

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Animal



**DIFERENTES ASPECTOS FISIOLÓGICOS EN
EL ESTURIÓN *Acipenser naccarii*. ESTUDIO
COMPARADO CON LA TRUCHA
Oncorhynchus mykiss.**

MIRIAM FURNÉ CASTILLO

TESIS DOCTORAL

GRANADA, 2008

**DIFERENTES ASPECTOS FISIOLÓGICOS EN EL
ESTURIÓN *Acipenser naccarii*. ESTUDIO COMPARADO
CON LA TRUCHA *Oncorhynchus mykiss*.**

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

D^a Miriam Furné Castillo

DIRECTORAS DEL TRABAJO

Prof. Dra. D^a. Ana Sanz Rus

Prof. Dra. D^a. Amalia E. Morales Hernández

ASPIRANTE

Miriam Furné Castillo

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 la ayuda de una beca asociada al grupo de investigación Nutrición y Alimentación de Peces de la Universidad de Granada, además del apoyo económico de los proyectos de investigación, financiados por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, que se detallan a continuación:

- Estudio de diferentes aspectos fisiológicos e histológicos en el esturión *Acipenser naccarii* (AGL2001-2984 8(ACU)).
- Biología del esturión *Acipenser naccarii*. Aspectos fisiológicos. (CGL2006-12193/BOS).

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones:

- Furné, M., Hidalgo, M.C., López, A., García Gallego, M., Morales, A.E., Domezain, A. y Sanz, A., 2005. Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture* 250, 391-398.

- Trenzado, C., Hidalgo, M.C., García-Gallego, M., Morales, A.E., Furné, M., Domezain, A., Domezain, J., Sanz, A., 2006. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation levels in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture* 254, 758-767.

- García Gallego, M., Domezain, A., De la Higuera, M., Domezain, J., Hidalgo, M.C., Morales, A. E., Furné, M., Sanz, A. On the nutrition and feeding studies with sturgeon species as basis for their culture. En: *Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons*. Elsevier. (en prensa)

- Furné, M., García-Gallego, M., Hidalgo, M.C., Morales, A.E., Domezain, A., Domezain, J., Sanz, A., 2008. Effect of starvation and refeeding on digestive enzyme in sturgeon (*Acipenser naccarii*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Physiology and Biochemistry* 149A, 420-425.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Aquaculture 250 (2005) 391–398

Aquaculture

www.elsevier.com/locate/aqua-online

Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study

M. Furné^a, M.C. Hidalgo^a, A. López^a, M. García-Gallego^a, A.E. Morales^a,
A. Domezain^b, J. Domezainé, A. Sanz^{a,*}

^aDepartment Biología Animal y Ecología, Facultad de Ciencias, Campus Fuentenueva, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain

^bDepartment I+D Piscifactoría “Sierra Nevada”, 18313 Riofrio, Granada, Spain

Received 18 February 2005; received in revised form 17 May 2005; accepted 17 May 2005

Abstract

Studies on the digestive secretions in fish can elucidate certain aspects of their nutritive physiology and thereby resolve some nutritional problems, such as matching of an artificial diet to the nutritional needs of the fish. The aim of the present study was to analyse the digestive protease, amylase, and lipase activity in the Adriatic sturgeon and compare it with that of rainbow trout. The results show that the sturgeon is not only capable of digesting fat and protein, like any other carnivorous fish, but can also digest carbohydrates at levels characteristic of an omnivore. In turn, the proportion of acid-protease enzymes indicates the need for major gastric digestion.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Adriatic sturgeon; Digestive enzymes; Rainbow trout; Amylase; Lipase; Protease

1. Introduction

The digestion of food into subunits appropriate for absorption in the digestive tract of the animal depends largely on the available enzymes. This digestion implies a 20% to 80% food–energy loss (Cho, 1987) which cannot be used in the maintenance and growth processes.

Studies on digestive secretions in fish have helped define the limits of dietary protein (Twining et al., 1983) and carbohydrates (Spannhof and Plantikow, 1983). Divakaran et al. (1999), working on the digestive enzymes in *Polydactylus sexfilis* and *Caranx melampygus*, recommended different dietary proportions of macronutrients for their best nutritive use. Hofer and Köck (1989) suggested that, from the profile of digestive enzymes, it is possible to predict the ability of a species to use different nutrients. An understanding of the functioning of the digestive enzymes helps to explain nutrient digestibility (Glass et al., 1989; Kolkovski, 2001). In short, studies

* Corresponding author. Tel.: +34 958 243243; fax: +34 958 243238.

E-mail address: anasanz@ugr.es (A. Sanz).

on digestive secretions in fish can elucidate certain aspects of its nutritive physiology and help resolve nutritional problems, such as the matching of an artificial diet to the nutritive capabilities of fish.

One of the most basic problems to be solved in the farming of a new species is its nutrition. Rainbow trout was one of the first fish species to be farmed and among the first for which the nutrition was extensively studied. At present, in some European countries such as Italy and Spain, the Adriatic sturgeon has begun to be farmed. Adriatic sturgeon migrates seasonally from fresh water of the rivers Po, Ticino and Adige to the Adriatic Sea (Clementi et al., 1999). Recent studies (Garrido-Ramos et al., 1999; Hernando et al., 1999; De la Herrán et al., 2004) support the contention that the historical distribution of this species included certain Spanish rivers.

The different experimental conditions, different methodology of collecting samples and variety of techniques used for determining digestive enzymes in fish hampers establishing absolute values and comparing different species, and thereby drawing valid and applicable conclusions concerning the nutritive physiology of a species.

Rainbow trout, a carnivorous fish, has low amylase activity. In herbivorous and omnivorous fish, amylase activity is higher than in carnivores (Hsu and Wu, 1979; Hofer et al., 1982; Kuźmina, 1986; Munilla-Morán and Saborido-Rey, 1996; Hidalgo et al., 1999). For example, in European eel, amylase activity is higher than in trout (Hidalgo et al., 1999). With respect to protease activity found in different fish species, no classification is possible according to feeding behaviour. Rainbow trout and common carp have high protease activity values while certain other carnivorous fish such as European eel and gilthead seabream have lower activities (Hidalgo et al., 1999).

Few reports are available on the digestive secretions with lipase activity in fish. Leger et al. (1979) purified a lipase and colipase in rainbow trout. Lie and Lambertsen (1985) have described digestive lipase activity in Atlantic cod. Borlongan (1990) reported optimal activity for pancreatic and intestinal lipase of milkfish, at two pH values. It appears that carnivorous fish have higher digestive lipase activity than do omnivorous or herbivorous fish (Chakrabarti et al., 1995; Opuszynski and Shireman, 1995; Tengjaroenkul et al., 2000).

The aim of the present work was to analyse the protease, amylase, and lipase digestive enzymes of Adriatic sturgeon and compare it to rainbow trout in order to increase our knowledge on the physiology of this sturgeon species and gain information concerning its nutrition.

2. Materials and methods

2.1. Experimental animals

Ten Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) 1+ of age and with a mean weight of 537.6 ± 50.7 g and ten rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) 1+ of age and 282.3 ± 12.2 g mean weight were used. Both species were obtained from the fish farm Sierra Nevada S.L. (Riofro, Granada, Spain). The maintenance and feeding conditions were those of the fish farm. Both fish species were fed the same artificial diet (Le Gouessant, France), with an approximate chemical composition of 48% of protein, 14% lipid, 11.4% ash, and 15% of carbohydrates.

After 48 h without food, the fish were killed and their complete digestive tracts (from oesophagus to the anus) were removed, after which the samples were immediately placed in liquid nitrogen and stored at -80 °C until analysed. Table 1 presents the parameters and biometric indices of the animals used in the assays.

2.2. Treatment of the samples

The complete digestive tract of each fish was homogenized in an electric homogenizer (Heidolph Instruments), the process was performed on ice. For the homogenization, a 100 mM Tris-HCl buffer with 0.1 mM EDTA and 0.1% triton X-100, pH 7.8, was used at a proportion of 1 g tissue in 9 ml of buffer.

The homogenates were centrifuged at $30,000 \times g$ for 30 min at 4 °C in a Kontron centrifuge model

Table 1
Biometric parameters for Adriatic sturgeon and rainbow trout

	Fish weight (g)	Digestive tract weight (g)	DSI
Sturgeon	537.6 ± 50.7	25.4 ± 2.7	4.72 ± 0.26
Trout	282.3 ± 12.2	14.1 ± 1.3	5.11 ± 0.55

DSI: (digestive tract weight/fish weight) $\times 100$.

Centrikon H-401. After centrifugation, the supernatant was collected and frozen at -80°C until analysed.

2.3. Enzymatic determinations

The total proteolytic activity was estimated using the casein-hydrolysis method by Walter (1984). The enzymatic determination was made using several pH values over the physiological range of the digestive tract. The buffers used were KCl–HCl 0.1 M (pH 1.5), glycine–HCl 0.2 M (3.0), citrate 0.1 M–phosphate 0.2 M (pH 4.0 and 7.0), Tris–HCl 0.1 M (pH 8.5 and 9.0) and glycine–NaOH 0.1 M (pH 10.0). The enzymatic reaction mixtures were composed of casein at 1% (w/v) in water (0.25 ml), buffer (0.25 ml) and extract (0.1 ml). It was covered for 1 h at 37°C . The reaction was stopped by the addition of 0.6 ml of trichloroacetic acid at 8% (w/v). After being kept for 1 h at 2°C , the sample was centrifuged at $1800 \times g$ for 10 min, and the absorbance of the supernatant measured at 280 nm. The extract was added to the blank tubes at the end of the incubation just before adding the trichloroacetic acid. The samples were assayed in triplicate and blanks in duplicate. L-tyrosine was used as a standard. One unit of total proteolytic activity was defined as the quantity of enzyme that released one mmol of tyrosine $\text{ml}^{-1} \text{min}^{-1}$.

Although there are many specific techniques to determine the activity of each proteolytic enzyme, we chose a non-specific technique (Clark et al., 1985; Uys and Hecht, 1987; Munilla-Morán and Stark, 1989). This method enables the quantification of different proteolytic activities as a function of pH: the activity of pepsin (acidic pH), chymotrypsin and trypsin activity (neutral or slightly basic pH) and other enzymes such as carboxypeptidases, elastases, and collagenases (basic pH). The total proteolytic activity was estimated from the sum of the different activities at different pH values.

The α -amylase was determined by the starch-hydrolysis method, according to Robyt and Whelan (1968). The enzymatic reaction mixture consisted of 2% (w/v) starch solution (0.125 ml), 0.1 M citrate–phosphate buffer at pH 7.5 (0.125 ml), and a digestive extract (0.05 ml). The reaction mixture was incubated for 1 h at 37°C . Absorbance was determined at 600 nm. For the blank tubes, the same procedure was followed except for the addition of the extract just after incubation.

Maltose was used as a standard, and the activity unit of α -amylase was defined as the quantity of enzyme that produced one mmol of maltose $\text{ml}^{-1} \text{min}^{-1}$.

The lipase activity was determined by the evaluation of the degradation of triacylglycerols, diacylglycerols, and monoacylglycerols to free fatty acids, following the method of Bier (1955). For the emulsion, a 1% solution of 1 l of polyvinyl alcohol (PVA) in distilled water was used. Then 5 ml of 0.1 N HCl were added, heating to $75\text{--}85^{\circ}\text{C}$ for 1 h, followed by cooling, filtering, and adjusting pH to 8.0 with 0.1 N NaOH. To an aliquot of the above solution, virgin olive oil was added to a substrate concentration of 0.1 M. The mixture was emulsified for 5 min. The reaction mixture was composed of a PVA solution-emulsified substrate (1 ml), McIlvaine buffer at pH 8 (0.5 ml), and digestive extract (0.5 ml). The McIlvaine buffer was prepared from 0.1 M citric acid and 0.2 M bisodium phosphate. The reaction mixture was incubated for 4 h at 37°C . After incubation, 3 ml of a 1:1 ethanol–acetone solution were added to stop the reaction and break the emulsion. A few drops of 1% phenolphthaleine in ethanol were added to the reaction mixture and titrated with 0.01 M NaOH. For the blank tubes, the same procedure was followed but with boiled enzyme. Porcine type-II pancreatic lipase (Sigma L3126) was used as a standard. One unit of lipase activity was defined as the hydrolysis of 1.0 microequivalent of fatty acids from triacylglycerols in 1 h at pH 7.7 and 37°C .

Protein content of the supernatant solutions was determined by the Bradford method (Bradford, 1976), using bovine serum albumin as the standard.

2.4. Statistical analysis

The results are expressed as means \pm SEM. The differences between species for each enzyme activity were tested for significance using the Student's *t*-test ($P < 0.05$).

3. Results

Overall, the enzymatic activity in the digestive tract of rainbow trout was greater than in Adriatic sturgeon (Table 2). Amylase activity in the digestive tract of Adriatic sturgeon was slightly higher than that of rain-

Table 2
Digestive enzymatic activities in digestive tract of Adriatic sturgeon and rainbow trout

	Amylase		Lipase		Proteases	
	Sturgeon	Trout	Sturgeon	Trout	Sturgeon	Trout
U/mg protein	133.65 ± 22.08	129.24 ± 10.92	22.91 ± 3.47	47.95* ± 3.91	27.39 ± 2.34	57.07* ± 5.52
U/g digestive tract	2129.37 ± 202.46	1622.35* ± 40.27	362.06 ± 37.39	598.65* ± 36.57	43.20 ± 3.00	66.47* ± 3.10

Data are means ± SEM ($n=10$). *Significant differences among trout and sturgeon for the same enzymatic activity ($P<0,05$).

bow trout. However, lipase activity in rainbow trout was about twice that of the sturgeon. A similar trend was found for total protease activity that is, rainbow trout had higher values in the digestive tract than sturgeon.

When the protease activity was determined at different pH values (Table 3), the activity at acidic pH was greater in rainbow trout than in sturgeon. However, this was because at pH 4.0 the rainbow trout had 5.6-fold more activity than did the sturgeon, whereas at pH 1.5 and 3.0 the sturgeon had higher values (1.4- and 2.1-fold, respectively). At pH 7.0, the activity values for trout were 1.6-fold higher than for the sturgeon and at basic pH the trout showed higher proteolytic activity than did sturgeon (2.2- to 2.3-fold).

In both species, the overall neutral and basic protease activity was higher than the acidic protease activity. This was more pronounced in the trout. That is, the enzyme pool with an optimal acidic pH was proportionally greater in the sturgeon than in the trout (Fig. 1).

4. Discussion

First, it should be emphasized that the enzymatic activity determined in the digestive tract of rainbow

trout was greater than in Adriatic sturgeon (Table 2). It might be thought that this could indicate poorer digestive utilization of macronutrients by sturgeon. There are few data in the literature on this subject, but those available demonstrate that the digestibility coefficients of nutrients are high in sturgeon. For example, in the white sturgeon, Buddington and Doroshov (1986) and Herold and Hung (1995) reported high digestibility values consistent with our previous data for Adriatic sturgeon (Sanz et al., 1997). This observation has also been reported for Siberian sturgeon (Medale et al., 1991; Kaushik et al., 1993).

The data available on digestive utilization of nutrients by sturgeon agrees with the digestibility data that we have for rainbow trout, particularly of protein (Morales et al., 1994; Sanz et al., 1994; Burel et al., 2000; Refstie et al., 2000; Gisbert et al., 2001).

For digestion, it is necessary for the food to be in contact with digestive enzymes for a certain length of time and to be subjected to grinding, mixing, and advance movements characteristic of the digestive tract. A longer stay of the food in the digestive tract could compensate for lower enzyme activity. The time for gastric evacuation in rainbow trout or the transit time and finally the digestive processes are known (Sanz et al., 1987). Thus, gastric emptying requires

Table 3
Protease activities at different pH in digestive tract of Adriatic sturgeon and rainbow trout

Protease activity (U/mg protein)		
pHs	Sturgeon	Trout
1.5	0.85 ± 0.10	0.61 ± 0.07
3	0.97 ± 0.11	0.45 ± 0.08
4.5	0.61 ± 0.09	3.42 ± 0.28
7	5.55 ± 0.46	9.09 ± 0.84
8.5	6.42 ± 0.64	14.87 ± 1.58
9	6.51 ± 0.59	14.20 ± 1.45
10	6.47 ± 0.64	14.43 ± 1.55

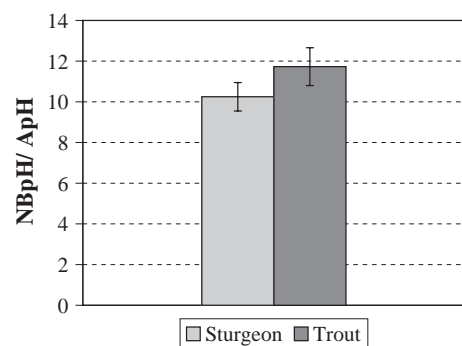


Fig. 1. Protease activity in Adriatic sturgeon and rainbow trout. Neutral and basic pH (NBpH) and acidic pH (ApH) activities ratio.

between 12 and 24 h and between 48 and 72 h for total elimination of the food remaining in the intestine. We have not studied this in sturgeon, but, from experience, we have found that after several days of starvation, Adriatic sturgeon continued to eliminate faeces, indicating that the digestive processes in this fish are slower than in the rainbow trout. Therefore, it could be that the lower activity of digestive enzymes in the digestive tract of Adriatic sturgeon (lipases and proteases) is offset by longer contact time with the digestive enzymes. Nor can it be ruled out that, although the samples were collected in both species at 48 h before the meals, if the digestion rate is lower in sturgeon, a certain quantity of enzymes were lost during the sampling process by removal of food remains from the digestive tract. Determination of digestive enzyme activity in this species, in a serial way during prolonged starvation, which we plan to undertake soon, would shed light on the veracity of this latter hypothesis.

If we accept that the digestive-enzyme pool of the sturgeon gives it good digestibility of nutrients (protein, fat, and carbohydrates), it is necessary to examine the relative proportion of each type of enzyme: amylase, proteases, and lipases. We refer to the data that indicate sturgeon has proportionally greater quantities of amylase than of proteases and lipases than does trout, regardless of the way of expressing this activity (Table 2, Fig. 2). If we consider the amylase:protease and the amylase:lipase ratios, we find both to be greater in sturgeon, while the protease:lipase ratio was very similar in both species (Fig. 2). Various workers have demonstrated that amylase activity is greater in omnivorous and herbivorous fish

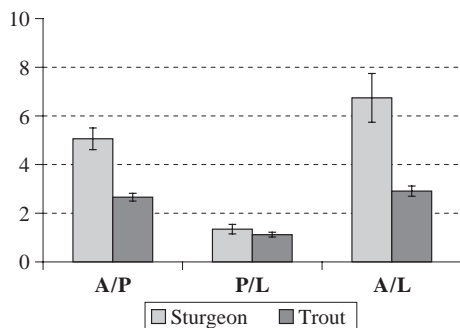


Fig. 2. Enzyme activities in the digestive tract of Adriatic sturgeon and rainbow trout. Amylase (A), protease (P) and lipase (L) activities ratio.

than in carnivorous fish (Fänge and Grove, 1979; Ugolev et al., 1983; Hidalgo et al., 1999). Furthermore, Hidalgo et al. (1999) also found differences in the amylase pool and in the amylase:protease ratio within carnivorous species, with rainbow trout having lower values than European eel. This agrees with the observations that the European eel utilizes carbohydrates better than does rainbow trout (Hidalgo et al., 1993; Sanz et al., 1993; García-Gallego et al., 1995).

It could be that Adriatic sturgeon is more able to utilize carbohydrates than is rainbow trout. Herold and Hung (1995) found a digestibility coefficient of 75% for dextrin in white sturgeon. Sanz et al. (1997) determined an apparent digestibility coefficient of up to 68% for carbohydrates in the form of dextrin (42% in the diet) in Adriatic sturgeon. Carbohydrates are, in general, poorly digested in rainbow trout (Singh and Nose, 1967; Bergot and Breque, 1983; Kim and Kaushik, 1992; Brauge et al., 1994; Storebakken et al., 1998).

Also, the better digestive utilization of carbohydrates in sturgeon than in trout is not surprising, as sturgeon consumes plant material (seeds and vegetal detritus) in its natural environment, this type of diet in the wild being omnivorous with carnivorous tendencies (Soriguer et al., 1999).

With respect to the enzymatic proteasic secretion with optimal activity at different pH values (Table 3), we found activity at acidic pH (1.5, 3.0 and 4.0). The literature describes different pepsins at different optimal pH values (Gildberg, 1988) as well as other acid proteinases caused by caseolytic enzymes including cathepsins D and E (Cohen et al., 1981; Clark et al., 1985; Haard et al., 1996; Sabapathy and Teo, 1993; Chiu and Pan, 2002; Yetty et al., 2004). Pepsins and gastric proteases of sturgeon apparently present greater activity at more acidic pH values than in trout, perhaps for the need of rupturing plant cell walls. In addition, the acidic enzyme pool in comparison with a basic one is higher in sturgeon (Fig. 1), indicating greater gastric digestion than in the trout.

The higher enzymatic activity found in the trout at pH 4.0 could be due to an enzyme called cathepsin, which appears to be pancreatic or intestinal in origin (Kirschke and Barret, 1987).

