento*

$\lambda = 240 \text{ nm}$	Concentración en pocillo	Volumen ( $\mu\text{l}$ ) de 200 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 mM	190
Extracto		10

Nota: la concentración del tampón fosfato potásico pH 7.0 añadido junto al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el pocillo es de 47.5 mM.

*Cálculos*

La actividad específica del enzima catalasa fue expresada en U/mg de proteína (U/mg de hemoglobina en el caso del hemolisado). Una unidad de actividad fue definida como la cantidad de enzima requerida para transformar un  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto bajo las condiciones analíticas descritas. Para el cálculo de dicha actividad se utilizó la siguiente fórmula:

$$U \text{ mg proteína}^{-1} = (\mu\text{mol min}^{-1}) \text{ mg proteína}^{-1} = \frac{(\Delta DO / \Delta t) \times V_t \times f}{\epsilon_{240} \times 10^3 \times 10^{-6} \times V_e \times d \times P}$$

Donde:

$\Delta DO/\Delta t$ : decremento de densidad óptica / minuto

$V_t$ : volumen total de reacción en ml

f: factor de corrección por dilución del extracto

$\epsilon_{240}$  = coeficiente de extinción molar del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $39.58 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ )

$10^3$ : factor de conversión de litro a mililitro

$10^{-6}$ : factor de conversión de mol a  $\mu\text{mol}$

$V_e$ : volumen del extracto añadido en ml

d: longitud de paso de luz. Para las microplacas el valor es 0.6 cm

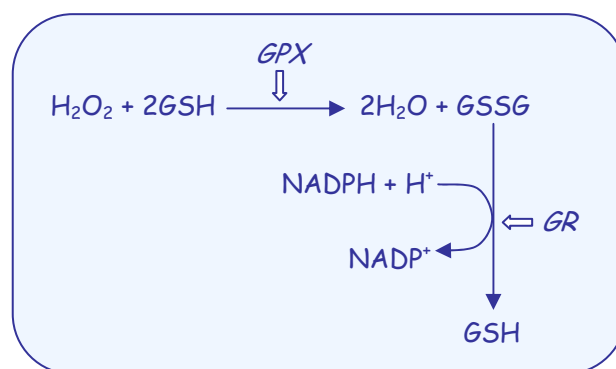
P: mg de proteína por ml



## Glutation peroxidasa (GPX, E.C. 1.11.1.9)

### Fundamento

Para determinar la actividad glutacion peroxidasa (GPX) se utilizó el método de Flohé y Günzler (1984), basado en una medida indirecta de la actividad mediante la lectura a 340 nm del decremento en la absorbancia producido por la oxidación del NADPH, utilizado para regenerar el glutacion reducido (GSH) a partir del glutacion oxidado (GSSG) obtenido por la acción de la glutacion peroxidasa, según la siguiente reacción:



### Reactivos

- Tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.1.
- Solución de azida sódica 15.5 mM (inhibe la actividad catalasa).
- Solución de EDTA 3.9 mM.
- Solución extemporánea de glutacion reducido (GSH) 25.8 mM.
- Solución extemporánea de NADPH 1.5 mM.
- Solución extemporánea de glutacion reductasa (GR) 9.7 UI ml<sup>-1</sup>.
- Solución extemporánea de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 1 mM.

Todos las soluciones fueron preparadas diluyendo los reactivos en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.1.

*Procedimiento*

$\lambda = 340 \text{ nm}$	<b>Concentración en pocillo</b>	<b>Volumen (<math>\mu\text{l}</math>) de 200 <math>\mu\text{l}</math></b>
Azida sódica	3.88 mM	50
EDTA	0.97 mM	50
GSH	3.87 mM	30
NADPH	0.22 mM	30
GR	0.97 UI ml <sup>-1</sup>	20
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.05 mM	10
Extracto		10

Nota: la concentración total del tampón fosfato potásico pH 7.1 en el pocillo es de 47.5 mM, ya que fue añadido junto a los distintos reactivos disueltos en este tampón. Por otra parte, para la medición de la actividad GPX en hemolisado, la muestra fue diluida en reactivo Drabkin reconstituido (1:250 v/v), para convertir la hemoglobina en cianmetahemoglobina, ya que se ha comprobado que incluso cantidades mínimas de metahemoglobina podrían falsear los datos. Además, se empleó hidroperóxido cumeno, en lugar de peróxido de hidrógeno, como sustrato, manteniendo las mismas concentraciones.

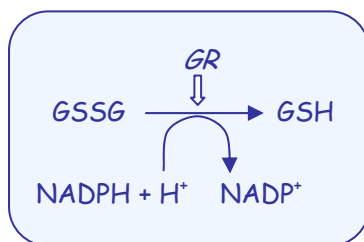
*Cálculos*

La actividad específica del enzima glutation peroxidasa fue expresada en mU mg de proteína<sup>-1</sup> (mU mg de hemoglobina<sup>-1</sup> en el caso del hemolisado). Una unidad de actividad fue definida como la cantidad de enzima requerida para transformar un  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto bajo las condiciones analíticas descritas. Para el cálculo de dicha actividad se utilizó la fórmula descrita para los enzimas de metabolismo intermediario.

**Glutation reductasa (GR, E.C. 1.6.4.2)***Fundamento*

La actividad glutacion reductasa (GR) se determinó por el método modificado de Carlberg y Mannervik (1975).

Para ello, se realizó una lectura a 340 nm del decremento en la absorbancia producido por la oxidación del NADPH utilizado por la GR, en el paso de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH).



### Reactivos

- Tampón fosfato sódico 0.1 M pH 7.5, EDTA 1 mM
- Solución extemporánea de NADPH 0.7 mM
- Solución extemporánea de glutatión oxidado (GSSG) 3.25 mM

Tanto la solución de NADPH como la de GSSG fueron preparadas en tampón fosfato sódico 0.1 M pH 7.5, EDTA 1 mM.

### Procedimiento

$\lambda = 340 \text{ nm}$	Concentración en pocillo	Volumen ( $\mu\text{l}$ ) de 200 $\mu\text{l}$
NADPH	0.63 mM	180
GSSG	0.16 mM	10
Extracto		10

Nota: la concentración total del tampón fosfato potásico pH 7.5 y de EDTA en pocillo es de 47.5 mM y 0.95 mM, respectivamente, ya que fueron añadidos a través de las soluciones de NADPH y GSSG que se realizaron en este tampón.

### Cálculos

La actividad específica del enzima glutatión reductasa fue expresada en mU mg de proteína<sup>-1</sup> (mU mg de hemoglobina<sup>-1</sup> en el caso del hemolisado). Una unidad de actividad fue definida como la cantidad de enzima requerida para transformar un  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto bajo las condiciones analíticas descritas. Para el cálculo de dicha actividad se utilizó la fórmula descrita para los enzimas de metabolismo intermediario.

## INDICADORES DE DAÑO OXIDATIVO

### Niveles de peroxidación lipídica

#### *Fundamento*

La medida de los productos finales de la peroxidación lipídica es uno de los métodos más comúnmente utilizados como índice de daño oxidativo. Entre estos productos se encuentra el malondialdehído (MDA) formado tras la oxidación de los ácidos grasos polinsaturados por la acción de los radicales  $\cdot\text{OH}$ . Para determinar la concentración del MDA presente en una muestra empleamos el método colorimétrico propuesto por Buege y Aust (1978), en el cual el MDA en presencia de ácido tiobarbitúrico (TBA) da lugar a un compuesto rojo que absorbe luz a 535 nm.

#### *Reactivos*

- Ácido clorhídrico (HCl) 0.25 N.
- Ácido tricloroacético (TCA).
- Ácido tiobarbitúrico (TBA).
- Hidroxitolueno butilado (BHT).
- Solución de malondialdehído bis-dimetilacetal (MDA-bis) 0.1 mM.

#### *Procedimiento*

Para realizar este análisis es fundamental que todo el material esté enjuagado con agua mili-Q. Igualmente todos los reactivos deben ser preparados con agua mili-Q.

- Preparación del reactivo extemporáneo de TCA-TBA-HCl-BHT:

Se disolvieron 15 g TCA en 80 ml de HCl 0.25 N. Tras esto se añadió 0.375 g de TBA que fue disuelto por agitación con calentamiento ligero. La mezcla resultante se llevó a un volumen final de 100 ml con agua mili-Q y se añadieron 0.01 g de BHT, disolviéndose por agitación durante 2 horas.