After gastric digestion, the neutral and basic proteases of intestinal and pancreatic origin finish the digestion. We found a large quantity of basic proteases enzymes in both species. Enzymes such as trypsin,

chymotrypsin, collagenases, elastases, carboxypeptidases, have been described in different types of fish (Eshel et al., 1993; Chiu and Pan, 2002; Chong et al., 2002).

With respect to lipase activity, carnivorous fish usually consume fat-rich food, explaining the presence of lipases (Chakrabarti et al., 1995). This presence is greater than in omnivorous or herbivorous fish (Opuszynski and Shireman, 1995; Tengjaroenkul et al., 2000). The protease:lipase ratio in sturgeon is very similar to that of trout (Fig. 2). As commented above, many works report that fat digestibility is strong in trout. Sanz et al. (1997) also found good fat digestibility for this sturgeon species, with values of up to 90% for a diet with 17% fat and 84% for a fat level of 22%.

In conclusion, the comparative study of the enzymatic content in the digestive tract, with protease, amylase, and lipase activity in sturgeon with respect to trout shows not only that sturgeon would digest the fat and the protein as any other carnivore would, but also that the amylase pool would enable this fish to digest carbohydrates at omnivore levels. This ability would be advantageous for diet manufacturing, as carbohydrates could be added at a greater proportion than for strictly carnivorous fish and thereby save on protein costs. In turn, the proportion of acidic protease enzymes indicates the need for major gastric digestion. Future studies at the physiological level, with different type of diets, with starvation, etc., as well as at a structural level, will provide progressively more information about the digestive particularities of this species of fish with such importance, both scientific and commercial.

Acknowledgements

This work has been conducted with the help of a project from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología AGL 2001-2984.

References

- Bergot, F., Breque, J., 1983. Digestibility of starch by rainbow trout: effects of the physical state of starch and the intake level. *Aquaculture* 34, 203–212.
- Bier, M., 1955. Lipases. *Methods in Enzymology* I. Academic Press, New York, pp. 627–642.
- Borlongan, I.G., 1990. Studies on the digestive lipases of milkfish, *Chanos chanos*. *Aquaculture* 89, 315–325.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248.
- Brauge, C., Medale, F., Corraze, G., 1994. Effect of dietary carbohydrate levels on growth, body composition and glycemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in seawater. *Aquaculture* 123, 109–120.
- Buddington, R.K., Doroshov, S.I., 1986. Development of digestive secretions in white sturgeon juveniles (*Acipenser transmontanus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 83A, 233–238.
- Burel, C., Boujard, T., Tulli, F., 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.
- Chakrabarti, I., Gani, Md.A., Chaki, K.K., Sur, R., Misra, K.K., 1995. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comp. Biochem. Physiol.* 112A, 167–177.
- Chiu, S.T., Pan, B.S., 2002. Digestive protease activities of juvenile and adult eel (*Anguilla japonica*). *Aquaculture* 205, 141–156.
- Cho, C.Y., 1987. La energía en la nutrición de los peces. In: Espinosa de los Monteros, J., Labarta, U. (Eds.), *Nutrición en Acuicultura*, vol. II. CAICYT, Madrid, pp. 197–244.
- Chong, A.S.C., Hashim, R., Lee, C.Y., Ali, A.B., 2002. Partial characterization and activities of proteases from digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquaculture* 203, 321–333.
- Clark, J., McDonald, N.L., Stark, J.R., 1985. Metabolism in marine flatfish: II. Protein digestion in dover sole (*Solea solea* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 81B, 217–222.
- Clementi, M., Cataldi, E., Capo, C., Petruzzelli, R., Tellone, E., Giardina, B., 1999. Purification and characterization of the haemoglobin components from Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) blood. *J. Appl. Ichthyol.* 15, 78–80.
- Cohen, T., Gertler, A., Birk, Y., 1981. Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*): I. Purification and physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase. *Comp. Biochem. Physiol.* 69B, 639–646.
- De la Herrán, R., Robles, F., Martínez-Espín, E., Lorente, J.A., Ruiz Rejón, C., Garrido-Ramos, M.A., Ruiz Rejón, M., 2004. Genetic identification of western Mediterranean sturgeons and its implication for conservation. *Conservation Genetics* 5, 545–551.
- Divakaran, S., Kim, B.G., Ostrowski, A.C., 1999. Digestive enzymes present in Pacific threadfin *Polydactylus sexfilis* (Bloch and Schneider 1801) and bluefin trevally *Caranx melampygus* (Cuvier 1833). *Aquac. Res.* 30, 781–787.
- Eshel, A., Lindner, P., Smirnoff, P., Newton, S., Harpaz, S., 1993. Comparative study of proteolytic enzymes in the digestive tracts of the European sea bass and hybrid striped bass reared in freshwater. *Comp. Biochem. Physiol.* 106A, 627–634.
- Fänge, R., Grove, D., 1979. Digestion. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett, J.T. (Eds.), *Fish Physiology, Bioenergetics and Growth* 8. Academic Press, New York, pp. 161–260.

- García-Gallego, M., Bazoco, J., Suárez, M.D., Sanz, A., 1995. Utilization of dietary carbohydrates by fish: a comparative study in eel and trout. *Anim. Sci.* 61, 427–436.
- Garrido-Ramos, M.A., Soriguer, M.C., de La Herrán, R., Jamilena, M., Ruiz Rejón, C., Domezain, A., Hernando, J.A., Ruiz Rejón, M., 1999. Morphogenetic and genetic analysis as proof for the existence of two sturgeon species in the Guadalquivir river. *Mar. Biol.* 129, 33–39.
- Gildberg, A., 1988. Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 91B, 425–435.
- Gisbert, E., Sarasquete, C., Williot, P., Castelló Orvay, F., 2001. Estudio enzimático del tracto digestivo en larvas y juveniles de esturión siberiano (*Acipenser baeri*). *Ser. Monogr. ICCM* 4, 379–384.
- Glass, H.J., McDonald, N.L., Moran, R.M., Stark, J.R., 1989. Digestion of protein in different marine species. *Comp. Biochem. Physiol.* 94B, 607–611.
- Haard, N.F., Dimes, L.E., Arndt, R.E., Dong, F.M., 1996. Estimation of protein digestibility IV. Digestive proteinases from the pyloric caeca of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) fed diets containing soybean meal. *Comp. Biochem. Physiol.* 115B, 533–540.
- Hernando, J.A., Vasil'eva, E.D., Arlati, Ğ., Vasil'ev, Y.P., Santiago, J.A., Belysheva-Polyakova, L., Domezain, A., Soriguer, M.C., 1999. New evidence for a wider historical area of two species of European sturgeons: *Acipenser naccarii* and *Huso huso*. *J. Ichthyol.* 39, 803–806.
- Herold, M.A., Hung, H., 1995. Apparent digestibility coefficients of carbohydrates for white sturgeon. *Prog. Fish-Cult.* 57, 137–140.
- Hidalgo, M.C., Sanz, A., García-Gallego, M., Suárez, M.D., 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., Sanz, A., 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170, 267–283.
- Hofer, R., Köck, G., 1989. Method for quantitative determination of digestive enzymes in fish larvae. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 36, 439–441.
- Hofer, R., Via, D., Troppmair, J., Giussani, G., 1982. Differences in digestive enzymes between cyprinid and non-cyprinid fish. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol. dr. Marco De Marchi* 40, 201–208.
- Hsu, Y.L., Wu, J.L., 1979. The relationship between feeding habits and digestive proteases of some freshwater fishes. *Bull. Inst. Zool. Acad. Sin.* 18, 45–53.
- Kaushik, S.J., Breque, J., Blanc, D., 1993. Apparent amino acid availability and plasma-free amino acid levels in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 107A, 433–438.
- Kim, J.D., 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.
- Kirschke, H., Barret, A.J., 1987. Chemistry of lysosomal proteases. In: Glaumann, H., Ballard, F.J. (Eds.), *Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown*. Academic Press, London, pp. 193–218.
- Kolkovski, S., 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles — implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200, 181–201.
- Kuźmina, V.V., 1986. Obshchie zakonomernosti membrannogo pishchevareniya u ryb i yego adaptivnyye perestroyki (General principles of membrane digestion in fish and its adaptational evolution). Authofs abstract of Doctor's thesis, Biological Sciences, 03.00.13. Leningrad.
- Leger, C., Ducruet, V., Flanzly, J., 1979. Lipase et colipase de la truite arc-en-ciel. Quelques résultats récents. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 19, 825–832.
- Lie, O., Lambertsen, G., 1985. Digestive lipolytic enzymes in cod (*Gadus morhua*): fatty acid specificity. *Comp. Biochem. Physiol.* 80B, 447–450.
- Medale, F., Blanc, D., Kaushik, S.J., 1991. Studies on the nutrition of Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*. II. Utilization of dietary non-protein energy by sturgeon. *Aquaculture* 93, 143–154.
- Morales, A.E., Cardenete, G., de la Higuera, M., Sanz, A., 1994. Effects of dietary protein source on growth, feed conversion and energy utilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 124, 117–126.
- Munilla-Morán, R., Saborido-Rey, F., 1996. Digestive enzymes in marine species. II. Amylase activities in gut from seabream (*Sparus aurata*), turbot (*Scophthalmus maximus*) and redfish (*Sebastes mentella*). *Comp. Biochem. Physiol.* 113B, 827–834.
- Munilla-Morán, R., Stark, J.R., 1989. Protein digestion in early turbot larvae, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquaculture* 81, 315–327.
- Opuszynski, K., Shireman, J.V., 1995. Digestive mechanisms. In: Opuszynski, K., Shireman, J.V. (Eds.), *Herbivorous Fishes: Culture and Use for Weed Management*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 21–31.
- Refstie, S., Korsoren, O.J., Storebakken, T., Baeverfjord, G., Lein, I., Roen, A.J., 2000. Differing nutritional responses to dietary soybean meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 190, 49–63.
- Robyt, J.F., Whelan, W.J., 1968. The β -amylases. In: Radley, J.A. (Ed.), *Starch and Its Derivates*. Academic Press, London, pp. 477–497.
- Sabapathy, U., Teo, L.H., 1993. A quantitative study of some digestive enzymes in the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* and the sea bass, *Lates calcarifer*. *J. Fish Biol.* 42, 595–602.
- Sanz, A., García-Gallego, M., Cardenete, G., de la Higuera, M., Hidalgo, F., 1987. Volumen y composición de la bilis vesicular durante el ayuno en la trucha. *Cuad. Marisq. Publ. Téc.* 12, 173–178.
- Sanz, A., Suárez, M.D., Hidalgo, M.C., García-Gallego, M., 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.
- Sanz, A., Morales, A.E., de la Higuera, M., Cardenete, G., 1994. Sunflower meal compared with soybean meal as partial substitutes for fish meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets: protein and energy utilization. *Aquaculture* 128, 287–300.

- Sanz, A., Domezain, A., Trenzado, C., García-Gallego, M., 1997. Primera aproximación al conocimiento de la utilización digestiva de los macronutrientes por el esturión *Acipenser naccarii*. Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura. 9–11 Julio 1997, Cartagena, Spain, pp. 653–659.
- Singh, R.P., Nose, T., 1967. Digestibility of carbohydrates in young rainbow trout. Bull. Freshwater Fish. Res. Lap. (Japan) 17, 21–25.
- Soriguer, M.C., Domenzain, J., Domenzain, A., Bernal, M., Esteban, C., Pumar, J.C., Hernando, J.A., 1999. An approximation of the feeding habits of *Acipenser naccarii* (Bonaparte 1836) in an artificial river. J. Appl. Ichthyol. 15, 348–349.
- Spannhof, L., Plantikow, H., 1983. Studies on carbohydrate digestion in rainbow trout. Aquaculture 30, 95–108.
- Storebakken, T., Shearer, K.D., Refstie, S., Logocki, S., 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 47, 11–26.
- Tengjaroenkul, B., Smith, B.J., Caceci, T., Smith, S.A., 2000. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. Aquaculture 182, 317–327.
- Twining, S.S., Alexander, P.A., Huibregste, K., Glick, D.M., 1983. A pepsinogen from rainbow trout. Comp. Biochem. Physiol. 75B, 109–112.
- Ugolev, A.M., Yegorova, V.V., Kuz'mina, V.V., Gruzdkov, A.A., 1983. Comparative molecular characterization of membrane digestion on fish and mammals. Comp. Biochem. Physiol. 76B, 627–635.
- Uys, W., Hecht, T., 1987. Assays on the digestive enzymes of sharptooth catfish, *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae). Aquaculture 63, 301–313.
- Walter, H.E., 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), Methods of Enzymatic Analysis, vol. V. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 270–277.
- Yetty, N., Roshada, H., Ahyudin, A., Chong, A., 2004. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). Aquaculture 233, 305–320.

ÍNDICE

I. ANTECEDENTES Y OBJETIVO	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Encuadre taxonómico de los Acipenseriformes.....	10
1.2. Característica de los Acipenseriformes.....	11
1.3. <i>Acipenser naccarii</i> , Bonaparte 1836	13
2. PROCESOS DIGESTIVOS EN PECES	14
2.1. Proteasas y peptidasas.....	17
2.2. Lipasas	19
2.3. Carbohidrasas.	20
3. METABOLISMO INTERMEDIARIO	22
3.1. Metabolismo de hidratos de carbono	22
3.1.1. Reserva de hidratos de carbono.	24

3.1.2. Metabolismo hepático de hidratos de carbono	24
3.1.2.1. Glucólisis	24
3.1.2.2. Vía de las pentosas fosfato	25
3.1.2.3. Ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa	26
3.1.2.4. Síntesis de glucógeno y gluconeogénesis	26
3.1.2.5. Mecanismos de control hormonal	27
3.1.2.6. Regulación de la glucosa sanguínea	27
3.1.3. Metabolismo muscular de hidratos de carbono	28
3.2. Metabolismo proteico	29
3.2.1. Síntesis de aminoácidos y proteínas	30
3.2.2. Catabolismo de aminoácidos y proteínas	31
3.2.3. Excreción	32
3.3. Metabolismo lipídico	32
3.3.1. Síntesis endógena y bioconversión de ácidos grasos	33
3.3.2. Catabolismo de lípidos	33
4. EL ESTRÉS OXIDATIVO	34
4.1. Radicales libres	34
4.2. Metales de transición	36
4.3. Origen de los radicales libres	37
4.4. Defensas antioxidantes	38
4.4.1. Moléculas antioxidantes	39
4.4.2. Enzimas antioxidantes	41
4.5. Daños causados a biomoléculas	45
4.6. Sistemas reparadores	48
III. MATERIAL Y MÉTODOS	51
1. DISEÑO EXPERIMENTAL	53
2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	53
3. TOMA DE MUESTRAS	54
4. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	54
5. ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN CORPORAL	55
6. DETERMINACIÓN DE ENZIMAS DIGESTIVAS	56

6.1. Determinación de la actividad proteolítica total	56
6.2. Determinación de la actividad α -amilasa	58
6.3. Determinación de la actividad lipásica	60
7. DETERMINACIÓN DEL GLUCÓGENO TISULAR	62
8. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE	63
9. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS PLASMÁTICOS	64
10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO	65
10.1. Hexoquinasa	65
10.2. Piruvato quinasa	66
10.3. Fructosa-1,6-bifosfatasa	67
10.4. Lactato deshidrogenasa	68
10.5. Glicerol quinasa	69
10.6. 3-hidroxiacilCoA deshidrogenasa	70
10.7. Citrato sintasa	71
10.8. Enzima málico	72
10.9. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	73
10.10. Glutamato oxalacetato transaminasa	74
10.11. Glutamato piruvato transaminasa	75
10.12. Glutamato deshidrogenasa	76
10.13. Acetoacetyl CoA tiolasa	77
10.14. β -hidroxibutirato deshidrogenasa	78
11. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS Y ENZIMAS DEL ESTRÉS OXIDATIVO	79
11.1. Niveles de peroxidación lipídica	79
11.2. Catalasa	81
11.3. Glutation peroxidasa	82
11.4. Superóxido dismutasa	84
11.5. Glutation reductasa	86
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	89
1. ESTUDIO COMPARADO DE LAS CAPACIDADES DIGESTIVAS EN EL ESTURIÓN <i>Acipenser naccarii</i> Y EN LA TRUCHA <i>Oncorhynchus mykiss</i>	91

1.1. Actividades de enzimas digestivas en el esturión <i>Acipenser naccarii</i> y en la trucha <i>Oncorhynchus mykiss</i> . Estudio comparado.....	93
1.2. Efecto del ayuno y la realimentación sobre la actividad de enzimas digestivas en el esturión <i>Acipenser naccarii</i> y en la trucha <i>Oncorhynchus mykiss</i>	105
1.3. Conclusiones.....	119
2. ESTUDIO COMPARADO DE ENZIMAS DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO EN EL ESTURIÓN <i>Acipenser naccarii</i> Y EN LA TRUCHA <i>Oncorhynchus mykiss</i>....	121
2.1. Actividades de enzimas del metabolismo intermediario en el esturión <i>Acipenser naccarii</i> y en la trucha <i>Oncorhynchus mykiss</i> . Estudio comparado.....	123
2.2. Efecto del ayuno y la realimentación sobre enzimas del metabolismo intermediario en el esturión <i>Acipenser naccarii</i> y en la trucha <i>Oncorhynchus mykiss</i>	141
2.3. Conclusiones.....	168
3. ESTUDIO COMPARADO DE PARÁMETROS INDICADORES DEL ESTADO DE ESTRÉS OXIDATIVO EN EL ESTURIÓN <i>Acipenser naccarii</i> Y EN LA TRUCHA <i>Oncorhynchus mykiss</i>.....	171
3.1. Actividad de enzimas antioxidantes y niveles de peroxidación lipídica en el esturión <i>Acipenser naccarii</i> y en la trucha <i>Oncorhynchus mykiss</i> .Estudio comparado.	173
3.2. Efecto del ayuno y la realimentación sobre la actividad de enzimas antioxidantes y los niveles de peroxidación lipídica en el esturión <i>Acipenser naccarii</i> y en la trucha <i>Oncorhynchus mykiss</i>	189
3.3. Conclusiones.....	205
V. CONCLUSIONES.....	207
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	211

I.- ANTECEDENTES Y OBJETIVO

Es sobradamente conocido que la Acuicultura puede ser considerada como una posible alternativa para la provisión de alimento de alta calidad. Entre las prioridades reconocidas para un desarrollo mantenido de la Acuicultura, se encuentra lo que se designa como diversificación de especies, esto es, el aumento del catálogo de las mismas susceptibles de ser producidas de forma regular en cantidades apreciables con el fin de ampliar la variedad de la oferta en el mercado. Dentro del interés general que existe acerca de la búsqueda de nuevas especies de peces cultivables, merece especial atención el esturión. Constituye un preciado animal del cual todo se puede aprovechar (piel, cartílago, carne y por supuesto sus huevas).

Los Acipenseriformes, en general, y los esturiones, en particular, se han revelado como peces con notables peculiaridades en numerosos aspectos de su biología, en concreto en su fisiología y metabolismo, con respecto a otros grupos ícticos. En buena medida, estas peculiaridades se han achacado a su notable antigüedad filogenética (se les califica de auténticos “fósiles vivientes”). Algunas de las especies han empezado a ser objeto de explotación directa mediante acuicultura para la producción de carne y caviar. El estado de alto riesgo en que se encuentran las poblaciones naturales de muchas de sus especies, ha desatado el interés por su intento de recuperación en numerosos países.

La empresa Piscifactoría Sierra Nevada (Riofrío, España), comenzó con el cultivo del esturión *Acipenser naccarii* en el año 1987 y su comercialización en el 1996. El grupo de investigación de "Nutrición y Alimentación de Peces", dentro del cual se ha realizado este trabajo de investigación, mantiene relaciones con dicha empresa desde hace más de tres décadas y concretamente desde hace más de una década se comenzaron los estudios en esta especie de pez mediante la realización de diversos proyectos de investigación.

En las investigaciones con esta especie, fundamentalmente desde una perspectiva aplicada, hemos encontrado ciertos aspectos muy interesantes y dignos de profundizar en ellos desde una línea de investigación básica que nos permita conocer a este animal de una forma integral. Hay que considerar que disponer de un animal en cultivo, facilita enormemente su estudio y es por eso por lo que a diferencia de otros peces, con un cultivo estandarizado desde hace tiempo como los salmónidos, faltan grandes conocimientos biológicos de base, en general en todas las especies de esturión y más concretamente en *Acipenser naccarii*.

Este trabajo de tesis queda encuadrado dentro del Proyecto de investigación : "Estudio de diferentes aspectos fisiológicos e histológicos en el esturión *Acipenser naccarii*." (AGL2001-2984) y cuyo objetivo general es el de obtener mayor conocimiento acerca de aspectos concretos funcionales de ésta especie de pez enigmática y ancestral y así colaborar en el conocimiento de las bases biológicas y funcionales del esturión *Acipenser naccarii*.

El objetivo general se desglosa en una serie de objetivos parciales:

1º.- Cuantificación del pool enzimático digestivo: amilásico, lipásico y proteásico.

Los enzimas digestivos intervienen en una de las primeras etapas que ocurren en el organismo animal para extraer la energía del alimento.

La determinación del coeficiente de digestibilidad constituye una forma de conocer la utilización digestiva de los nutrientes sin embargo, con frecuencia, los resultados obtenidos están sujetos a errores debido a la problemática de la recogida de heces en el agua.

En trabajos existentes en bibliografía y en investigaciones realizadas por nosotros, se pone de relieve la relación que existe entre la cantidad de las enzimas digestivas y la capacidad de digerir y utilizar los nutrientes del alimento en distintas especies de peces. Catalogar esta especie de acuerdo con sus capacidades digestivas mediante la cuantificación de las enzimas digestivas, puede ampliar los conocimientos que poseemos de su fisiología nutritiva y nos permitirá verificar los resultados obtenidos en nuestra investigaciones anteriores acerca de la existencia en esta especie de pez, considerada como carnívora, de unas menores necesidades nutritivas referidas a la relación proteína/energía respecto a la de otros peces carnívoros.

2º.- Estudio preliminar del metabolismo intermediario.

Los estudios sobre enzimas del metabolismo intermediario son muy abundantes en peces, no es así en esturiones. Con el conocimiento de la utilización de los macronutrientes a nivel metabólico también se pretende explicar no solo las

aparentemente menores necesidades de proteína dietaria del esturión, como se ha comentado anteriormente, sino también si existe preferencia en la utilización de hidratos de carbono o grasa como fuente de energía, circunstancia esta última que en ensayos anteriores aún no nos ha quedado clara. Así pues, junto con los resultados obtenidos en la realización del apartado anterior podremos conocer mejor al esturión *Acipenser naccarii* desde el punto de vista nutritivo.

3º.- Estudio de enzimas antioxidantes y de la peroxidación lipídica.

Las capacidades antioxidantes celulares constituyen una protección ante la formación continua de radicales libres inducida por una amplia variedad de circunstancias. Dichas capacidades difieren en distintas clases de células de un mismo animal, entre diferentes especies animales y ante distintos agentes.

En la actualidad existen multitud de líneas de investigación que abordan la del estudio de las defensas antioxidantes y del estado de estrés oxidativo o balance redox del organismo, como herramienta para tratar de explicar la actuación de diferentes factores en la fisiología celular en particular y en la del organismo en general.

Los estudios referidos a este último apartado esperamos que formen parte y constituyan el punto de partida para en un futuro determinar los factores indicativos de una normalidad fisiológica sinónimo de un estado de bienestar animal.

Todas las determinaciones se realizarán en dos situaciones distintas: en animales sometidos a condiciones propias de piscifactoría y en aquellos que han estado privados de alimento. Asimismo el estudio se efectuará de forma comparada, utilizando como animal control la trucha, debido a que como hemos referido anteriormente los conocimientos fisiológicos de salmónidos son los más avanzados respecto al grupo de peces. Ello ayudará a una mejor interpretación de los resultados obtenidos.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUCCIÓN

Los peces fueron definidos por Thurman y Webber (1984) como vertebrados acuáticos que obtienen el oxígeno del agua mediante el uso de branquias y que poseen aletas con un número variable de elementos esqueléticos llamados radios. Poseen una alta capacidad de adaptación a los distintos hábitats presentes en el medio acuático por lo que han tenido un gran éxito evolutivo. Así mismo, en la actualidad, los peces albergan el 50% de las especies de vertebrados existentes (Smith, 1980).

Los peces gnatostomados se dividen en dos clases principales: condríctios y osteíctios

Los condríctios son peces cuyo esqueleto es cartilaginoso, en ocasiones parcialmente calcificado. Son carnívoros, con boca ínfera y mandíbula hiolística, no unida al cráneo, lo que les permite que la apertura sea máxima. Presentan aletas no plegables, pares, gruesas y carnosas. Su cuerpo aparece recubierto por escamas placoideas o dentículos dérmicos, pudiendo presentar espiráculos bien desarrollados. Son esencialmente marinos y sus orígenes se remontan al Devónico medio (Arnason et al., 2001).

Los osteíctios vienen caracterizados por una osificación del cráneo, las vértebras y las extremidades. Sus branquias se encuentran protegidas por un opérculo óseo. Tienen el cuerpo recubierto por escamas de origen dérmico de tipo cosmoideas, ganoideas o cicloideas. Existen dos subclases: sarcopterigios y actinopterigios.

La subclase sarcopterygii se remonta al Devónico. En la actualidad sólo está representada por dos grupos de peces: los celacantos y los dipnoos (Bruno y Maugeri, 1995).

La subclase Actinopterygii surgió en el Devónico, pero no floreció hasta bien entrado el Carbonífero. Constituye el 95% del número total de especies de peces y se caracterizan por poseer una única aleta dorsal y una aleta caudal homocerca. Según Benton (2004) los Acipenseriformes (esturiones y peces espátula) se encuadrarían dentro de los Actinopterygios, al igual que los teleósteos, grupo al cual pertenecen la mayoría de los peces actuales. (Figura 1)

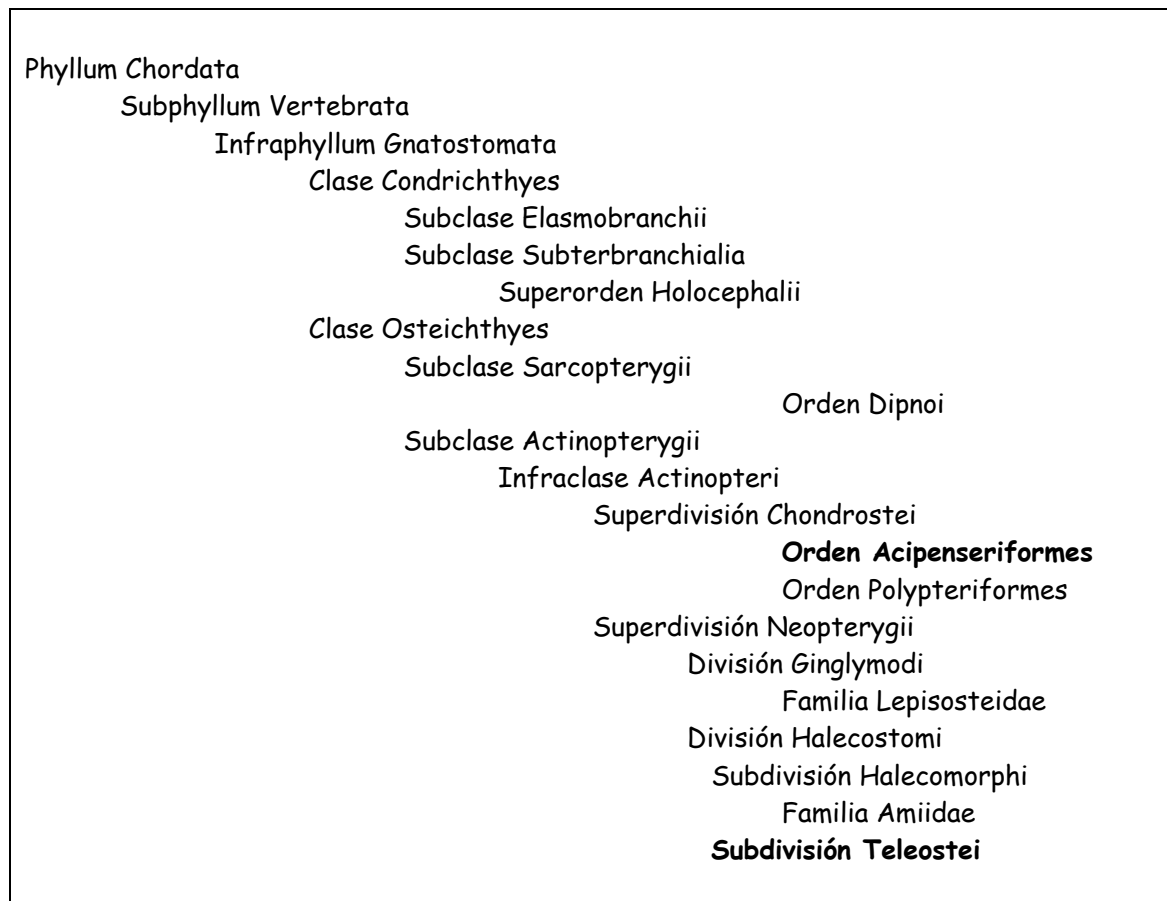


Figura 1. Clasificación de los peces según Benton (2004).

1.1. ENCUADRE TAXONÓMICO DE LOS ACIPENSERIFORMES

Actualmente se afirma que los acipenseriformes constituyen uno de los antecesores de los peces óseos actuales. En el proceso evolutivo, los acipenséridos perdieron parte o la totalidad de sus pesadas escamas ganoideas y eliminaron el proceso de osificación de su esqueleto cartilaginoso.

Los acipenseriformes poseen una serie de características ancestrales que los ubican en una posición basal dentro de los osteíctios. Características tales como escamas ganoideas pesadas, aleta caudal heterocerca, esqueleto cartilaginoso, presencia de espiráculo, y mayor número de radios en las aletas que soportes basales.

La clasificación actual para el grupo fue propuesta por Bemis y col. en 1997 basada en caracteres morfológicos, osteológicos y genéticos para definir la filogenia y sistemática

del grupo. Según esta clasificación el orden Acipenseriformes contiene a la familia Acipenseridae, la cual está formada actualmente por 25 especies, y la familia Polyodontidae, formada por 2 especies de peces espátula. Todas estas especies constituyen el grupo más numeroso de “peces fósiles vivientes” (Gardiner, 1984)



Figura 2. Clasificación de los Acipenseriformes según Bemis, Findeis y Grande (1997)

1.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS ACIPENSERIFORMES

Los acipenseriformes viven exclusivamente en el hemisferio norte, probablemente debido a un requerimiento térmico para la maduración y desarrollo temprano, el cuál

necesita temperaturas no superiores a 20°C (Artyukhin, 1988; Dettlaff et al., 1993). Son especies migradoras, fundamentalmente con fines alimenticios y reproductores. La reproducción ocurre en agua dulce. Algunos autores como Carr et al. (1996) han constatado que el crecimiento somático es mayor en agua salada o salobre que en agua dulce.

La mayoría de los adultos son carnívoros bentónicos oportunistas, por lo que su alimentación varía en función de la cantidad y calidad de presas disponibles. Suelen alimentarse de moluscos, crustáceos, invertebrados bentónicos y ocasionalmente de peces, tanto bentónicos como planctónicos.

La morfología general de los esturiones es muy característica: cuerpo elongado con vientre plano, esqueleto cartilaginoso, notocorda, válvula espiral intestinal, series de escudos óseos longitudinales (una serie dorsal, dos series laterales y dos series ventrales). La parte central de las vértebras no muestra deformaciones. Los huesos maxilares y premaxilares están asociados en la mandíbula superior y no están sujetos al cráneo. La mandíbula inferior es protractil y los adultos carecen de dientes. La boca está rodeada por gruesos labios y tiene una hilera de 4 barbillas en la parte delantera.

Presentan escudetes, afilados en los ejemplares jóvenes y más romos en los adultos, cuyo número es característico de especie. La piel está cubierta de escudos óseos y el primer radio de la aleta pectoral está transformado en una espina.

Algunas de estas características son consideradas como caracteres primitivos, pero existen algunas tales como la reducción de la osificación y la ausencia de dientes, al menos en el estado adulto, que son resultados de fenómenos de regresión.

Las poblaciones naturales de acipenseriformes han sufrido drásticas reducciones en los últimos años debidas principalmente al impacto antropogénico al que se encuentran sometidas. Actualmente la mayoría de las especies de este grupo de animales han sido declaradas especies en peligro de extinción y con necesidad de medidas de protección por la UICN (World conservation Union, 1996). Se han establecido medidas de control tales como la reducción en el número de capturas, la restauración de hábitats o la

inclusión de todas las especies en el catálogo CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna, 2005).

1.3. *Acipenser naccarii*, BONAPARTE 1836.

Las características propias de esta especie según Domezain (2003) son:

- Boca transversa, relativamente grande y ligeramente curva en los extremos; la anchura interna máxima de la boca no cabe dos veces entra esta y la punta del hocico.
- Hocico corto y con extremos redondeado. Su longitud no supera un tercio de la longitud del cuerpo.
- Labio inferior continuo con una acanaladura en el centro.
- 4 filas de escudetes:
 - Dorsales: entre 10 y 14 escudetes. Los de la parte frontal más pequeños y menos profundos que los de la zona media.
 - Laterales: el número varía de 32 a 42 en cada lado.
 - Ventrales: 8-11 escudetes a cada lado
- La aleta dorsal tiene entre 36 y 48 radios mientras que la anal varía de los 24 a los 31.
- La parte posterior del cuerpo es marrón-olivácea, los flancos más claros y la parte ventral blanquecina.

Los ejemplares adultos alcanzan un peso que va desde los 30 a los 80 kg, siendo las hembras de mayor tamaño aunque no existe un dimorfismo sexual evidente (Domezain, 2003). *Acipenser naccarii* es una especie migradora que se reproduce en agua dulce, utilizando el mar para su crecimiento. Se alimenta fundamentalmente de invertebrados bentónicos, aunque también consumen restos de animales, vegetales y semillas (Soriguer et al., 2002).

Diferentes estudios realizados en los últimos años (Garrido-Ramos et al., 1997; Hernando et al., 1999; Domezain, 2003) han sembrado controversia sobre la distribución exclusiva de *A. naccarii* en el Mar Adriático (Tortonese, 1989). Mediante el análisis de diferentes aspectos morfológicos y genéticos de varios ejemplares de

esturión obtenidos de diferentes museos europeos, Hernando et al. (1999) confirman la existencia de un área histórica de distribución para *A. naccarii* que va desde el Mar Adriático hasta el límite entre Portugal y Galicia pasando por toda la costa mediterránea europea. Esta especie ha sido citada por algunos autores en ríos de la Península Ibérica después de 1869 y existen datos de captura de animales en Niza. Con todos estos datos se puede asumir que *A. naccarii* fue una especie autóctona de la Península Ibérica en el pasado y que incluso podría haber sido una especie común en algunos ríos sureuropeos (Hernando et al., 1999).

Tras el estudio de diferentes familias de secuencias de ADN satélite pertenecientes a la familia Acipenseridae, Robles et al. (2004) afirmaron de forma concluyente que el esturión *Acipenser naccarii* es una especie autóctona de la Península Ibérica.

Las capturas anuales a finales del siglo XX han experimentado una dramática disminución en Italia, donde la especie aun está presente, pasándose de capturas alrededor de los 2000 kg/año en los años 70 a 50 kg/año en 1993, lo que arroja serias dudas sobre el estado de las poblaciones naturales.

Acipenser naccarii es una especie catalogada como en serio riesgo de extinción y está incluida entre la fauna estrictamente protegida de la Convención de Berna y su comercio internacional aparece restringido desde 1998. Los principales problemas de esta especie se deben a la degradación de hábitats y la pesca furtiva.

2. PROCESOS DIGESTIVOS EN PECES

La digestión es una combinación de procesos físicos, químicos y enzimáticos que comienza cuando el alimento entra por la boca y termina con la excreción de heces. Ocurren procesos físicos tales como la trituración y mezcla, procesos químicos como la secreción de ácido por el estómago para ayudar a la hidrólisis y rotura del alimento y procesos enzimáticos como la rotura específica de macromoléculas a moléculas de menor tamaño para permitir su absorción por la célula intestinal.

Los procesos físicos comienzan una vez que el alimento pasa al estómago e intestino donde los músculos de las paredes gástrica e intestinal mezclan el bolo alimenticio con la secreción de ácido y otros jugos digestivos. Los movimientos musculares pueden además ayudar a romper paredes celulares vegetales, quitina y otras partículas duras. Los movimientos peristálticos desplazan el bolo alimenticio a lo largo del digestivo.

En el estómago de los peces se produce una secreción de HCl por las células oxintopépticas. Éstas son productoras tanto de ácido clorhídrico como de pepsinógeno, a diferencia de mamíferos donde existe un tipo de célula para cada secreción. La secreción de ácido al estómago está sometida a control nervioso y hormonal (Wendelaar Bonga, 1993) y se produce cuando el alimento está presente.

El ácido desnatura proteínas y rompe carbohidratos, degrada estructuras celulares, emulsiona lípidos, y facilita la actuación de enzimas gástricas tales como pepsinas, lipasas y quitinasas, tanto por aumentar la superficie de actuación de las mismas como por el aumento de su actividad a pHs ácidos (Smith 1989; Chakrabarti et al. 1994).

En el intestino proximal se produce una secreción de bicarbonato producido por las células acinares del páncreas exocrino. Esta secreción tiene como finalidad neutralizar el pH del bolo procedente del estómago para facilitar la actuación de las enzimas digestivas en el intestino que poseen máximos de actividad a pHs básicos, a la vez de proteger al enterocito del pH ácido.

Mediante la actuación de enzimas digestivas, las proteínas se hidrolizan hasta aminoácidos libres o cadenas de pequeños péptidos, los carbohidratos se rompen hasta azúcares simples, y las grasas en ácidos grasos y glicerol mientras el alimento es transferido a lo largo del sistema digestivo.

A diferencia de otros vertebrados, la digestión enzimática en peces comienza en el estómago o en el intestino anterior en los peces sin estómago, puesto que el moco secretado en boca y faringe no contiene enzimas.

La función de los enzimas es romper los nutrientes del alimento en compuestos que puedan ser absorbidos por el enterocito.

Existen tres tipos de enzimas digestivas en peces, al igual que en otros vertebrados:

- Enzimas digestivas secretadas a la luz del tracto digestivo.
- Enzimas que actúan ligadas a las membranas de las microvellosidades. Todas ellas son de origen intestinal y tienen su marco de actuación cerca de los sistemas de transporte que aseguran la absorción de sus productos por parte del enterocito. Estas enzimas degradan fragmentos de macromoléculas filtradas por el glicocálix.
- Enzimas digestivas intracelulares localizadas en los lisosomas del enterocito.

El equipamiento de enzimas digestivas no es el mismo en todas las especies de peces, así la actividad quitinasa sólo está presente en algunas especies y la actividad pepsina no aparece en peces sin estómago. La actividad de las enzimas digestivas puede variar con la edad del pez, el estado fisiológico y la estación del año.

Cada enzima digestiva presenta un rango de temperatura de actividad óptima, fuera de ese rango de temperatura óptima hay una rápida y fuerte disminución de la actividad. Dentro del rango de temperatura óptima, la secreción y la actividad enzimática aumenta con el aumento de la temperatura. Las enzimas digestivas de peces pueden sufrir procesos de aclimatación a bajas temperaturas, haciendo que el máximo de actividad se desplace, respondiendo de forma más rápida al aumento de temperatura.

Principales enzimas intestinales de membrana en peces

Peptidasas	Dipeptil peptidasa IV Leucina aminopeptidasa Fenilalanina-glicina peptidasa γ -glutamyl-transferasa
Glucosidasas	α -glucosidasa (maltasa) Isomaltasa Quitobiasa
Lipasas	Esterasas Lipasa
Diversas	Fosfatasa ácida Fosfatasa alcalina
Nucleasas	

Principales enzimas secretadas en peces

	Enzimas	Actividad	Órgano	Especie
Proteasas	Pepsina	Hidrólisis de enlaces peptídicos internos	Estómago	Especies con estómago
	Tripsina Quimiotripsina Elastasa Colagenasa	Hidrólisis de enlaces peptídicos internos	Páncreas	Todas
	Carboxipeptidasas A y B	Hidrólisis de los enlaces peptídicos externos	Páncreas	Todas
Glucosidasas	Amilasa	Hidrólisis de almidón (enlaces α 1-4)	Páncreas	Todas
	Quitinasa	Hidrólisis de quitina	Estómago Páncreas	Especies consumidoras de insectos o crustáceos
Lipasas	Lipasa pancreática Colipasa	Hidrólisis de los triglicéridos (sobre todo posición α)	Páncreas	Todas las especies
	Esterasas	Hidrólisis de triglicéridos y otros lípidos		
Nucleasa	Ribonucleasa	Hidrólisis de ácidos nucleicos	Páncreas	(poco conocido)

2.1. PROTEASAS Y PEPTIDASAS

La digestión proteica ocurre de manera secuencial en la luz del tubo digestivo, donde las proteínas son hidrolizadas a polipéptidos por proteasas y los polipéptidos a aminoácidos libres por peptidasas. Algunos autores han puesto de manifiesto procesos de pinocitosis y digestión intracelular de proteínas en el intestino posterior de peces (Noaillac-Depeyre y Gas, 1978; Stroband y Van der Venn, 1981) así como absorción de péptidos directamente (Gaertner et al., 1989; Sarwar y Paquet, 1989).

Las proteasas y el ácido son responsables de la rotura de la estructura primaria a cuaternaria de las proteínas, mientras que las peptidasas degradan la estructura primaria y secundaria.

Las proteasas pueden ser endoproteasas, las cuales hidrolizan la cadena polipeptídica desde el interior de la misma o exoproteasas, que hidrolizan las cadenas peptídicas por los extremos.