- Preparación de la curva patrón:

Conc. MDA-bis ( $\mu\text{M}$ )	Sol. MDA-bis ( $\mu\text{l}$ )	H <sub>2</sub> O mili-Q ( $\mu\text{l}$ )	Vol. final ( $\mu\text{l}$ )
0	0	10000	10000
0.1	10	9990	10000
0.25	25	9975	10000
1	100	9900	10000
5	500	9500	10000
10	1000	9000	10000
15	1500	8500	10000
20	2000	8000	10000

De cada punto preparado ( $V_f = 10$  ml) de la curva patrón se tomaron 100  $\mu\text{l}$  que fueron mezclados junto con 500  $\mu\text{l}$  de reactivo TCA-TBA-HCl-BHT en tubos de ensayo.

- Preparación de las muestras:

En tubos de ensayo se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de extracto y 500  $\mu\text{l}$  de reactivo TCA-TBA-HCl-BHT.

Todos los tubos (muestras y curva patrón) fueron agitados vigorosamente e incubados en baño a 100 °C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se sacaron y dejaron enfriar, para pasar a centrifugarlos a 1500 g durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido (muestras y curva patrón) fue utilizado para la lectura de la absorbancia a 535 nm frente a blanco de reactivo (punto 0 de la curva patrón).

### *Cálculos*

A partir de la recta obtenida por la representación de la densidad óptica de las distintas concentraciones de la curva patrón, y por interpolación de los valores de densidad óptica de las muestras, se calcula la concentración de MDA en cada una de ellas. Los niveles de peroxidación lipídica se expresaron como  $\text{nM MDA} = \text{nmol MDA g de tejido}^{-1}$ .

## Contenido de grupos carbonilo en proteínas

### Fundamento

La determinación del contenido de grupos carbonilo en proteínas se realizó siguiendo el método de Levine et al. (1990), basado en la lectura a 370 nm de la absorbancia de la 2,4-dinitrofenilhidrazona generada por la reacción de los grupos carbonilo (C=O) con la 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH).



Esta técnica fue aplicada a las muestras de hígado y corazón, siendo imposible de realizar sobre las de hemolisado y músculo blanco, ya que la naturaleza de los extractos no lo permitía.

### Reactivos

- Tampón fosfato sódico 0.1 M pH 7.4.
- Solución extemporánea de sulfato de estreptomicina al 10% (p/v) en tampón fosfato sódico 0.1 M pH 7.4.
- Solución de Tritón X-100 0.5% (v/v) en tampón fosfato sódico 0.1 M pH 7.4.
- Solución de ácido tricloroacético (TCA) al 20% (p/v).
- Ácido clorhídrico (HCl) 2 N.
- Solución extemporánea de DNPH 10 mM en HCl 2N.
- Solución extemporánea de etanol y etilacetato en proporción 1:1.
- Solución extemporánea de guanidina-HCl 6 M en tampón KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM con pH 2.3 ajustado con ácido trifluoroacético (TFA).
- Solución de albúmina bovina al 1% en solución de guanidina-HCl 6 M.

*Procedimiento*

- Preparación de la curva patrón:

<b>Conc. albúmina (<math>\mu\text{g ml}^{-1}</math>)</b>	<b>Sol. albúmina (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>Sol. guanidina-HCl (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>Vol. final (<math>\mu\text{l}</math>)</b>
0	0	1000	1000
100	10	990	1000
250	25	975	1000
500	50	950	1000
750	75	925	1000
1000	100	900	1000

- Preparación de las muestras:

Se prepararon, para cada muestra, dos tubos de ensayo “control” y dos “test”, a los cuales se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de extracto de las muestras, 400  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato sódico, 40  $\mu\text{l}$  de solución de sulfato de estreptomicina y 20  $\mu\text{l}$  de solución de Tritón X-100. Esta mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 15 minutos, tras lo cual se centrifugó a 1500 g (10 minutos). El sobrenadante fue recuperado y trasvasado a un nuevo tubo, donde se añadieron 400  $\mu\text{l}$  de solución TCA. Esta nueva mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente ser centrifugada a 2000 g (10 minutos). En este caso, el sobrenadante obtenido se eliminó y el precipitado fue resuspendido de modo que, en el caso de los tubos “control” se emplearon 500  $\mu\text{l}$  de HCl 2N, mientras que en los tubos “test”, la resuspensión se realizó con 500  $\mu\text{l}$  de solución DNPH. Todos los tubos fueron incubados a temperatura ambiente en oscuridad durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de solución TCA a cada uno de los tubos, siendo de nuevo incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente y centrifugados a 2000 g (5 minutos). El sobrenadante fue eliminado y el precipitado resuspendido y lavado añadiendo 500  $\mu\text{l}$  de solución etanol:acetato (1:1). Esta mezcla se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se centrifugó a 1500 g (7 minutos). De nuevo se eliminó el sobrenadante, de forma que el precipitado fue sometido al proceso de lavado hasta eliminar el color amarillo producido por el exceso de DNPH. Tras el último centrifugado, los precipitados fueron resuspendidos en 1 ml de solución de guanidina.