Las proteasas pueden clasificarse además según su pH óptimo (ácido o neutro), el tejido de producción (gástrica, pancreática, de la mucosa intestinal, etc....) y el modo de digestión (intracelular, asociada a membrana, extracelular).

En general, las proteasas son secretadas en forma de zimógenos y por tanto no activas. La activación de las proenzimas ocurre por la rotura de un péptido que oculta el sitio activo. En el caso de la pepsina, la hidrólisis es autocatalítica y se inicia por la acción del HCl. En el caso de las proteasas pancreáticas, hay una activación previa del tripsinógeno por la enteroquinasa, tras la cual se desencadena una cadena de reacciones producidas por la tripsina sobre el quimiotripsinógeno, de modo que se activan sucesivamente elastasas, colagenasas, carboxipeptidasas, fosfolipasa y colipasas.

La pepsina es la enzima proteolítica más importante en el estómago de peces, es secretada por las células gástricas en forma de pepsinógeno. Para su activación se requiere medio ácido, aunque el pH óptimo varía con la especie. La pepsina es una endopeptidasa inespecífica que ataca a la mayoría de las proteínas, pero no a mucinas, queratinas ni péptidos de bajo peso molecular.

En peces agastros, la digestión proteica se lleva a cabo en el intestino proximal y ocurre a pHs neutro-básico. El aumento de la longitud intestinal suple la deficiencia de estómago.

El páncreas es el principal órgano secretor de proteasas. Sin embargo, otros órganos como hígado, mesenterio intestinal, vesícula biliar e incluso la bilis muestran, por sí mismos, una clara actividad proteolítica, puesto que el páncreas suele estar difuso en estos tejidos, parte o toda la actividad se debería a él.

Otras fuentes importantes de actividad proteolítica son el intestino y los ciegos pilóricos. La mayoría de los autores coinciden en que la actividad proteolítica, de la mezcla de enzimas pancreáticas con las intestinales, es mayor que la de cada una por

separado. Esto se debería a que la mucosa epitelial del intestino secreta enteroquinasa que activa las proenzimas o zimógenos secretados por el páncreas a la cavidad intestinal.

Las proteasas pancreáticas son vertidas a la cavidad intestinal en los periodos digestivos. Sin embargo, se pueden encontrar aminopeptidasas y dipeptidasas de la membrana de la mucosa intestinal, en periodos de alimentación y de ayuno. Estas enzimas, asociadas con el borde en cepillo de las microvellosidades del intestino medio, complementan a las enzimas pancreáticas en la hidrólisis de las proteínas y juegan un importante papel en la fase final de la digestión de la proteína.

Lugares de acción de las principales enzimas proteolíticas de peces

Enzima	Enlace hidrolizado
Pepsina	NH ₂ de los aminoácidos aromáticos y diácidos
Tripsina	COOH de la arginina o de la lisina
Quimiotripsina	COOH de los aminoácidos aromáticos
Elastasa	Aminoácidos alifáticos (más activo sobre elastina)
Carboxipeptidasas	Aminoácidos con COOH libre
Aminopeptidasas	Aminoácidos con NH ₂ libre
Di y tri-peptidasas	Enlaces de di y tri-péptidos

2.2. LIPASAS

Las lipasas son enzimas que llevan a cabo la hidrólisis extracelular de lípidos (Higgs y Dong, 2000). En algunas especies se ha detectado la presencia de una lipasa gástrica (Gisbert et al., 1999), pero en la mayoría de las especies, la digestión lipídica comienza a nivel del intestino anterior y ciegos pilóricos.

Las enzimas lipolíticas podrían clasificarse como lipasas o esterases. Las lipasas serían enzimas lipolíticas que actuarían preferencialmente degradando triglicéridos cuyos ácidos grasos son de larga cadena, mientras que las esterases actuarían sobre ésteres de ácidos grasos de bajo peso molecular.

Las lipasas para su actuación requieren de la presencia de colipasa. El papel de la colipasa es anclar la lipasa sobre los lípidos a degradar. Algunos trabajos han demostrado que la colipasa por su interacción con la lipasa descubre el sitio activo de esta última.

Los ácidos grasos de corta cadena (2-10 carbonos) y el glicerol son absorbidos directamente por el enterocito. Los ácidos grasos de cadena larga (más de 12 carbonos) sufren la actuación de la lipasa y sales biliares para formar micelas. Estas micelas se transportan a la membrana del enterocito donde se disocian y los ácidos grasos difunden a través de la membrana enterocítica. Una vez dentro de la célula, los ácidos grasos se reesterifican y se agrupan con proteínas para formar agregados llamados quilomicrones que permiten su transporte en sangre.

La actividad esterasa y lipasa depende de factores como la presencia de sustancias activadoras tales como sales biliares o la temperatura. La actividad lipasa en peces parece ser mayor que en mamíferos. Su acción depende de la presencia de las sales biliares, las cuales son detergentes que emulsionan los lípidos y facilitan la acción de las enzimas lipolíticas.

Enzima	Síntesis	Actuación	pH óptimo	Sustrato/acción
Lipasa pancreática	Páncreas	Intestino y ciegos pilóricos	Neutro	Múltiples lipasas activadas por sales biliares
Triacilglicerol lipasa	Estómago, páncreas y enterocito	Estómago, intestino y ciegos pilóricos	Ácido o neutro	Hidroliza ácidos grasos de las posiciones 1 y 3 de triglicéridos, a veces con colipasa
Monoglicérido lipasa	Enterocito	Intestino y ciegos pilóricos	Neutro	Elimina ácidos grasos de 2 monoglicéridos
Fosfolipasa	Páncreas	Intestino y ciegos pilóricos	Neutro	Hidroliza ácidos grasos de fosfolípidos

2.3. CARBOHIDRASAS

Las carbohidrasas son enzimas que llevan a cabo la hidrólisis de hidratos de carbono complejos. Actúan a nivel de intestino y ciegos pilóricos (Danulat, 1987; Sabapathy y

Leo, 1993; Moe y Place, 1999; Divakaran et al., 1999). El producto de su actuación son polisacáridos y monosacáridos, los cuales pueden ser asimilados más fácilmente.

Las plantas contienen carbohidratos mayoritariamente en forma de almidón y celulosa, mientras que en invertebrados, el principal carbohidrato es la quitina, la cual forma parte de su exoesqueleto.

La principal amilasa es la α 1-4 glucosidasa, que hidroliza los enlaces α 1-4 del glucógeno, pero no los enlaces α 1-6 responsables de las ramificaciones. La amilasa ataca internamente las cadenas lineales, hidrolizándolas en maltosa y dejando residuos de tamaño variable al nivel de las ramificaciones.

Las características de la amilasa difieren entre especies en lo que respecta a la temperatura y pH óptimo de actuación. Ello es debido a la existencia de una familia de enzimas que al parecer están codificadas por múltiples genes (Krogdahl et al. 2005) y en algunos casos existen dos isoformas (Yamada et al., 1991; Moreau et al., 2001). El rango de pH óptimo de actuación se encuentra entre 7 y 8. Se han secuenciado amilasas procedentes de diferentes especies de peces teleósteos y se ha podido observar que tienen características comunes con el resto de vertebrados

En peces se han detectado otras glucosidasas como la celulasa (β 1-4 glucosidasa), pero parece ser que es de origen exógeno, aportado por las bacterias que colonizan el digestivo de peces. Además, en peces consumidores de algas se ha podido constatar la presencia de laminariasa (β 1-3 glucosidasa). La laminariasa es un poliósido estructural con función análoga en algas a la de la celulosa en plantas terrestres.

En el digestivo de algunos peces, sobre todo peces que se alimentan de artrópodos, se ha detectado actividad quitinasa. La quitinasa es un enzima que hidroliza los enlaces β 1-4 N-acetil glucosamina de la quitina, originando dímeros de N-acetil glucosamina (quitobiosa).

Algunos autores han correlacionado la actividad quitinasa con los hábitos alimentarios, siendo más elevada en peces que se alimentan de crustáceos e insectos y sobre todo en aquellos que engullen las presas vivas.

Las carbohidrasas tienen un interés especial en peces puesto que no todos digieren los carbohidratos con la misma eficiencia. De este modo, los carnívoros digieren algunos carbohidratos, sobre todo el almidón, con menos eficiencia que omnívoros o herbívoros. La mayoría de los autores sugieren que en el pez carnívoro solo se secreta una limitada cantidad de amilasa y por tanto su actividad está restringida a digerir solo pequeñas concentraciones de almidón.

3. METABOLISMO INTERMEDIARIO

El metabolismo intermediario comprende todas las reacciones relacionadas con el almacén y la generación de energía metabólica y con el empleo de esa energía en la biosíntesis de compuestos de bajo peso molecular y compuestos de almacén de energía. Las vías metabólicas se suelen clasificar de acuerdo a su naturaleza anabólica (de degradación) o catabólica (de síntesis).

Las vías centrales del metabolismo son pocas en número y su organización está muy conservada. El metabolismo intermediario en peces difiere del de mamíferos en los mecanismos de control, en la sensibilidad a factores bióticos y abióticos y en el papel exacto que juegan los órganos y tejidos.

3.1. METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO

Los carbohidratos de la dieta no son el principal recurso de energía y carbono para la mayoría de los peces, puesto que los peces son primariamente carnívoros u omnívoros. No obstante, algunas especies de peces, muchas de ellas de interés en acuicultura, poseen hábitos herbívoros.

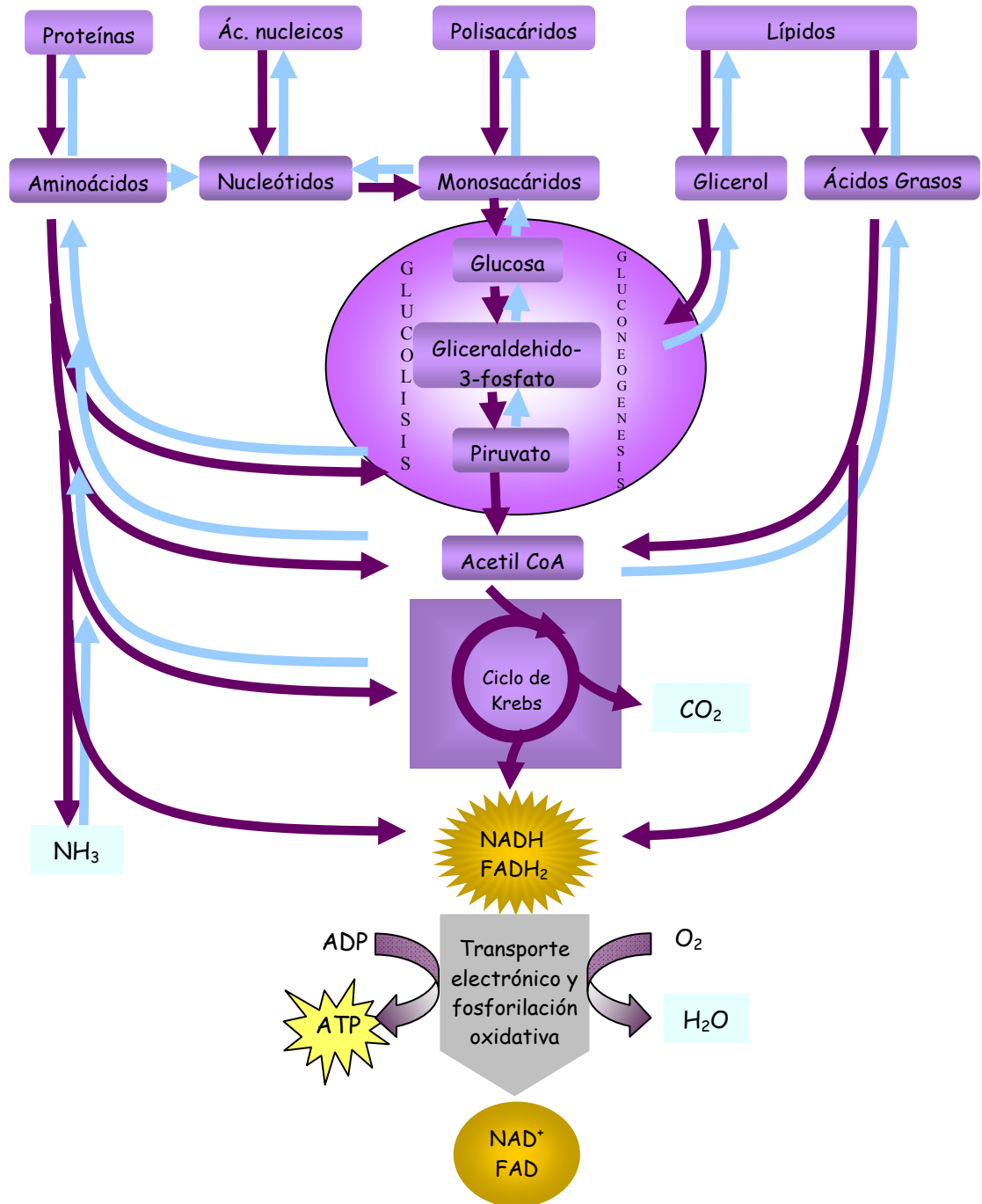


Figura 3. Visión general del metabolismo

3.1.1. Reserva de hidratos de carbono

El principal hidrato de carbono de reserva en peces es el glucógeno, el cual se deposita principalmente en hígado y en músculo. La enzima encargada de la glucogenolisis es la glucógeno fosforilasa.

De una manera general, el glucógeno es un sustrato energético poco utilizado en los tejidos de peces. La excepción viene marcada por su uso como combustible por el músculo blanco en situaciones de estrés como condiciones de hipoxia o de ejercicio prolongado, con producción de lactato.

A nivel hepático, el contenido en glucógeno y su movilización depende del estado nutricional del animal. A diferencia de mamíferos, donde condiciones de ayuno conducen a la glucogenolisis para mantener los niveles de glucosa sanguínea constantes, en peces, tales como el bacalao, la carpa y el rutilo, si las reservas de lípidos hepáticos son altas, son éstos los primeros utilizados durante el ayuno (Black y Love, 1986; Lim y Ip, 1989; Blasco et al., 1992; Méndez y Wieser, 1993; Böhm et al., 1994).

Tras largos periodos de ayuno en el medio natural, como situaciones de migraciones, las reservas de glucógeno disminuyen poco. Aún así, raramente se observa una hipoglucemia en peces ayunados, como consecuencia de una disminución de la actividad metabólica general y también por una activación de la gluconeogénesis a partir del catabolismo de aminoácidos.

3.1.2. Metabolismo hepático de hidratos de carbono

3.1.2.1. Glucólisis

La glucólisis es la vía principal del catabolismo de la glucosa. Mediante la actuación de las enzimas que componen esta vía, la glucosa va a sufrir oxidaciones graduales hasta su transformación en piruvato y producción de ATP. La glucosa hepática procede de la degradación del glucógeno hepático por acción de la glucógeno fosforilasa ó de la internalización de la glucosa sanguínea.

El primer paso consiste en la fosforilación de la glucosa por la hexoquinasa (HK) y por la fosfofructoquinasa (PFK). A continuación la molécula de 6 carbonos va a escindirse en dos moléculas de triosa, las cuales mediante dos procesos de fosforilación a nivel de sustrato llevados a cabo por las enzimas fosfoglicerato quinasa y piruvato quinasa (PK) van a generar dos moléculas de ATP obtenidas en ausencia de oxígeno. Durante la oxidación de la glucosa, el NAD^+ es reducido a NADH. Puesto que la concentración de NAD^+ no es muy elevada, se requiere una regeneración del mismo para que la glucólisis continúe. En el músculo es regenerado por acción de la lactato deshidrogenasa (LDH) en condiciones anaeróbicas, pero a nivel hepático el balance redox se mantiene por acción de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

3.1.2.2. *Vía de las pentosas fosfato*

Esta vía metabólica comienza a nivel de la glucosa 6 fosfato. Su papel fisiológico principal es la producción de NADPH necesario para procesos biosintéticos, fundamentalmente de ácidos grasos insaturados y esteroides. Además genera ribosa, necesaria para la síntesis de nucleótidos. Además de su papel reductor en la biosíntesis de moléculas, el NADPH proporciona protección celular frente a radicales libres.

3.1.2.3. *Ciclo de Krebs y Fosforilación oxidativa*

El piruvato procedente de la glicólisis es oxidado completamente en la mitocondria hasta CO_2 y H_2O por la acción de las enzimas que constituyen el ciclo de Krebs. El piruvato es convertido primero en acetyl-CoA por acción de la piruvato deshidrogenasa (PDH). La citrato sintasa es la enzima encargada de introducir en el ciclo el acetyl-CoA condensándolo con oxalacetato para originar citrato. De manera esencial, los 2 carbonos del acetyl-CoA son liberados como CO_2 , mientras que el compuesto de 6 carbonos formado al comienzo del ciclo es oxidado con la liberación de 3 NADH, 1 FADH, y 1 GTP por acetyl-CoA que entra en el ciclo. Los cofactores reducidos ceden sus electrones a la cadena de transporte electrónico localizada en la membrana interna mitocondrial. Se establece un gradiente eléctrico y de protones entre la matriz mitocondrial y la membrana interna mitocondrial. Gracias al gradiente electroquímico y a la actividad de

una ATPasa se genera ATP. La eficiencia del proceso es de 36 moléculas de ATP por molécula de glucosa oxidada.

3.1.2.4. Síntesis de glucógeno y gluconeogénesis

El glucógeno hepático se sintetiza a partir de la glucosa incorporada desde la sangre. La incorporación de la glucosa a glucógeno es llevada a cabo por la glucógeno sintasa vía producción de UDP glucosa a partir de la glucosa 1 fosfato.

La síntesis de novo de glucosa a partir de aminoácidos gluconeogénicos y malato es llevada a cabo en parte siguiendo las reacciones reversibles de la glucólisis. Existen tres reacciones irreversibles catalizadas por la hexoquinasa (HK), fosfofructoquinasa (PFK) y la piruvato quinasa (PK) en la glucólisis que requieren enzimas específicas para llevarlas a cabo.

La transformación de piruvato a fosfoenolpiruvato requiere la presencia de dos enzimas: la piruvato carboxilasa (PC) y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK).

La PC cataliza la conversión del piruvato en oxalacetato con la utilización de una molécula de ATP. Esta reacción tiene lugar en la mitocondria y es una reacción anaplerótica que mantiene los intermediarios del ciclo de Krebs. Para que se dé con fines gluconeogénicos, el oxalacetato tiene que salir de la mitocondria, lo cual se realiza por la interconversión del oxalacetato en malato y viceversa por actuación de la malato deshidrogenasa (MDH) mitocondrial y citosólica.

La PEPCK origina fosfoenolpiruvato a partir de oxalacetato con la utilización de una molécula de GTP.

La segunda reacción irreversible es salvada por la actuación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) que cataliza la transformación de fructosa-1,6-bisfosfato en fructosa 6-fosfato.

La fructosa 6-fosfato es transformada en glucosa 6-fosfato por acción del enzima glucosa-6-fosfatasa.

Los principales órganos implicados en la gluconeogénesis son el hígado y el riñón. En la mayoría de los teleósteos (carpa, trucha, pez gato, lubina) los aminoácidos preferenciales para la formación de glucosa son la alanina, serina y glicina. La gluconeogénesis a partir de aminoácidos procedentes de la degradación de proteínas corporales en peces es elevada. Con el aumento del contenido en proteínas en la dieta incrementan las actividades de enzimas gluconeogénicas y disminuyen las ligadas a la glicólisis.

3.1.2.5. Mecanismos de control hormonal

Las principales hormonas estimuladoras de la liberación de glucosa desde glucógeno con las catecolaminas, el glucagon, péptidos similares al glucagon y los glucocorticoides; mientras que la insulina y los factores de crecimiento similares a la insulina son las principales hormonas estimuladoras de la producción de glucógeno. El glucagon y el cortisol además pueden estimular la gluconeogénesis hepática desde aminoácidos.

La incorporación de glucosa al glucógeno está influenciada por las actividades relativas de las enzimas glucógeno fosforilasa y glucógeno sintetasa. Experimentos llevados a cabo con hepatocitos de trucha incubados con insulina mostraron una disminución de la actividad glucógeno fosforilasa, mientras que la actividad glucógeno sintetasa no incrementó. Sin embargo, cuando existen altos niveles de glucosa en el medio de incubación incrementa la actividad glucógeno sintetasa.

3.1.2.6. Regulación de la glucosa sanguínea

La capacidad para tolerar fluctuaciones en los niveles de glucosa sanguínea es la principal diferencia entre peces y mamíferos. Los peces pueden sobrevivir en situaciones en las que no se ha detectado niveles de glucosa en sangre, ya sea por condiciones naturales o experimentales (Mommensen y Plisetskaya, 1991). Sin embargo, bajo condiciones fisiológicas, los peces mantienen sus niveles estables y son capaces de responder a estímulos hormonales. Así el suministro de cortisol, catecolaminas y

glucagon producen un incremento en la glucosa sanguínea y ésta disminuye por administración de insulina.