En este punto, tanto los tubos de las muestras como los correspondientes a la curva patrón, que hasta el momento no habían sido sometidos a ningún tratamiento, fueron incubados a 37 °C durante 15 minutos. Finalmente se procedió a la lectura de la absorbancia, de forma que para los “controles” y “test” esta lectura fue realizada a 370 nm frente a blanco de guanidina para la determinación del contenido en grupos carbonilo. Por otra parte, la lectura de la absorbancia de los controles y la curva patrón fue realizada a 280 nm frente blanco de guanidina para la determinación de la concentración de proteína.

### *Cálculos*

El contenido de grupos carbonilos fue calculado usando un coeficiente de extinción molar para las hidrazonas alifáticas de  $22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  según la siguiente expresión:

$$\text{nmoles C=O ml}^{-1} = \frac{\text{Absorbancia test}_{370} - \text{Absorbancia control}_{370}}{22 \times 10^{-3}}$$

La concentración de proteínas se calculó por interpolación sobre la recta obtenida de las absorbancias a 280 nm correspondientes a las distintas concentraciones preparadas de la curva patrón. Finalmente, los resultados fueron expresados como nmoles de C=O mg de proteína<sup>-1</sup>.





## 2. ANEXO II: ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>AA:</b> Ácido ascórbico	<b>LDL:</b> Lipoproteínas de baja densidad
<b>ACoAT:</b> Acetoacetil-CoA tiolasa	<b>MDA:</b> Malondialdehído
<b>ACP:</b> Proteína transportadora de grupos acilo	<b>MDH:</b> Malato deshidrogenasa
<b>ADN:</b> Ácido desoxiribonucleico	<b>MELN:</b> Materia extractiva libre de nitrógeno
<b>ADP:</b> Adenosín difosfato	<b>n.s.:</b> No significativo
<b>ANOVA:</b> Análisis de la varianza	<b>NAD:</b> Nicotín adenín dinucleótido
<b>ARN:</b> Ácido ribonucleico	<b>NADP:</b> Nicotín adenín dinucleótido fosfato
<b>ATP:</b> Adenosín trifosfato	<b>NBT:</b> Nitro blue tetrazolium
<b>BHT:</b> Hidroxitolueno butilado	<b>NO<sup>•</sup>:</b> Óxido nítrico
<b>CAT:</b> Catalasa	<b>NOS:</b> Óxido nítrico sintasa
<b>CDA:</b> Coeficiente de digestibilidad aparente	<b>O<sub>2</sub>:</b> Óxígeno molecular
<b>CDA-L:</b> CDA lípidos	<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub>:</b> Oxígeno singlete
<b>CDA-MO:</b> CDA materia orgánica	<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:</b> Ión superóxido
<b>CDA-MS:</b> CDA materia seca	<b>OAA:</b> Ácido oxalacético
<b>CDA-P:</b> CDA proteína	<b>OH<sup>•</sup>:</b> Radical hidroxilo
<b>CEC:</b> Coeficiente de eficacia en crecimiento	<b>β-OHBDH:</b> β-hidroxiacil coenzima A deshidrogenasa
<b>CHCM:</b> Concentración de hemoglobina corpuscular media	<b>ONOO<sup>-</sup>:</b> Peroxinitrito
<b>CHOD:</b> Colesterol oxidasa	<b>P/E:</b> Proteína/energía
<b>CoA:</b> Coenzima A	<b>PC:</b> Piruvato carboxilasa
<b>Conc.:</b> Concentración	<b>Δ Peso:</b> Incremento de peso
<b>CS:</b> Citrato sintasa	<b>PEP:</b> Fosfoenol piruvato
<b>DHAP:</b> Dihidroxiacetona fosfato	<b>PEPCK:</b> Fosfoenol piruvato carboxiquinasa