Puesto que las células sanguíneas de peces poseen núcleo y mitocondrias presentan rutas glucolíticas y ciclo de Krebs (Sephton et al., 1991; Ferguson y Storey, 1991)

3.1.3. Metabolismo muscular de hidratos de carbono

Los peces presentan dos tipos de fibras musculares claramente diferenciadas: las fibras oxidativas o músculo rojo situadas a nivel superficial y que llevan a cabo un metabolismo aerobio y las fibras glucolíticas o músculo blanco, las cuáles ocupan la mayor parte de la musculatura y llevan a cabo la glicólisis anaerobia puesto que el aporte de oxígeno está limitado.

Aunque en el músculo se siguen las mismas vías metabólicas que a nivel hepático, la regulación es diferente. El metabolismo de carbohidratos en el músculo tiene como objetivo la producción de ATP para llevar a cabo la contracción muscular, la síntesis proteica o el transporte iónico y no la generación de intermediarios biosintéticos como ocurre a nivel hepático.

El músculo blanco, ante una situación de ejercicio repentino (situaciones de huida, caza, natación a contracorriente, etc.) obtiene el ATP necesario para la contracción muscular de la fosfocreatina. Cuando los niveles de fosfocreatina disminuyen comienza la glicólisis anaerobia para producir ATP (Dobson et al., 1987). Esta vía metabólica conlleva la disminución de las reservas de glucógeno muscular y lo conduce a la formación de lactato. La acumulación de lactato produce la acidificación intracelular.

La recuperación de los peces tras un ejercicio intenso requiere la corrección del equilibrio ácido-base y la restauración de las reservas de glucógeno muscular. Puesto que el músculo blanco está poco vascularizado, parece ser que el ciclo de Cori no existe en peces, por lo que la regeneración de glucógeno a partir del lactato tiene lugar in situ. Algunos autores han sugerido la existencia en peces de la reacción inversa de la PK (Moyes et al., 1992; Schulte et al., 1992). Por otro lado, en las fibras musculares oxidativas de truchas agotadas, el 50% de la recuperación del glucógeno puede ocurrir a

partir de la glucosa sanguínea, por lo que ha sido sugerido que estarían implicados en su regeneración tanto el ciclo de Cori como la glucogénesis a partir de lactato (West et al., 1994). Además, en un estudio con lampreas (*Lamprea fluviatilis*) Zavina y Woitczak (1977) constataron una alta capacidad gluconeogénica a partir de glicerol en el músculo blanco de esta especie, lo que podría jugar un papel importante en la recuperación del glucógeno en este tejido durante el periodo de migración.

Las fibras musculares oxidativas o músculo rojo tienen mucho en común con el músculo cardíaco. El músculo rojo va a soportar la natación continua y prolongada. Como combustible para su actividad se utilizan las reservas lipídicas musculares de manera preferencial.

3.2. METABOLISMO PROTEICO

Las proteínas corporales sufren procesos continuos de síntesis y degradación. Los aminoácidos (aa) pueden encontrarse en su forma libre o formando parte de cadenas peptídicas. Los aminoácidos libres pueden proceder de la absorción intestinal de proteínas, de interconversiones o síntesis *de novo* o de la degradación de proteínas corporales. Así mismo, pueden ser utilizados en procesos como la síntesis de proteínas corporales o de compuestos nitrogenados como ácidos nucleicos, péptidos, hormonas, etc., fuente de carbono en el metabolismo intermediario o ser catabolizados con fines energéticos.

El metabolismo proteico en peces se va a caracterizar por:

- Escasa síntesis proteica en el músculo blanco.
- Poca participación del conjunto de proteínas corporales en el *pool* de aminoácidos libres.
- Importancia del catabolismo directo por vía oxidativa de los aminoácidos absorbidos.
- Excreción de productos nitrogenados en forma amoniacal

En peces, existe una mayor dependencia a nivel metabólico de las proteínas aportadas por la dieta que en vertebrados superiores.

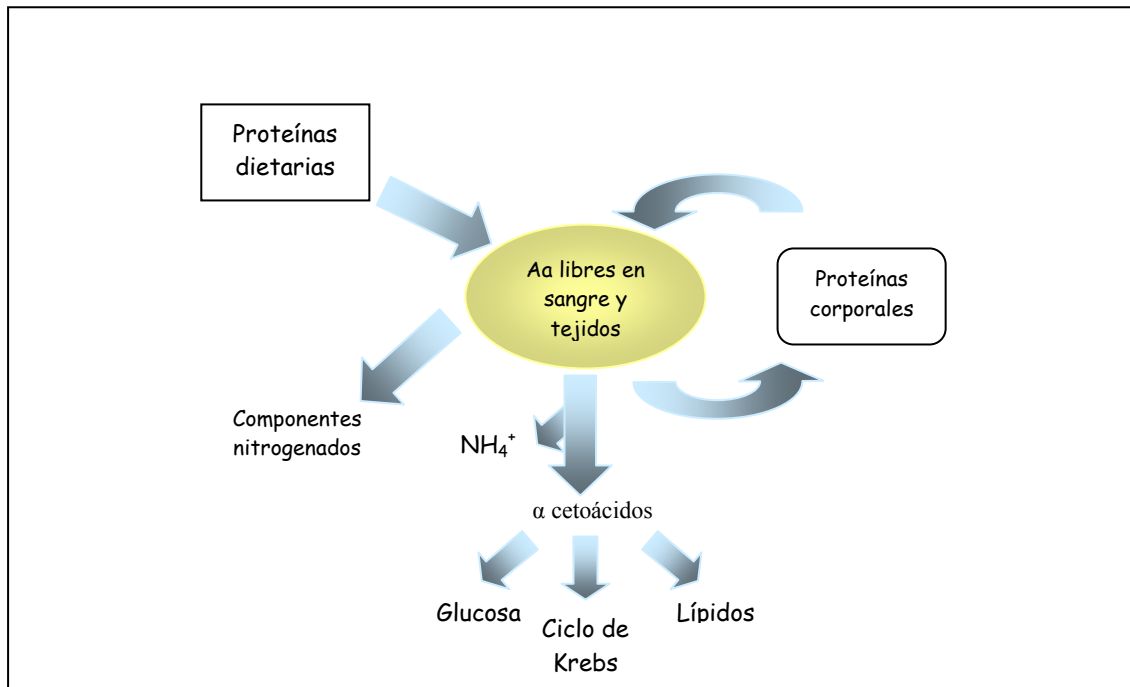


Figura 4. Visión general del metabolismo proteico

3.2.1. Síntesis de aminoácidos y proteínas

Al igual que en el resto de vertebrados, los peces presentan cierta esenciabilidad con respecto a algunos aminoácidos. Este carácter esencial requiere que los aminoácidos esenciales tengan que ser aportados por la dieta, puesto que los peces carecen de transaminasas que puedan sintetizarlos a partir de algún metabolito intermediario.

La tasa de síntesis proteica va a variar en función del tejido considerado. En peces, la mayor tasa de síntesis es alcanzada por el hígado, seguida de branquias, tubo digestivo, músculo rojo y músculo blanco.

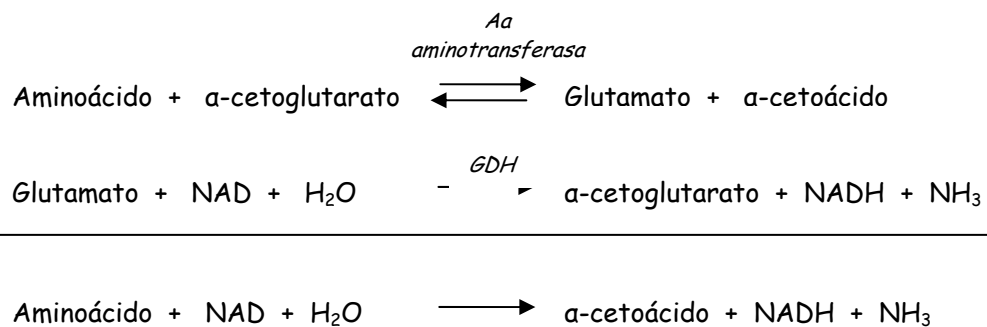
A diferencia de mamíferos, el músculo blanco de peces va a retener la mayor parte de las proteínas sintetizadas, lo cual está relacionado con el tipo de crecimiento muscular, el cual ocurre por incorporación de nuevas fibras (hiperplasia) y no por hipertrofia como ocurre en vertebrados superiores. Teniendo en cuenta las proporciones relativas del tamaño corporal, la retención proteica a nivel hepático supondría menos del 2%, frente al 60% para el músculo blanco.

Para la síntesis proteica, el alimento constituye una fuente de aminoácidos superior a la degradación de las proteínas corporales, por lo que para la renovación de las proteínas corporales, los peces son más dependientes del suministro de aminoácidos dietarios que los vertebrados superiores.

3.2.2. Catabolismo de aminoácidos y proteínas

En los peces, la fuente preferencial de energía en condiciones aerobias sería la oxidación de aminoácidos y no de glucosa. Durante el catabolismo, aunque el esqueleto carbonado del aminoácido puede ser usado para la síntesis de otros compuestos nitrogenados, son oxidados mayoritariamente en el ciclo de Krebs. Los aminoácidos pueden entrar en distintas etapas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La capacidad oxidativa más elevada de aminoácidos se da en aquellos tejidos más ricos en mitocondrias, tales como hígado, branquias y músculo rojo.

El primer paso en el catabolismo de aminoácidos consiste en una reacción de transaminación que tiene lugar en el citoplasma celular, donde el grupo amino es transferido al α -cetoglutarato para originar glutamato. Las transaminasas más importantes son la alanina aminotransferasa (GPT) y la aspartato aminotransferasa (GOT). El glutamato obtenido va a regenerar el α -cetoglutarato liberando ión amonio por acción de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) de origen mitocondrial. La GDH se encuentra en mayor concentración en el hígado de peces que en el de vertebrados superiores, teniendo por tanto una gran importancia en la oxidación de aminoácidos.



3.2.3. Excreción

La gran mayoría de los peces son amoniotélicos, excretan los productos de desecho del metabolismo nitrogenado en forma amoniaca. El amoniaco es muy tóxico, pero a pHs fisiológicos se encuentra en forma de ión amonio. La excreción de amonio al medio externo va a llevarse a cabo a través de las branquias (75%) y de la orina (25%).

Los teleósteos poseen el conjunto de enzimas que integran el ciclo de la urea, pero salvo excepciones, éste no es funcional. De manera general, existe una cierta excreción de urea (5-20%), pero ésta procede del catabolismo de purinas y arginina y no del de las proteínas.

3.3. METABOLISMO LIPÍDICO

Tanto los lípidos ingeridos en la dieta, los cuales llegan al hígado vía linfática o portal en forma de quilomicrones, como los lípidos sintetizados de novo en este órgano se acoplan a apoproteínas y a colesterol libre y esterificado para formar las lipoproteínas plasmáticas VLDL, LDL y HDL. Del 5 al 10% de los lípidos son transportados en forma de ácidos grasos libres o acoplados a la albúmina. En la mayoría de los peces, el contenido lipídico en el plasma es muy elevado.

Los procesos de conversión y catabolismo de lipoproteínas son muy similares a los de mamíferos, siendo éstas atacadas a nivel intravascular por las enzimas lipoprotein lipasa localizada en plasma, hígado, músculo, corazón, ovarios y tejido adiposo de la trucha, una lipasa resistente a la salinidad encontrada en hígado pero también en tejidos extrahepáticos y la lecitina-colesterol acil transferasa con una actividad elevada en plasma.

Los principales lípidos encontrados en peces son los fosfolípidos como componentes de las membranas celulares y los triglicéridos, los cuales constituyen los lípidos de reserva. Los triglicéridos son resintetizados en los tejidos a partir de ácidos grasos circulantes liberados por acción de las lipasas. A diferencia de mamíferos, en peces, la acumulación de triglicéridos ocurre en varios tejidos como el hígado, tejido adiposo perivisceral,

músculo o en el tejido subcutáneo. En cuanto a la composición de los lípidos, los peces difieren de vertebrados superiores porque contienen siempre un porcentaje elevado de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (HUFA).

3.3.1. Síntesis endógena y bioconversión de ácidos grasos

La síntesis de ácidos grasos tiene lugar principalmente a nivel hepático y requiere la participación del complejo ácido graso sintetasa. Los ácidos grasos sintetizados de novo son los ácidos grasos saturados palmitato, estearato y miristato de 16, 18 y 14 carbonos respectivamente. Los peces, al igual que el resto de vertebrados, no pueden sintetizar de novo los ácidos linoleico (C18:2 n6) y linolénico (C18:3 n3), por lo que éstos y sus derivados poseen carácter esencial y tienen que ser aportados por la dieta.

Tanto los ácidos grasos neosintetizados como los aportados por la dieta pueden sufrir la acción de desaturasas y elongasas a distintos niveles de la cadena hidrocarbonada.

3.3.2. Catabolismo de lípidos

La degradación de los lípidos en peces se produce prácticamente en todos los tejidos. Los ácidos grasos productos de la degradación de los triglicéridos por acción de la lipasa tienen que ser transportados a la mitocondria para su oxidación. La entrada a éste orgánulo se produce por acción de la acil-carnitina transferasa. Una vez en la matriz mitocondrial van a ser degradados por ciclos sucesivos de β -oxidación originando moléculas de acetil-CoA que entra a formar parte del ciclo de Krebs para la obtención de energía.

4. EL ESTRÉS OXIDATIVO

La dependencia del oxígeno de la vida aerobia, trae consigo la formación de especies reactivas del oxígeno que pueden ocasionar daños en las moléculas biológicas. Por este motivo, los organismos aeróbicos a lo largo de su evolución han desarrollado mecanismos defensivos frente a estos compuestos tóxicos derivados del oxígeno.

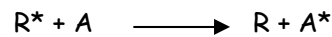
El estrés oxidativo, es una situación en la cual los agentes oxidantes superan a los mecanismos antioxidantes (Sies, 1986). Las condiciones en las cuales la tasa de generación de radicales de oxígeno superan a la de descomposición de éstos, pueden estar influenciadas por múltiples factores tales como el contacto con xenobióticos y agentes contaminantes, factores nutricionales y ambientales. Así mismo, situaciones de estrés clásico producen alteraciones en los mecanismos de respuesta antioxidante (Davies, 2000; George et al., 2000; Martínez-Álvarez et al., 2002), promoviendo la activación de vías catabólicas con fines energéticos lo que produciría un aumento de la tasa metabólica y de la producción de radicales libres, desembocando en último término en un desequilibrio de los sistemas antioxidantes (Ross et al., 2001; Guerriero et al., 2002).



4.1 RADICALES LIBRES

Los radicales libres podrían definirse como especies químicas (moléculas o átomos), capaces de existir de forma independiente, que contiene uno o más electrones desapareados en su último orbital electrónico (Halliwell et al., 1992; Cheeseman et al.,

1993). Su carga puede ser positiva, negativa o neutra. La existencia de electrones desapareados le proporciona una gran reactividad puesto que tienden a ganar o ceder electrones para alcanzar configuraciones más estables, lo que determina que tengan una vida media muy corta. La presencia de radicales libres genera una cadena de reacciones de transferencia de electrones con moléculas vecinas que a su vez se convierten en radicales libres. Sólo en el caso de la unión de dos radicales libres desaparecerá su actividad como tal.

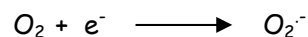


Junto a los radicales libres existen otra serie de moléculas que, si bien no presentan electrones desapareados, son muy reactivas y pueden llegar a favorecer la aparición de radicales libres en determinadas circunstancias.

Las moléculas reactivas derivadas del oxígeno son las conocidas como especies de oxígeno reactivo (*ROS*: reactive oxygen species) y entre ellas podríamos destacar las siguientes:

Radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$)

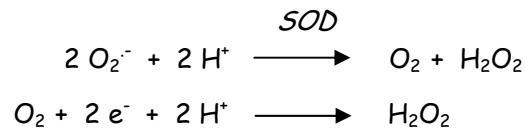
Se trata de un radical libre cargado formado como consecuencia de una reducción monovalente o monoeléctrica del oxígeno molecular O_2 .



Aunque se trata de una especie menos reactiva que otros radicales, participa en numerosos procesos citotóxicos (Fridovich, 1976; McCord, 1979). Su principal efecto sería el de actuar como fuente de peróxido de hidrógeno u otros radicales libres y como reductor de iones metálicos de transición (Cheeseman y Slater, 1993)

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Se origina por una reacción de dismutación del anión superóxido por la actuación del enzima superóxido dismutasa (SOD) o directamente a través de la reducción bivalente del oxígeno.



Su actividad química es limitada. Aunque no es un radical libre en sentido estricto, puesto que no presenta electrones desapareados, su importancia se debe a su capacidad para atravesar las membranas biológicas e intervenir en reacciones de síntesis de otros radicales debido a la debilidad de su enlace entre los átomos de oxígeno.

Radical hidroxilo (OH)

Es un radical muy reactivo, presenta un electrón desapareado lo que le confiere la capacidad de captar electrones de otras moléculas. Su principal fuente de producción es a partir del peróxido de hidrógeno con la intervención de una serie de agentes donadores de electrones. Este radical es el principal responsable directo de la oxidación de biomoléculas.

Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)

En esta molécula, los dos electrones desapareados del oxígeno, se disponen en un mismo orbital, estableciendo una configuración antiparalela ($\uparrow\downarrow$). No se trata exactamente de un radical libre, pero su capacidad para captar dos electrones antiparalelos le confiere un carácter oxidante y una gran reactividad.

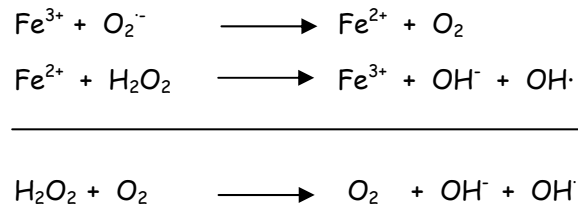
Ácido hipocloroso / ión hipoclorito (OHCl / OCl)

No puede considerarse un radical libre en sí, pero se trata de moléculas con alta capacidad de producción e interacción con otros radicales libres así como con capacidad para oxidar otras moléculas.

4.2. METALES DE TRANSICIÓN

Debido a su capacidad para ceder electrones a otras moléculas, los metales de transición juegan un papel importante en procesos de oxido-reducción, los cuales originaran radicales libres.

Los metales que participan en la producción de radicales libres son fundamentalmente el cobre y el hierro. El hierro en su estado ferroso participa en la conocida como reacción de Fenton en la que se originan radicales hidroxilo al reaccionar con el peróxido de hidrógeno. Por otro lado, el ión superóxido facilita la acumulación del hierro en su estado ferroso. Ambas reacciones en su conjunto dan lugar a la reacción de Haber-Weiss (Halliwell y Gutteridge, 2000):



4.3. ORIGEN DE LOS RADICALES LIBRES

La aparición de especies de oxígeno reactivo se asocia a diversas reacciones (Beckman y Ames, 1998; Halliwell y Gutteridge, 2000):

1. Reacciones electromagnéticas o fotoquímicas que pueden dar lugar a $\cdot\text{OH}$ y $^1\text{O}_2$
2. Reacciones endógenas de dismutación (H_2O_2) y Fenton ($\cdot\text{OH}$).
3. Reacciones enzimáticas como las catalizadas por la xantina oxidasa ($\text{O}_2^{\cdot -}$) y la urato oxidasa (H_2O_2) que intervienen en las vías de degradación de purinas, o la acil-CoA oxidasa (H_2O_2), asociada a la β -oxidación peroxisomal.
4. Reacciones asociadas a la actividad de células fagocíticas que generan $\text{O}_2^{\cdot -}$ por la acción de la NADPH oxidasa con intervención del NADPH.
5. En el proceso de unión del O_2 a la hemoglobina se forma el intermediario oxihemoglobina que en ocasiones puede liberar $\text{O}_2^{\cdot -}$ quedando la hemoglobina como metahemoglobina en estado no funcional reversible.

6. La cadena de transporte electrónico mitocondrial es la principal fuente de radicales libres generados de forma accidental bajo condiciones fisiológicas normales. La cadena de transporte electrónico es un proceso destinado a la obtención de energía a partir de coenzimas reducidos (NADH, FADH₂) que culmina con la oxidación tetravalente del oxígeno para generar dos moléculas de agua por acción de la citocromo C oxidasa. El 90-95% del oxígeno que llega a la cadena de transporte electrónico mitocondrial sufre la reducción tetravalente hasta originar agua sin la producción de radicales libres, mientras que el 5-10% del oxígeno sufre una reducción monovalente por electrones procedentes de los transportadores de la cadena que escapan al control de la misma (Borevis y Chance, 1973). El principal radical libre originado es el ión superóxido, el cual posteriormente por reacciones de dismutación puede formar peróxido de hidrógeno.
7. La cadena de transporte electrónico nuclear es más nociva debido a su proximidad al material genético.
8. El citocromo P450 es un sistema localizado en el retículo endoplásmico que tiene como objetivo la detoxificación de compuestos tales como xenobióticos, medicamentos, etanol, etc., mediante reacciones de oxidación utilizando O₂ con la subsiguiente generación de radicales libres.

4.4. DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Los organismos disponen de una serie de mecanismos para hacer frente a los efectos nocivos derivados de la generación de radicales libres. Estos mecanismos antioxidantes engloban tanto a enzimas como a moléculas pequeñas, las cuales pueden ser de naturaleza hidrosoluble o liposoluble (Romero et al., 1989; Peña de la A et al., 1997). Entre los mecanismos de actuación de las defensas antioxidantes se encuentra la supresión de la generación de radicales, la neutralización de éstos o la reparación de los daños producidos.

4.4.1. Moléculas antioxidantes

Existen muchas moléculas que ejercen un papel protector frente a la oxidación (López-Torres, 1993; Felton, 1995; Liebler y Reed, 1997; Halliwell y Gutteridge, 2000), pudiendo clasificarse como moléculas hidrosolubles o liposolubles.

Moléculas antioxidantes hidrosolubles

Glutation (GSH)

Es un tripéptido formado por glutamina, cisteína y glicina con alta capacidad para pasar de forma oxidada (GSH) a reducida (GSSG) evitando así que esto ocurra con moléculas más importantes. Además es sustrato de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa y la dehidroascorbato reductasa. Es una molécula fundamental como protectora de los glóbulos rojos mediante la regulación del grado de deformidad de sus membranas (Kurata et al., 1994) así como en la generación directa de la vitamina C (Hamre et al., 1997).

Ácido úrico

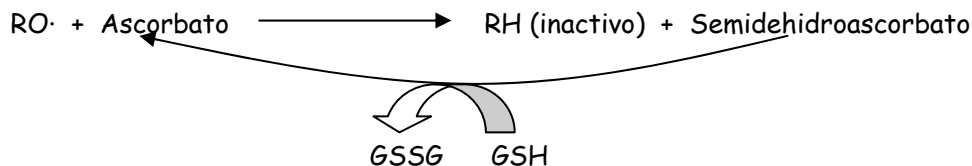
Es producto de la oxidación de hipoxantina y xantina por acción de la xantina oxidasa y xantina deshidrogenasa (XOD y XDH). Capta especies de oxígeno reactivo del tipo $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, $\text{RO}_2\cdot$ (peroxilo) y HOCl , originando productos menos tóxicos.

Proteínas captadoras de iones metálicos

Entre estas proteínas cabría destacar las captadoras de iones hierro como la ferritina o transferrina; la ceruloplasmina, albúmina e histidina captadoras de iones cobre y las metalotioneínas, catecolaminas y glucagon, asociadas al mantenimiento de la homeostasis del cobre y cinc, la detoxificación de metales no esenciales como cadmio y mercurio, y la captación de $\cdot\text{OH}$ y $^1\text{O}_2$

Vitamina C o ácido ascórbico

El ácido ascórbico tiene la capacidad de poder sufrir dos procesos oxidativos monovalentes consecutivos con la formación del radical semihidroascorbato. Actúa como reductor de moléculas como $\cdot\text{OH}$, $\text{HO}_2\cdot$ y $\text{O}_2\cdot^-$. La enzima dehidroascorbato reductasa es la encargada de recuperar el ácido ascórbico con la ayuda del glutatión.



La vitamina C también puede tener, en algunos casos un papel prooxidante, puesto que reduce el férrico a ferroso, el cual por la reacción de Fenton, puede estimular la formación de $\cdot\text{OH}$ en presencia de H_2O_2 (Woodward, 1994).

Moléculas antioxidantes liposolubles

Ubiquinonas y β -carotenos

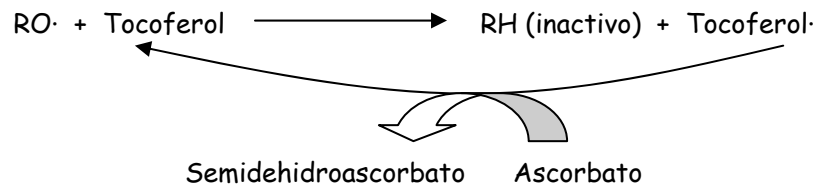
La ubiquinona o coenzima Q (UQ), además del papel que ejerce como componente de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, en su forma reducida actúa como un importante antioxidante en las membranas (Cadenas, 1995).

Los β -carotenos son derivados del ácido retinoico o vitamina A, los cuales reaccionan con los radicales peroxilo y alcoxilo interrumpiendo los procesos de peroxidación lipídica y quelan al oxígeno singlete (Halliwell y Gutteridge, 2000)

Vitamina E o tocoferol

Su estructura química es la de un compuesto constituido por un grupo hidroxicromona al que se le une una cadena de fitilo. Se conocen al menos ocho formas isoméricas, que pueden dividirse en dos grupos diferenciados en la saturación o no de su cadena de fitilo. El α -tocoferol es el más activo biológicamente. Destaca su capacidad para la

eliminación del oxígeno singlete, entre otros radicales del oxígeno. Su papel evitando la propagación de la peroxidación lipídica es altamente conocida. A este respecto, ya en cultivos celulares de carpa, se demostró que la presencia de vitamina E en el medio ejercía un papel protector frente a determinados compuestos químicos oxidantes (George et al., 2000).



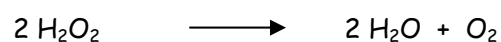
Existe un efecto sinérgico entre el tocoferol y el ácido ascórbico, puesto que este último interviene en la regeneración del tocoferol oxidado (Halliwell y Gutteridge, 2000). Experimentos llevados a cabo con esturiones (Moureau, 1999) y seriola (Ito et al., 1999) mostraron que carencias de vitamina C provocaban una acumulación de radicales de vitamina E que podrían ejercer un efecto prooxidante.

4.4.2. Enzimas antioxidantes

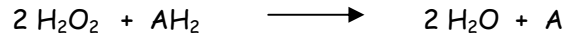
Catalasa

Se trata de una enzima ferriporfirínica, localizada principalmente en peroxisomas. Esta compuesta por cuatro subunidades cada una de ellas con un grupo hemo en su centro activo. Esta enzima ejerce una doble acción:

1. Actividad catalítica:



2. Actividad peroxidásica: produciendo la oxidación de compuestos reducidos tales como metanol, etanol, ácido fórmico y fenoles. Tiene lugar a pHs básicos.



El que predomine una u otra actividad va a depender de la concentración de compuestos reducidos en el sistema y de la concentración o producción de peróxido de hidrógeno (Aebi, 1984). La descomposición del H_2O_2 por parte de la catalasa es bastante rápida, sin embargo, su afinidad es muy baja, por lo que se requiere altas concentraciones para su descomposición.

Esta enzima esta presente en casi todos los tejidos animales, siendo especialmente abundante en hígado y eritrocitos. La actividad catalasa se inhibe principalmente por cianuro, azida y aminotriazol.

Glutation peroxidasa

La glutacion peroxidasa (GPX) cataliza la oxidación del glutacion reducido a expensas del H_2O_2 . Se ha constatado su papel en la captación de peróxidos lipídicos de membrana en experimentos realizados con extractos hepáticos de trucha arco iris (Nakano et al., 1999)

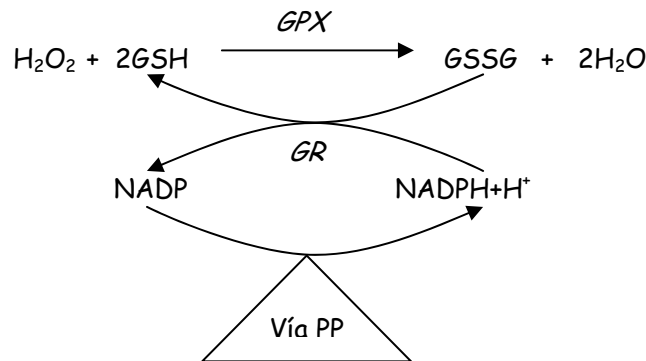
Existen dos grupos de glutacion peroxidasas: las selenio-dependientes y las selenio-independientes.

Las selenio-dependientes se caracterizan por ser tetramérica y contener selenio en su centro activo. Se localizan primordialmente en citosol y en menor cantidad en mitocondrias.

Las selenio-independientes no requieren selenio para su actividad catalítica presentando una menor afinidad por el H_2O_2 . Se localizan en citosol, mitocondrias y fracciones celulares que contengan membrana.

Es una enzima presente en todos los tejidos, con gran actividad hepática.

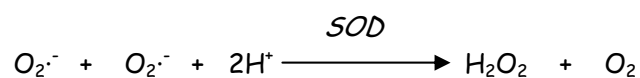
La regeneración del glutatión reducido es llevada a cabo por la enzima glutatión reductasa (GR) a expensas del poder reductor aportado por el NADPH procedente de la vía de las pentosas fosfato.



Ante la cuestión de cual de las dos enzimas, catalasa o glutatión peroxidasa tiene un mayor efecto antioxidante, hay que decir que la actuación de ambas está relacionada con la ubicación celular de cada una de ellas. De este modo, la catalasa degradaría el H_2O_2 producido en los peroxisomas mientras que la glutatión peroxidasa degradaría el producido en citosol, mitocondrias y retículo endoplásmico. De hecho, variaciones de H_2O_2 en peroxisomas no provocaban cambios de actividad en la glutatión peroxidasa. En eritrocitos de mamíferos, carentes de compartimentos intracelulares, la glutatión peroxidasa haría frente a niveles bajos de H_2O_2 mientras que la catalasa cobraría más importancia en caso de un aumento de H_2O_2 intracelular (Davies, 2000; Halliwell y Gutteridge, 2000).

Superóxido dismutasa

Se trata de un conjunto de metaloenzimas cuya característica funcional fundamental es la aceleración de dismutación espontánea del radical superóxido hacia peróxido de hidrógeno y oxígeno



Fueron descritas por primera vez por Mann y Keilin en 1938, obtenida de eritrocitos bovinos, se le denominó hemocupreina por su contenido en cobre, pero no se le asignó ninguna actividad catalítica. McCord y Fridovich, en 1969, mostraron su capacidad enzimática para inhibir la oxidación de ferrocitocromo C por el radical superóxido, siendo renombrada como superóxido dismutasa.

Existen tres tipos de enzimas en función de los metales que formen su centro activo:

CuZn-SOD

Enzima compuesta por dos subunidades, cada centro activo contiene un átomo de Cu^{2+} y un átomo de Zn^{2+} . El cobre interviene en reacciones de transferencia de electrones, mientras que el zinc estabiliza al enzima. Su localización es principalmente citosólica, aunque puede encontrarse en lisosomas y mitocondrias. Es inhibida por cianuro, H_2O_2 y dietiltiocarbamato.

Mn-SOD

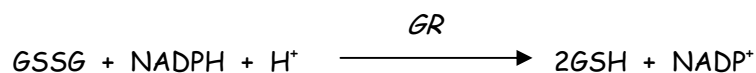
Está constituida por cuatro subunidades, cada una de ellas con un átomo de Mn. Es de localización primordialmente mitocondrial. Es inhibida por cloroformo y metanol.

Fe-SOD

Es exclusiva de bacterias, plantas y algas. Es dimérica y contiene uno o dos átomos de Fe^{3+} por subunidad. Se inhibe por H_2O_2 , cloroformo y metanol.

Glutation reductasa

Es una flavoproteína encargada de la reducción del glutatión mediante el uso de NADPH, el NADP^+ se regenera reduciéndose por la vía de las pentosas fosfato.



Es una enzima constituida por dos subunidades idénticas y que presenta como grupo prostético el FAD. Su importancia radica en la capacidad para mantener los niveles de glutatión reducido, importantes para los procesos de oxido-reducción, entre los cuales se encuentra el servir de donador de hidrógenos para la glutatión peroxidasa.

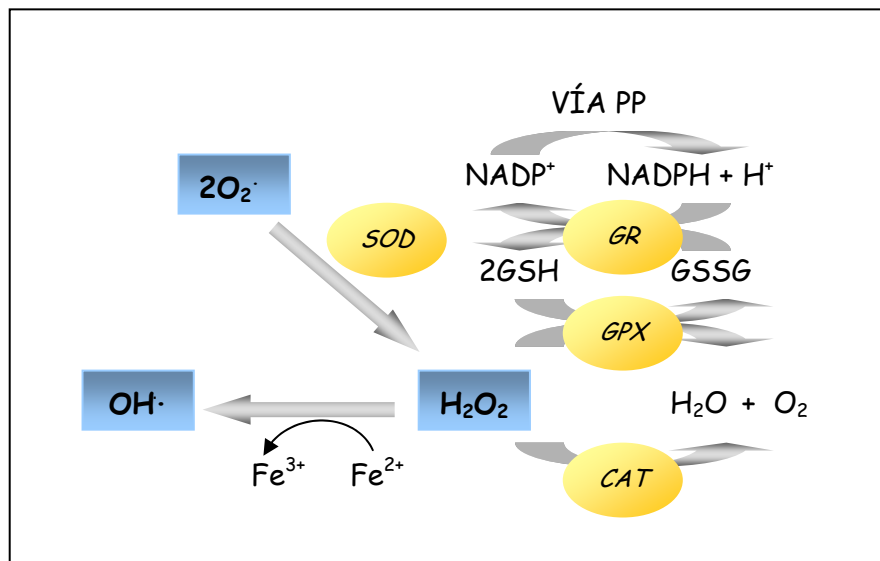
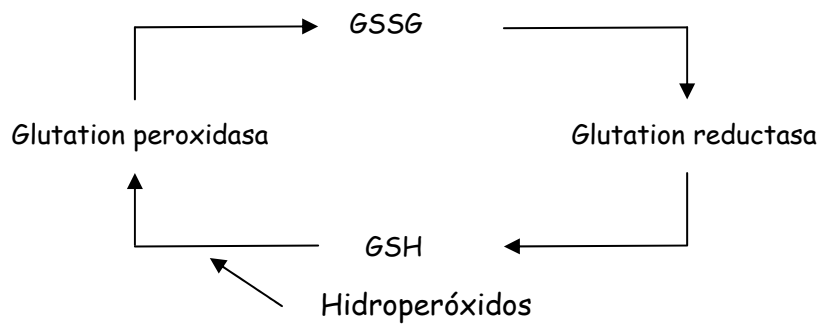


Figura 5. Principales radicales libres del O_2 y enzimas antioxidantes.

4.5. DAÑOS CAUSADOS A BIOMOLÉCULAS

Hidratos de Carbono

Los hidratos de carbono están sujetos a la degradación oxidativa pudiéndose producir radicales de azúcar por la reacción del $OH\cdot$.

En condiciones normales, los monosacáridos son capaces de reducir el O_2 , autooxidándose y formando cetoaldehidos e intermediarios oxidantes como el radical superóxido, todo ello catalizado por la presencia de metales de transición. La glucosa puede unirse a los grupos amino terminal de proteínas iniciando la glicación de las

mismas según la reacción de Mallard originando productos altamente reactivos que alteran la estructura espacial proteica con la consiguiente alteración de su funcionalidad.

Proteínas

Los radicales libres son capaces de actuar sobre residuos aminoácidos de proteínas originando entrecruzamientos catalíticos, cambios conformacionales y pérdida de función. Este daño proteico es rápidamente reparado por la actuación de proteasas, las cuáles evitan la acumulación de proteínas dañadas, manteniendo el balance entre daño y reparación.

Ácidos nucleicos

El estrés oxidativo sobre el DNA va a producir un aumento en el número de mutaciones, entrecruzamientos, roturas de las cromátidas o pérdidas de fragmentos cromosómicos. Las alteraciones más frecuentes en este tipo de situaciones son la fragmentación del DNA y las modificaciones oxidativas en las bases nitrogenadas púricas y pirimidínicas.

Lípidos

La peroxidación lipídica puede resumirse como un daño oxidativo de ácidos grasos poliinsaturados producidos mediante un proceso autocatalítico incontrolable. Es producida por el ataque de una molécula lo suficientemente reactiva como para extraer un H de un ácido graso poliinsaturado quedando éste con un electrón desapareado. A este respecto, los dobles enlaces debilitan la unión C-H del carbono adyacente, lo que facilita la extracción del H en estos carbonos.

El proceso de peroxidación lipídica podría dividirse en tres fases: iniciación, propagación y terminación.

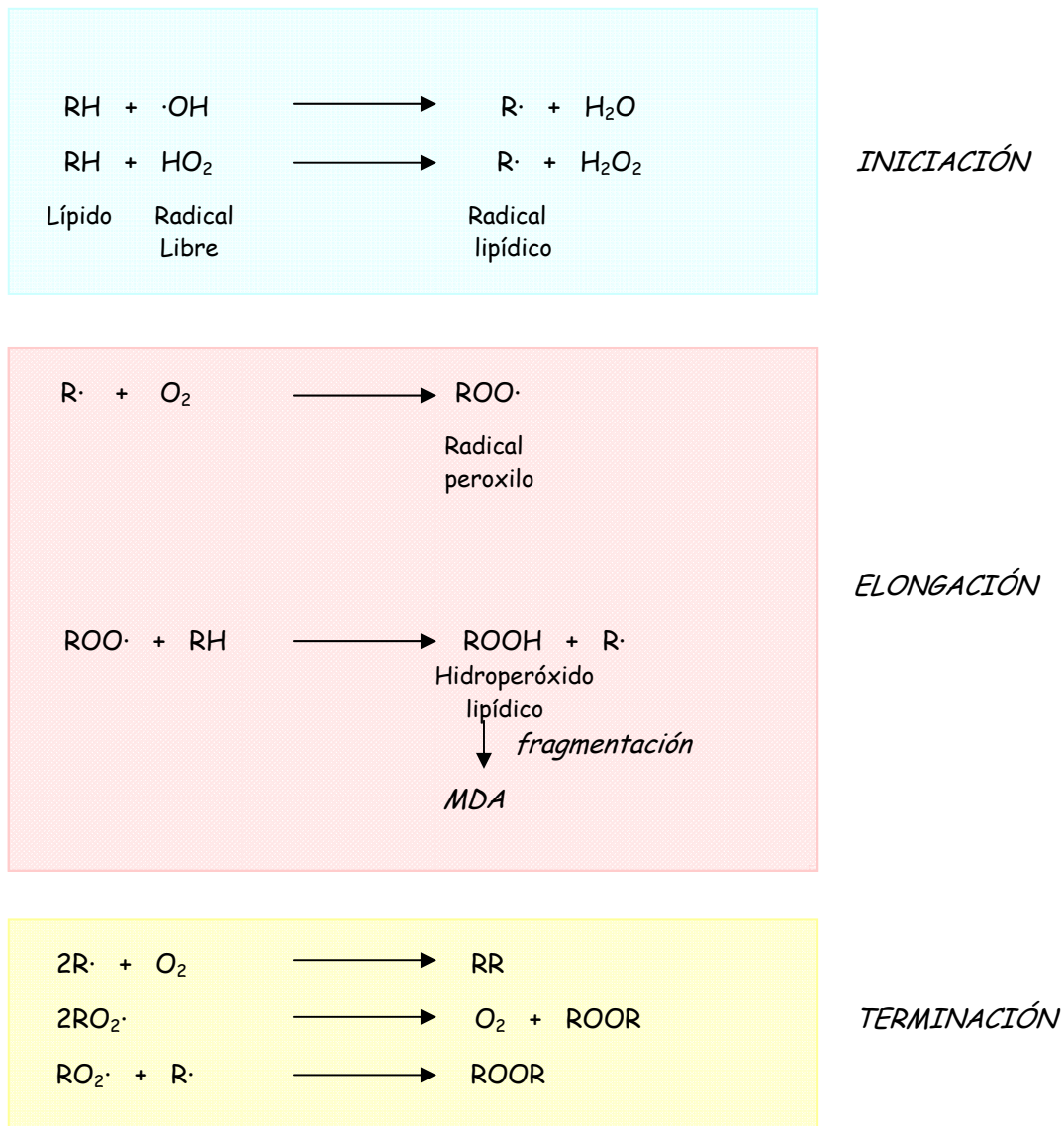
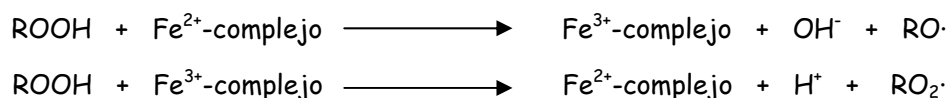


Figura 6. Peroxidación lipídica

En la fase de iniciación, se forma un radical lipídico (R·) por acción de los radicales libres, que en presencia de oxígeno genera un radical peroxilo (ROO·). Este radical es muy susceptible de extraer hidrógenos a otros lípidos generándose como consecuencia de su acción, un hidroperóxido (ROOH) y, de nuevo, un radical lipídico que iniciaría otra vez la secuencia de reacciones en la fase de propagación. La fase de terminación tendría lugar cuando los radicales interaccionan entre sí o cuando un antioxidante cede el H a un radical peroxilo (Cowey, 1986)

El hierro en su estado férrico y ferroso, además de intervenir en la producción de $\cdot\text{OH}$, puede actuar sobre los peróxidos (ROOH) originando radicales $\text{RO}\cdot$ y $\text{RO}_2\cdot$, ambos pueden a su vez estimular la peroxidación lipídica.