<b>DNPH:</b> 2,4-dinitrofenilhidracina	<b>PFK:</b> Fosfofructo quinasa
<b>DO:</b> Densidad óptica	<b>6PG:</b> 6-Fosfogluconato
<b>DTNB:</b> 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico)	<b>6PGDH:</b> 6-Fosfogluconato deshidrogenasa
<b>E.S.:</b> Error estándar	<b>PGI:</b> Fosfoglucosa isomerasa
<b>EDTA:</b> Ácido etilen diamino tetracético	<b>PGK:</b> Fosfoglicerato quinasa
<b>EM:</b> Enzima málico	<b>PGK:</b> Fosfoglicerato quinasa
<b>FAD:</b> Flavín adenín dinucleótido	<b>PGM:</b> Fosfoglicerato mutasa
<b>FAS:</b> Ácido graso sintetasa	<b>PGM:</b> Fosfogluco mutasa
<b>FBP:</b> Fructosa 1,6-bifosfato	<b>PHI:</b> Fosfohexosa isomerasa
<b>FBPasa:</b> Fructosa 1,6-bifosfatasa	<b>PHI:</b> Fosfohexosa isomerasa
<b>GAPDH:</b> Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	<b>PK:</b> Piruvato quinasa
<b>GDH:</b> Glutamato deshidrogenasa	<b>POD:</b> Peroxidasa
<b>GK:</b> Glicerol quinasa	<b>PUFAs:</b> Ácidos grasos poliinsaturados
<b>GOD:</b> Glucosa oxidasa	<b>R<sup>•</sup>:</b> Radical peroxi
<b>GOT:</b> Glutamato oxalacetato transaminasa	<b>R5P:</b> Ribosa 5-fosfato
<b>G3P:</b> Glicerol 3-fosfato	<b>RDS:</b> Relación digestivosomática
<b>G6P:</b> Glucosa 6-fosfato	<b>RHS:</b> Relación hepatosomática
<b>G6Pasa:</b> Glucosa 6-fosfatasa	<b>RNS:</b> Especies de nitrógeno reactivo
<b>G6PDH:</b> Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	<b>RO<sup>•</sup>:</b> Radical alcóxilo
<b>GPO:</b> Glicerol fosfato oxidasa	<b>ROO<sup>•</sup>:</b> Radical peróxilo
<b>GPT:</b> Glutamato piruvato transaminasa	<b>ROOH:</b> Radical hidroperóxido
<b>GPX:</b> Glutathion peroxidasa	<b>ROS:</b> Especies de oxígeno reactivo
<b>GR:</b> Glutathion reductasa	<b>SOD:</b> Superóxido dismutasa
<b>GSH:</b> Glutathion reducido	<b>Sol.:</b> Solución
<b>GSSG:</b> Glutathion oxidado	<b>ss:</b> Sustancia seca
<b>Hb:</b> Hemoglobina	<b>TBA:</b> Ácido tiobarbitúrico
<b>Hcto:</b> Hematocrito	<b>TCA:</b> Ácido tricloroacético
<b>HDL:</b> Lipoproteínas de alta densidad	<b>TCI:</b> Tasa de crecimiento instantáneo
<b>HK:</b> Hexoquinasa	<b>TEMED:</b> Teramilen-etilen-diamina
<b>HK-IV:</b> Glucoquinasa	<b>TFA:</b> Trifluoroacético
<b>HMG-CoA:</b> β-hidroxi β-metilglutaril CoA	<b>TNB:</b> 5-tio-2-ácido nitrobenzóico
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b> Peróxido de hidrógeno	<b>TPI:</b> Triosa fosfato isomerasa
<b>HO<sub>2</sub><sup>•</sup>:</b> Radical hidroperóxilo	<b>Tris-HCl:</b> Tris (hidroximetil aminometano) clorhídrico
<b>HOAD:</b> β-hidroxiacil coenzima A deshidrogenasa	<b>UDP:</b> Uridín difosfato
<b>HOCl:</b> Ácido hipocloroso	<b>UI:</b> Unidad internacional
<b>HPMC:</b> Hidroxipropil-metil celulosa	<b>UTP:</b> Uridín trifosfato
<b>IC:</b> Índice de conversión	<b>VLDL:</b> Lipoproteínas de muy baja densidad
<b>IGP:</b> Índice de grasa perivisceral	<b>Vol.:</b> Volumen
<b>IN:</b> Índice de nutrición	<b>VPL:</b> Valor productivo de los lípidos
<b>α-KG:</b> α-cetoglutarato	<b>VPP:</b> Valor productivo de la proteína
<b>LDH:</b> Lactato deshidrogenasa	<b>XOD:</b> Xantina oxidasa