En condiciones de iluminación de ácidos grasos poliinsaturados, pueden producirse moléculas de $^1\text{O}_2$ que pueden originar un desplazamiento de dobles enlaces generando ROOH. El O_3 también puede dar lugar a especies reactivas que estimulen la peroxidación.

Los eritrocitos son células especialmente susceptibles a la oxidación puesto que contienen hemoglobina, están en continuo contacto con el oxígeno, poseen membranas celulares ricas en ácidos grasos poliinsaturados, canales iónicos que facilitan la entrada del O_2^- , presencia de hierro en la hemoglobina que puede intervenir en reacciones de Fenton y peroxidación. Por estos motivos, han desarrollado sistemas que las hacen altamente resistentes a la peroxidación, como contener altas cantidades de catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, enzimas proteolíticas que eliminan las proteínas oxidadas, membranas ricas en vitamina E y presencia de colesterol que interacciona con lípidos de membrana evitando la peroxidación y captando radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 2000)

4.6. SISTEMAS REPARADORES

Los sistemas reparadores tienen como finalidad la eliminación de biomoléculas dañadas antes de que su acumulación o su presencia produzcan alteraciones celulares.

Existen enzimas que actúan de forma directa, reduciendo puentes disulfuro como la disulfuro reductasa o reparando la metionina oxidada como la metionina sulfóxido reductasa; transformando productos de la peroxidación en conjugados menos tóxicos como la glutatión transferasa; reparando hidroperóxidos de lípidos y DNA por acción de las peroxidasas; reparando bases metiladas como la DNA metilasa; etc.

Otras enzimas actúan de manera indirecta eliminando las moléculas deterioradas como las proteasas, fosfolipasas y DNA glicosilasas sustituyéndolas posteriormente por otras en buen estado (Davies, 2000).

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se llevaron a cabo tres bloques experimentales diferentes:

Bloque 1. Estudio comparado de las capacidades digestivas en el esturión *Acipenser naccarii* y en la trucha *Oncorhynchus mykiss*: actividad amilasa, lipasa y proteasa.

Bloque 2. Estudio comparado de enzimas del metabolismo intermediario en el esturión *Acipenser naccarii* y en la trucha *Oncorhynchus mykiss*.

Bloque 3. Estudio comparado de parámetros indicadores del estado de estrés oxidativo en el esturión *Acipenser naccarii* y en la trucha *Oncorhynchus mykiss*

En todos los bloques experimentales se realizaron dos ensayos diferentes, una primera aproximación comparativa de ambas especies bajo condiciones controles y la determinación del efecto fisiológico de un periodo de ayuno de 72 días seguido por una realimentación de 60 días.

2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En el ensayo 1 se sacrificaron 10 esturiones (*Acipenser naccarii*) de edad 1+ y 656.15 ± 15.00 g de peso medio y 10 truchas (*Oncorhynchus mykiss*) de edad 1+ y 289.5 ± 5.0 g de peso medio. Ambas especies procedían de la piscifactoría Sierra Nevada S.L. (Riofrío, Granada). Las condiciones de mantenimiento y alimentación fueron propias del régimen de piscifactoría. Ambos animales se alimentaron con la misma dieta artificial (Le Gouessant, Francia), con una composición química aproximada de 48% de proteína, 14% de lípidos, 11,4% de cenizas y 15% de carbohidratos.

En el ensayo 2 se usaron como animales de experimentación para cada punto de muestreo 5 esturiones de la especie *Acipenser naccarii* de edad 1+ y 5 truchas (*Oncorhynchus mykiss*) de edad 1+. Ambas especies procedían de la piscifactoría Sierra Nevada S.L. (Riofrío, Granada). Las condiciones de mantenimiento fueron propias del

régimen de piscifactoría. Ambos animales, en el periodo de realimentación, se alimentaron con la misma dieta artificial (Le Gouessant, Francia), con una composición química aproximada de 48% de proteína, 14% de lípidos, 11,4% de cenizas y 15% de carbohidratos.

Los animales se mantuvieron en ayuno durante un periodo total de 72 días. Se tomaron muestras para su posterior análisis a los 1, 2, 5, 10, 23, 40 y 72 días de ayuno. Tras el periodo de ayuno los animales fueron realimentados durante un periodo total de 2 meses, muestreando animales a los 10 y 60 días.

3. TOMA DE MUESTRAS

Previo sacrificio de los animales se les extrajo in situ el tracto digestivo completo desde el esófago hasta el ano, hígado, corazón y una porción de músculo blanco. Las muestras fueron introducidas rápidamente en nitrógeno líquido. La conservación se realizó a -80°C hasta posterior tratamiento y análisis. Así mismo, a todos los animales se les extrajo muestras de sangre de la vena caudal.

4. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras de tejidos tomadas de todos los animales se homogeneizaron en un homogeneizador eléctrico. Para la homogeneización se usó un tampón Tris-HCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, tritón X-100 0.1%, pH 7.8 en una proporción 1 g de tejido en 9 ml de tampón.

Los homogeneizados fueron sometidos a una centrifugación de 16000 rpm (30000 g) durante 30 minutos a 4°C en una centrifuga “Kentron” mod. Centrikion H-401. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante que fue congelado a -80 °C hasta su posterior análisis.

Para la determinación del glucógeno muscular y hepático, se tomaron porciones de hígado y músculo, las cuales fueron homogeneizadas con agua purificada fría en proporción 1:5 p/v. Las muestras fueron mantenidas a -80°C hasta la posterior determinación analítica.

El plasma fue separado de las muestras de sangre por centrifugación a 5000 g durante 10 minutos. Separado el sobrenadante correspondiente a la fracción plasmática de la sangre, éste se congeló a -80°C hasta posterior análisis.

5. ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN CORPORAL

Los análisis de composición de muestras de hígado y músculo blanco de los animales, se realizaron de acuerdo con los métodos establecidos por la AOAC (1990).

Humedad

Se determinó mediante desecación de la muestra en una estufa (Heraeus) a 105 °C hasta peso constante.

Cenizas

Por incineración de las muestras en horno mufla (Heraeus) a 500 °C durante 12 horas.

Lípidos

Se utilizó el método Soxhlet mediante un aparato de extracción continua con éter dietílico (BUCHI 810). Las muestras se situaron en cartuchos de papel de filtro mezcladas con SO₄Na₂ anhidro para desecar la muestra y facilitar la extracción de la fracción lipídica. La grasa se cuantificó pesando los matraces de recogida del solvente (éter dietílico) con la grasa, tras la evaporación de éste.

Proteínas

Se procedió a la digestión de la proteína usando ácido sulfúrico (96 %) y un catalizador, formado por la mezcla de sulfato potásico, sulfato cúprico y selenio en proporciones 100:6:1, en un digestor Nitrokjel Dra.

Una vez enfriada la mezcla, se llevó a un matraz de 100 ml enrasando con agua purificada. Tras la destilación de un volumen de muestra junto con NaOH al 40%, el amoniaco formado se recogió en un matraz que contenía 10 ml de indicador Buche, tomándose 150 ml para asegurarse la recogida de la totalidad del nitrógeno. Posteriormente, la cantidad de nitrógeno en forma de amoniaco presente en el destilado se valoró con ácido clorhídrico 0.01 N.

El factor de conversión de nitrógeno en proteína usado fue 6.25.

MELN

El cálculo del material extractivo libre de nitrógeno se obtuvo por diferencia a partir de los valores obtenidos de proteínas, lípidos y cenizas según la siguiente expresión:

$$\% \text{ MELN} = 100 - (\% \text{ proteína} + \% \text{ lípidos} + \% \text{ cenizas})$$

6. DETERMINACIÓN DE ENZIMAS DIGESTIVAS

6.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA TOTAL

Fundamento

La actividad proteolítica total fue estimada siguiendo el método de la hidrólisis de la caseína de Kunitz (1947), modificado por Walter (1984). La caseína es transformada en péptidos y aminoácidos libres por las proteasas presentes en la muestra. Los péptidos fueron medidos en estado soluble, tras su separación del sustrato proteico, llevado a cabo por el ácido tricloroacético, que previamente ha paralizado la reacción por precipitación de dichas proteínas. Como estándar se utilizó una solución de tirosina.

Reactivos

- Tampón KCl-HCl 0.1 M pH 1.5
- Tampón glicina-HCl 0.2 M pH 3.0
- Tampón ácido cítrico 0.1 M-fosfato 0.2 M pH 4.0
- Tampón ácido cítrico 0.1 M-fosfato 0.2 M pH 7.0
- Tampón tris-HCl 0.1 M pH 8.5
- Tampón tris-HCl 0.1 M pH 9.0
- Tampón glicina-NaOH 0.1 M pH 10.0
- Ácido tricloroacético (TCA) al 8% (p/v) en agua purificada
- Solución de caseína al 1 % en agua destilada. Para un volumen de 50 ml, se añaden 2-3 ml de NaOH 1 M. Se ajusta el pH de esta solución a 7 con HCl concentrado.

Procedimiento

La mezcla de reacción consistió en lo siguiente para los distintos pHs:

	Control	Test
Caseína (ml)	0.125	0.125
Tampón (ml)	0.125	0.125
Extracto (ml)	0.050	0.050

Los controles se hacen por duplicado y los test por triplicado.

Se incuba la mezcla de reacción durante una hora a 37°C. En los controles el extracto se añade al final de la incubación y justo antes de añadir el TCA. Se añaden 0.3 ml de TCA al 8% (p/v). Posteriormente se mantienen durante 1 hora en un baño de hielo. Tras centrifugar a 1800 g durante 10 minutos se toman 0.2 ml y se mide la D.O. a 280 nm.

Como estándar se utilizó una solución de L-tirosina al 0.06 % (p/v) Se preparó una curva patrón con las siguientes concentraciones:

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Tampón (ml)	L-Tyr (ml)
0	0.300	0.000
100	0.250	0.050
200	0.200	0.100
300	0.150	0.150
400	0.100	0.200
500	0.050	0.250
600	0.000	0.300

Se definió una Unidad de Actividad Proteolítica Total como la cantidad de enzima que libera un mM de tirosina $\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$

6.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD α -AMILASA

Fundamento

La actividad α -amilasa fue determinada mediante el método de la hidrólisis del almidón. Los azúcares (o equivalente reducido) eran estimados cuantitativamente usando el procedimiento colorimétrico de Somogy-Nelson (Somogy, 1951), descrito por Robyt y Whelan (1968), donde el tartrato reduce al cobre, especialmente cuando el reactivo es calentado; un reactivo cromogénico (solución arseniato-molibdato) es añadido para producir color y el óxido de cobre que se forma es roto por agitación suave. La densidad óptica del color desarrollado es proporcional al azúcar existente en la muestra tomada. La maltosa fue usada como estándar.

Reactivos

- solución de almidón al 2% (p/v), en agua purificada
- Tampón fosfato-citrato 0.1 M, NaCl 0.05 M, pH 7.5
- Reactivos de Somogy-Nelson:

Reactivo 1:

- Carbonato sódico al 2.5% p/v.
- Tartrato sódico potásico al 2.5% p/v.
- Bicarbonato sódico al 2% p/v.

- Sulfato sódico anhidro al 20% p/v.

Todos los reactivos se llevan a un volumen final de 1 litro.

Reactivo extemporáneo, duración máxima 2 meses, a 37°C

Reactivo 2:

- sulfato de cobre pentahidratado al 15% p/v y se le añade unas gotas de sulfúrico concentrado.

Reactivo extemporáneo, duración máxima 2 meses a temperatura ambiente.

Reactivo 3:

- Molibdato amónico al 5% p/v, añadiéndose 2 ml de sulfúrico concentrado.
- Arseniato sódico heptahidratado al 0.6% p/v, se añade lentamente a la solución anterior.

Todo se lleva a un volumen final de 500 ml y se calienta al baño maría a 37°C.

Reactivo extemporáneo, duración máximo 2 meses, a 37°C.

Reactivo 4:

1 ml del reactivo 2 + 25 ml del reactivo 1.

Mezcla extemporánea, se prepara justo antes de usar.

Procedimiento

La mezcla de reacción consistió en lo siguiente:

	Control	Test
Almidón (ml)	0.125	0.125
Tampón (ml)	0.125	0.125
Extracto (ml)	0.050	0.050

Los controles se hacen por duplicado y los test por triplicado.

Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37 °C. El extracto se añade al final de la incubación en los tubos control. Se adiciona 0.3 ml del reactivo 4 de Somogy-Nelson.

Las muestras se hierven durante 20 minutos, a continuación se dejan enfriar a temperatura ambiente. Se adiciona 0.3 ml del reactivo 3 de Somogy-Nelson y se agitan los tubos hasta que no se desprenda más CO₂. Se añaden 3.33 ml de agua destilada, se

agitan y se dejan reposar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. Se mide la D.O. de la muestra a 600 nm.

Como estándar se utilizó una solución de maltosa al 0.03% p/v, se preparó una curva patrón con las siguientes concentraciones:

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Tampón (ml)	L-Tyr (ml)
0	0.300	0.000
50	0.250	0.050
100	0.200	0.100
150	0.150	0.150
200	0.100	0.200
250	0.050	0.250
300	0.000	0.300

Se define una Unidad de Actividad α -amilasa como la cantidad de enzima que puede producir un mM de maltosa $\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$.

6.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPÁSICA

Fundamento

La actividad lipásica se determinó mediante la valoración de la degradación de triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos a ácidos grasos libres siguiendo el método descrito por Bier (1955).

Reactivos

- Alcohol polivinílico (PVA) al 1% p/v en agua purificada
- HCl 0.1 M
- NaOH 0.1 M
- NaOH 0.01 M
- Solución alcohol-acetona 1:1
- Fenolftaleína al 1% en etanol
- Tampón McIlvaine pH 8 (ácido cítrico 0.1 M y fosfato bisódico 0.2 M)
- Aceite de oliva virgen

Procedimiento

Se prepara la siguiente solución emulsificante:

Solución de 1 l de alcohol polivinílico (PVA) al 1% p/v en agua purificada agitado mecánicamente. Para obtener una fina dispersión se añaden 5 ml de HCl 0.1N. La solución se calienta a 75-85°C durante 1 hora aproximadamente. Se enfría, se filtra y se ajusta el pH con NaOH 0.1 M a pH 8. Se añade aceite de oliva a una alícuota de la solución anterior, haciendo la concentración de sustrato 0.1 M y se emulsiona agitándolo durante 5 minutos. (“Pm aceite de oliva=889” 89g en 1 l solución emulsionante).

La mezcla de reacción enzimática se compuso de:

	Control	Test
PVA-sustrato emulsionado (ml)	1.0	1.0
Tampón McIlvaine (ml)	0.5	0.5
Extracto (ml)	0.5	0.5

La mezcla de reacción se incubó en agitación constante durante 4 horas a 37 °C. Tras la incubación se adicionó 3 ml de solución alcohol-acetona 1:1 para detener la reacción y romper la emulsión. A la mezcla de reacción se le adicionan unas gotas de fenolftaleína al 1% en etanol y se valora con NaOH 0.01 M. Para los tubos control se siguió el mismo procedimiento pero con la enzima inactivada por una corta ebullición.

Como estándar se utilizó una solución de lipasa bovina comercial al 0.2 %

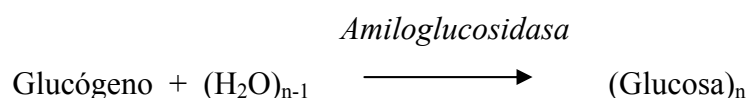
Concentración (mg/ml)	Tampón (ml)	Lipasa (ml)
0	1.0	0.0
0.2	0.9	0.1
0.4	0.8	0.2
0.6	0.7	0.3
0.8	0.6	0.4
1.0	0.5	0.5
1.2	0.4	0.6
1.4	0.3	0.7
1.6	0.2	0.8
1.8	0.1	0.9
2.0	0.0	1.0

Se definió una Unidad de Actividad lipásica como la hidrólisis de 1.0 microequivalente de ácidos grasos a partir de triglicéridos en 1 hora a pH 7.7 y 37°C de temperatura.

7. DETERMINACIÓN DEL GLUCÓGENO TISULAR

Fundamento

El glucógeno fue determinado siguiendo el método propuesto por Roehrig y Allred (1974) modificado. El método consiste en la hidrólisis enzimática del glucógeno presente en la muestra por adición de la enzima amiloglucosidasa, la cuál tras su actuación libera glucosa libre a partir del glucógeno. La glucosa liberada es cuantificada posteriormente espectofotométricamente utilizando un kit comercial.



Reactivos

- Tampón acetato 0.05 M pH 4.5
- Amiloglucosidasa 35 U·ml⁻¹ en tampón acetato
- Test comercial para determinación de glucosa

Procedimiento

Se preparan tubos con los siguientes reactivos en función del tejido utilizado:

	HÍGADO		MÚSCULO	
	Muestras	Estándar	Muestras	Estándar
Agua purificada (ml)	0.850	0.400	0.700	0.850
Amiloglucosidasa (ml)	0.100	0.100	0.100	0.100
Extracto	0.050	-	0.200	-
Glucosa(1mg·ml ⁻¹)	-	0.500	-	0.050

Previa agitación se incuban las muestras a 55°C durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugan a 2500 r.p.m. durante 15 minutos.

Al sobrenadante se le realiza el test de la glucosa siguiendo las siguientes proporciones:

	HÍGADO		MÚSCULO	
	Muestras	Estándar	Muestras	Estándar
Sobrenadante	0.010	0.010	0.100	0.05
Reactivo test	1.000	1.000	1.000	1.000

Cálculos

$$\text{mg glucosa} \cdot \text{ml tejido}^{-1} = \frac{D.O.muestra}{D.O.patrn} \times \text{conc.patrn}$$

8. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN PROTEÍNA SOLUBLE.

El contenido en proteína soluble se determinó siguiendo el método propuesto por Bradford (1976) utilizando un kit comercial (Bio-rad). Las medidas fueron realizadas bajo una curva patrón de albúmina sérica bovina al 0.06%.

9. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS PLASMÁTICOS

Glucosa

La determinación de la glucosa se llevó a cabo usando un kit de diagnóstico comercial (Labkit, 30236) basado en el método enzimático colorimétrico GOD-POD (Trinder, 1969). Este método utiliza la reacción acoplada de la hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenada. Los resultados se expresaron en $\text{mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$.

Lípidos totales

La determinación de lípidos totales se realizó utilizando un kit comercial (Labkit, 30345), basado en el método colorimétrico de la sulfafosfovainillina (Cottet y Etienne,

1965) compuesto por dos reactivos: H_2SO_4 y fosfovainillina y una solución estándar de concentración lipídica conocida.

Los lípidos insaturados de la muestra forman iones carbonilo al reaccionar con el ácido sulfúrico a alta temperatura. Éstos producen en presencia de fosfovainillina una coloración rosada proporcional a la concentración de lípidos totales presentes.

Los resultados se expresaron en $mg \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$.

Triglicéridos

Se utilizó un kit comercial de diagnóstico (Labkit, 30360), siguiendo un método enzimático-colorimétrico GOD-POD (Buccolo y David, 1973). Los triglicéridos de la muestra al ser tratados con una lipasa liberan glicerol y ácidos grasos. El glicerol por una serie de reacciones libera H_2O_2 , el cual a través de la acción de una peroxidasa producen 4-aminofenazona y p-colorofenol que producen una coloración rojiza cuya intensidad es proporcional a la concentración de triglicéridos presente en la muestra.

Los resultados se expresaron en $mg \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$.

Colesterol total

Se utilizó un kit comercial de diagnóstico (Labkit, 30184) basado en el método enzimático-colorimétrico CHOD-POD (Meiattini et al., 1978). La enzima colesterol esterasa escinde los ésteres de colesterol en ácidos grasos y colesterol. Éste último es transformado por la colesterol oxidasa en 4-colestenona y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno junto con fenol y 4-aminofenazona por acción de la peroxidasa produce una coloración proporcional a la concentración de colesterol total en la muestra. Los resultados se expresaron en $mg \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$.

Colesterol HDL

Se usó un kit comercial de diagnóstico (Labkit, 30189) basado en un método enzimático-colorimétrico directo (Naito, 1989). El método se basó en las propiedades de un detergente que solubiliza sólo la fracción HDL, de tal manera que éste se libera reaccionando con la colesterol esterasa, la colesterol oxidasa y los cromógenos. Las lipoproteínas LDL, VDL y quilomicrones son inhibidas debido a la adsorción del

detergente en sus superficies haciéndolas resistentes a la enzima. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol HDL presente en la muestra. Los resultados se expresaron en $\text{mg}\cdot 100\text{ ml}^{-1}$.

Colesterol LDL

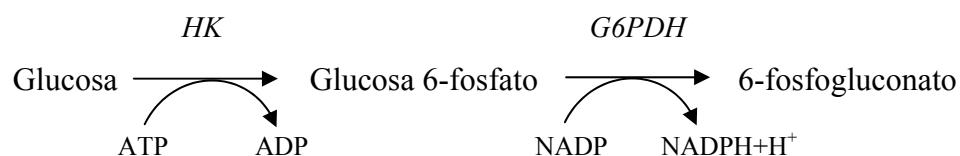
Se utilizó un kit comercial de diagnóstico (Labkit, 30181) basado en un método enzimático-colorimétrico directo (Okada et al., 1998). La determinación se llevó a cabo en dos pasos: un primer paso en el que se eliminaron el resto de lipoproteínas y un segundo paso en el que se determinó el colesterol LDL. Los resultados se expresaron en $\text{mg}\cdot 100\text{ ml}^{-1}$.

10. DETERMINACIÓN DE ENZIMAS DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO

10.1. HEXOQUINASA (HK; E.C. 2.7.1.1)

Fundamento

Se determinó la actividad hexoquinasa según el método empleado por Vijayan et al. (1990). Este método está basado en el registro espectrofotométrico de la reducción del NADP^+ por una reacción acoplada de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de la forma siguiente:



Reactivos

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4
- MgCl_2 100 mM

- ATP 50 mM
- NADP 8 mM
- G6PDH
- Glucosa 200mM (sustrato)

Procedimiento

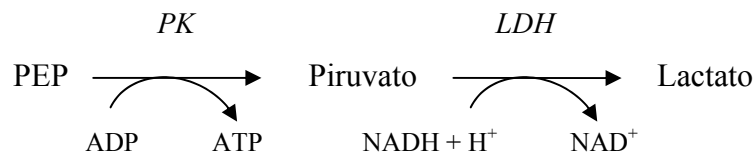
Se mide el incremento de densidad óptica (D.O.) a 340 nm, durante 5 minutos, cada 12 segundos, a 25 °C de temperatura. La reacción se dispara con la muestra. En cada pocillo añadiremos lo siguiente:

	Concentración en pocillo (mM)	ml/pocillo
Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4	50	0.140
ATP 50 mM	2.5	0.010
MgCl ₂ 100 mM	5	0.010
NADP 8 mM	0.4	0.010
G6PDH	2 U·ml ⁻¹	0.57μl
Glucosa 200mM (sustrato)	10	0.010
Muestra		0.020

10.2. PIRUVATO QUINASA (PK; E.C. 2.7.1.40)

Fundamento

La actividad PK se determinó siguiendo el método descrito por Morales et al.(1990). El método se basa en la determinación espectrofotométrica de la oxidación del NADH en una reacción acoplada con la enzima lactato deshidrogenasa.



Reactivos

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4
- MgCl₂ 100 mM

- ClK 2 M
- NADH 3mM
- ADP 20mM
- LDH
- PEP 40mM (sustrato)

Procedimiento

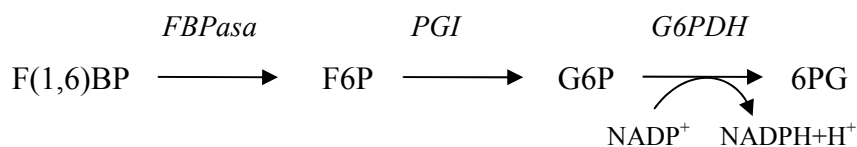
Se mide el decremento de densidad óptica (D.O.) a 340nm, durante 5 minutos, cada 15 segundos, a 25°C de temperatura. En cada pocillo añadiremos lo siguiente:

	Concentración en pocillo (mM)	ml/pocillo
Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4	50	0.140
ClK 2 M	100	0.010
MgCl ₂ 100 mM	5	0.010
NADH 3mM	0.15	0.010
ADP 20mM	1	0.010
LDH	2U·ml ⁻¹	0.15μl
PEP 40mM (sustrato)	2	0.010
Muestra		0.010

10.3. FRUCTOSA BIFOSFATASA (FBPasa; E.C. 3.1.3.11)

Fundamento

La determinación de la actividad FBPasa se llevó a cabo siguiendo el método propuesto por Latzko y Gibbs (1970) modificado. Se basa en la determinación de la reducción del NADP después de tres reacciones en cadena iniciadas con la actuación de la FBPasa.



Reactivos

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4
- MgCl₂ 100 mM

- NADP 10 mM
- β - mercaptoetanol 240 mM
- PGI
- G6PDH
- FBP 5 mM (sustrato)

Procedimiento

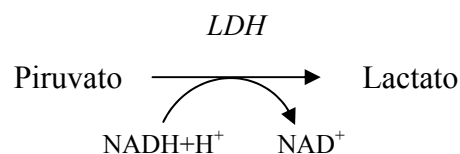
Se mide el incremento de densidad óptica (D.O.) a 340 nm, durante 4 minutos, cada 12 segundos, a 25°C . En cada pocillo añadiremos lo siguiente:

	Concentración en pocillo (mM)	ml/pocillo
Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4	42.84	0.120
MgCl ₂ 100 mM	5	0.010
NADP 10 mM	0.5	0.010
β - mercaptoetanol 240 mM	12	0.010
PGI	2 U·ml ⁻¹	0.57 μ l
G6PDH	2 U·ml ⁻¹	0.57 μ l
Agua destilada		0.020
FBP 5 mM (sustrato)	0.5	0.020
Muestra		0.010

10.4. LACTATO DESHIDROGENASA (LDH; E.C. 1.1.1.27)

Fundamento

La actividad lactato deshidrogenasa se determinó siguiendo el método de Singer et al., (1990) basado en la detección en la variación de D.O. a 340 nm producido por la oxidación del NADH.



Reactivos

- Tampón Imidazol 83.3 mM pH 7.4
- NADH 3.2 mM
- Piruvato 20 mM

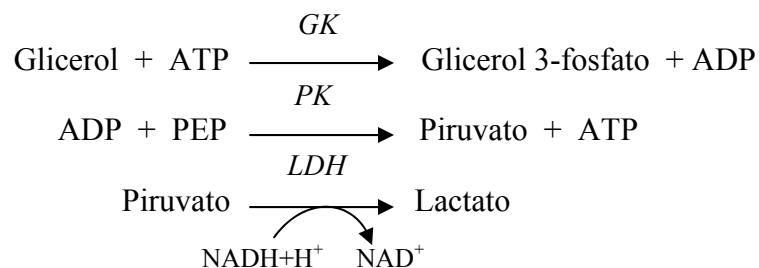
Procedimiento

Se mide el decremento de densidad óptica (D.O.) a 340nm, durante 3 minutos, cada 12 segundos, a 25 °C de temperatura. En cada pocillo añadiremos lo siguiente:

	Concentración en pocillo (mM)	ml/pocillo
Tampón Imidazol 83.3 mM pH 7.4	50	0.140
NADH 3,2 mM	0.16	0.010
Agua destilada		0.030
Piruvato 20 mM (sustrato)	1	0.010
Muestra		0,010

10. 5. GLICEROL QUINASA (GK; E.C. 2.7.1.30)**Fundamento**

La actividad glicerol quinasa se determinó según el método propuesto por Vijayan et al. (1990), en el cuál se mide el decremento de D.O. debido a la oxidación del NADP de acuerdo con las siguientes reacciones:

**Reactivos**

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4

- MgCl₂ 100 mM
- NADH 15 mM
- ATP 100 mM
- PEP 200 mM
- PK
- LDH
- Glicerol 50 mM

Procedimiento

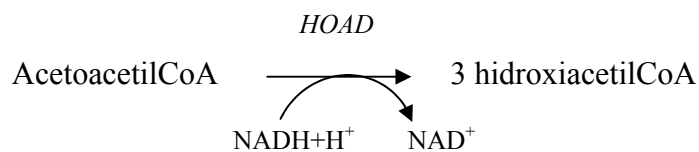
Se mide el decremento de D.O. a 340nm, durante 6 minutos, cada 12 segundos, a 25°C de temperatura. En cada pocillo añadiremos lo siguiente:

	Concentración en pocillo (mM)	ml/pocillo
Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4	50	0.140
NADH 15 mM	0.75	0.010
ATP 100 mM	5	0.010
MgCl ₂ 100 mM	5	0.010
PEP 200 mM	10	0.010
PK	4 U·ml ⁻¹	0.8μl
LDH	4 U·ml ⁻¹	0.30μl
Glicerol 50 mM (sustrato)	2.5	0.010
Muestra		0.010

10.6. 3- HIDROXIACIL CoA DESHIDROGENASA (HOAD; E.C. 1.1.1.35)

Fundamento

La actividad hidroxiacil-CoA deshidrogenasa fue determinada siguiendo el método de Singer et al. (1990). Se siguió espectrofotométricamente la oxidación de NADH de acuerdo con la siguiente reacción:



Reactivos

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 8
- NADH 2 mM
- Acetoacetil CoA 2 mM (sustrato)

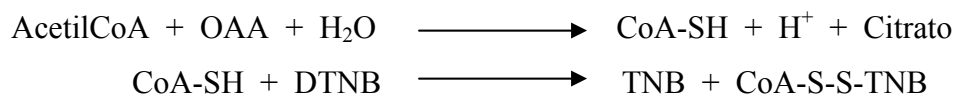
Procedimiento

Se mide el decremento de densidad óptica (D.O.) a 340 nm, durante 4 minutos, cada 12 segundos, a 25 °C de temperatura. En cada pocillo añadiremos lo siguiente:

	Concentración en pocillo (mM)	ml/pocillo
Tampón Imidazol 71.4 mM pH 8	50	0.140
NADH 2 mM	0.1	0.010
Agua destilada		0.030
Acetoacetil CoA 2mM (sustrato)	0.1	0.010
Muestra		0.010

10.7. CITRATO SINTASA (CS; E.C. 2.3.1.9)**Fundamento**

La determinación de la actividad citrato sintasa se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Thibault et al. (1997), donde se registró el incremento de D.O. a 412 nm producido por la reducción del DTNB.

**Reactivos**

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 8
- DTNB 2 mM
- Acetil-CoA 4 mM
- OAA 4 mM (sustrato)

Procedimiento

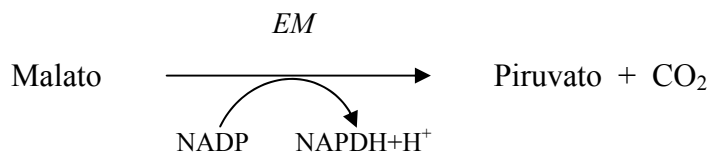
Se mide el incremento de densidad óptica (D.O.) a 412nm (E_{412} : $13.6 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ($13.6 \text{ cm}^{-1}\mu\text{mol}^{-1}$), durante 5 minutos, cada 12 segundos, a 25 °C de temperatura. En cada pocillo añadiremos lo siguiente:

	Concentración en pocillo (mM)	ml/pocillo
Tampón Imidazol mM, pH 8	50	0.140
DTNB 2mM	0.1	0.010
Acetil-CoA 4 mM	0.2	0.010
Agua destilada		0.020
OAA 4 mM (sustrato)	0.2	0.010
Muestra		0.010

10.8. ENZIMA MÁLICO (EM; E.C. 1.1.1.40)

Fundamento

El enzima málico se determinó siguiendo el método propuesto por Singer et al. (1990) basada en la medida de la variación de D.O. producida por la reducción del NADP^+ de acuerdo con las siguientes reacciones:



Reactivos

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4
- MgCl_2 100 mM
- NADP 8 mM
- L-Malato 40 mM (sustrato)

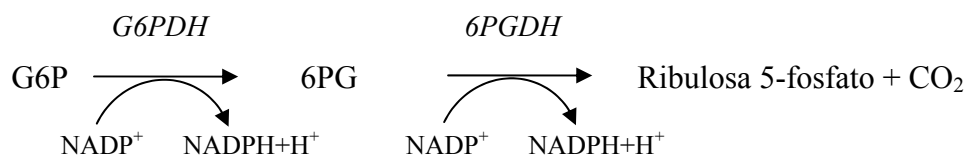
Procedimiento

Se mide el incremento de densidad óptica (D.O.) a 340nm, durante 4 minutos, cada 12 segundos, a 25 °C de temperatura. En cada pocillo añadiremos lo siguiente:

	Concentración en pocillo (mM)	ml/pocillo
Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4	50	0.140
MgCl ₂ 100 mM	5	0.010
NADP 8 mM	0.4	0.010
Agua destilada		0.010
L-Malato 40 mM (sustrato)	2	0.010
Muestra		0.020

10.9. GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G6PDH; E.C. 1.1.1.49)**Fundamento**

La actividad glucosa 6-fosfato deshidrogenasa fue determinada siguiendo el método descrito por Morales et al. (2004), basado en la variación de D.O. como consecuencia de la reducción de NADP⁺. La actividad enzimática registrada mediante esta técnica sería la suma de las actividades G6PDH y 6PGDH (6-fosfogluconato deshidrogenasa).

**Reactivos**

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4
- MgCl₂ 100 mM
- NADP 20 mM
- HCO₃Na 119 mM
- G6P 10 mM (sustrato)

Procedimiento

Se mide el incremento de densidad óptica (D.O.) a 340nm, durante 10 minutos, cada 15 segundos, a 25 °C de temperatura. La reacción se dispara con la muestra. En cada pocillo añadiremos lo siguiente:

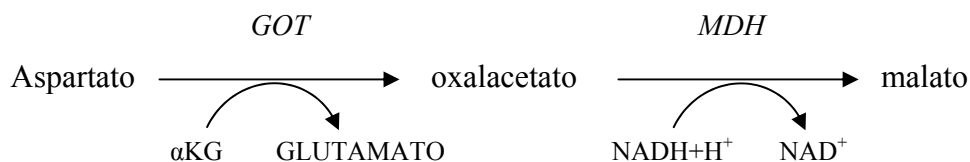
	Concentración en pocillo (mM)	ml/pocillo
Tampón Imidazol 71.4 mM, pH 7.4	50	0.140
MgCl ₂ 100mM	5	0.010
(*)NADP 20 mM	2	0.020
G6P 10 mM (sustrato)	1	0.020
Muestra		0.010

(*)NADP disuelto en HCO₃Na 119mM (en cubeta, 11.9mM)

10.10. GLUTAMATO OXALACETATO TRANSAMINASA (GOT; E.C. 2.6.1.1)

Fundamento

La actividad glutamato oxalacetato transaminasa se determinó según el método seguido por Singer et al. (1990), en el cuál se midió la oxidación del NADH acoplado a las siguientes reacciones:



Reactivos

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4
- α-KG 200 mM
- NADH 6 mM
- Piridoxal fosfato 1mM
- MDH (Malato DH)
- L-aspartato 500 mM (sustrato)

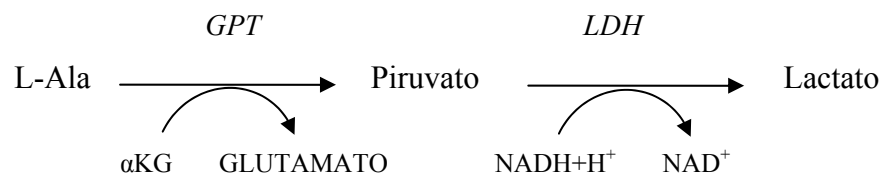
Procedimiento

Se mide el decremento de densidad óptica (D.O.) a 340nm, durante 3 minutos, cada 12 segundos, a 25 °C de temperatura. En cada pocillo añadiremos lo siguiente:

	Concentración en pocillo (mM)	ml/pocillo
Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4	50	0.140
α -KG 200mM	10	0.010
NADH 6 mM	0.3	0.010
Piridoxal fosfato 1mM	0.05	0.010
MDH (Malato DH)	3 U·ml ⁻¹	0.10 μ l
Agua destilada		0.010
L-aspartato 500 mM (sustrato)	25	0.010
Muestra		0.010

10.11. GLUTAMATO PIRUVATO TRANSAMINASA (GPT; E.C. 2.6.1.2)**Fundamento**

La técnica empleada está basada en el método utilizado por Morales et al. (1990), siguiendo espectrofotométricamente a 340 nm la disminución de la D.O. causada por la desaparición del NADH, acoplado a las siguientes reacciones:

**Reactivos**

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4
- α -KG 200 mM
- NADH 4 mM
- Piridoxal fosfato 1mM
- LDH
- L-Ala 250 mM (sustrato)

Procedimiento

Se mide el decremento de densidad óptica (D.O.) a 340 nm, durante 3 minutos, cada 12 segundos, a 25 °C de temperatura. En cada pocillo añadiremos lo siguiente:

	Concentración en pocillo (mM)	ml/pocillo
Tampón Imidazol 71.4 mM pH 7.4	50	0.140
α -KG 200mM	10	0.010
NADH 4 mM	0.2	0.010
Piridoxal fosfato 1mM	0.05	0.010
LDH	2 U·ml ⁻¹	0.15 μ l
L-Ala 250 mM (sustrato)	25	0.020
Muestra		0.010

12.12. GLUTAMATO DESHIDROGENASA (GDH; E.C. 1.4.1.2)

Fundamento

La determinación de la actividad glutamato deshidrogenasa está basada en la desaparición de NADH seguida espectrofotometría a 340 nm, y se realizó según el método de Morales et al. (1990). La reacción catalizada por la enzima es la siguiente:



Reactivos

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 8
- NADH/ADP 2.9/14.3 mM
- Acetato amónico 3.3 M
- LDH
- α -KG 200mM (sustrato)

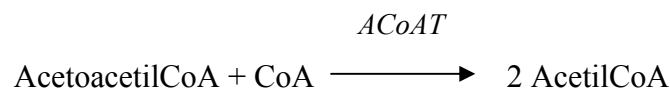
Procedimiento

Se mide el decremento de densidad óptica (D.O.) a 340 nm, durante 3 minutos, cada 6 segundos, a 25°C de temperatura. En cada pocillo añadiremos lo siguiente:

	Concentración en pocillo (mM)	ml/pocillo
Tampón Imidazol 71.4 mM pH 8	50	0.140
NADH/ADP 2.9/14.3 mM	0.2/1	0.014
Acetato amónico 3.3 M	100	0.006
LDH	2 U·ml ⁻¹	0.15μl
α-KG 200mM (sustrato)	10	0.010
Muestra		0.030

10.13. ACETOACETIL COA TIOLASA (ACoAT; E.C. 2.3.1.9)**Fundamento**

La determinación de la actividad AcetoacetylCoA tiolasa se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Singer et al. (1990).en el que se mide la aparición de acetylCoA de acuerdo con la siguiente reacción:

**Reactivos**

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 8
- MgCl₂ 100 mM
- Acetoacetyl CoA 2.8 mM
- CoA 4.8 mM (sustrato)

Procedimiento

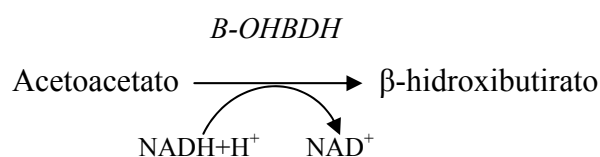
Se mide el decremento de densidad óptica a 313 nm ($E_{313} = 20.5 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$), durante 5 minutos, cada 12 segundos, a 25°C. En cada pocillo añadiremos lo siguiente:

	Concentración en pocillo (mM)	ml/pocillo
Tampón Imidazol 71.4 mM pH 8	50	0.140
MgCl ₂ 100 mM	5	0.010
Acetoacetil CoA 2.8mM	0.14	0.010
Agua destilada		0.020
CoA 4.8 mM (sustrato)	0.24	0.010
Muestra		0.010

10.14. β - HIDROXIBUTIRATO DESHIDROGENASA (β -OHBDH; E.C. 1.1.1.30)

Fundamento

La actividad β -OHBDH fue determinada según el método propuesto por Singer et al. (1990), en el cual se registró el decremento de D.O. a 340 nm como consecuencia de la oxidación del NADH de acuerdo con la siguiente reacción:



Reactivos

- Tampón Imidazol 71.4 mM pH 8
- NADH 2 mM
- Acetoacetato 40 mM

Procedimiento

Se mide el decremento de densidad óptica (D.O.) a 340 nm, durante 4 minutos, cada 12 segundos, a 25°C de temperatura. En cada pocillo añadiremos lo siguiente:

	Concentración en pocillo (mM)	ml/pocillo
Tampón Imidazol 71.4 mM pH 8	50	0.140
NADH 2 mM	0.1	0.010
Agua destilada		0.030
Acetoacetato 40 mM (sustrato)	2	0.010
Muestra		0.010

CÁLCULOS

La actividad específica de las diferentes enzimas se expresó como cantidad de enzima que transforma un nmol de sustrato por minuto por mg de proteína, calculándose de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{mUmg prot}^{-1} = \text{nmolmin}^{-1}\text{mg prot}^{-1} = \frac{(\Delta\text{D.O.}/\Delta t) V}{\epsilon_x d 10^{-9} 10^3 v P}$$

Siendo:

$\Delta\text{D.O.}/\Delta t$: variación de densidad óptica por variación de tiempo

V: volumen total en ml

v: volumen de extracto en ml

d: espesor de la cubeta. Para microplacas 0.6 cm

P: mg de proteína por ml

10^{-9} : factor de conversión a nM

10^3 : conversión de litros a mililitros

ϵ_x : coeficiente de extinción molar:

$$\epsilon_{340\text{nm}}: 6.22 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$$

$$\epsilon_{412\text{nm}}: 13.6 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$$

$$\epsilon_{313\text{nm}}: 20.5 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$$

11. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS Y ENZIMAS DEL ESTRÉS OXIDATIVO.

11.1. NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Fundamento

La técnica se basa en la formación de malondialdehído (MDA) tras la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados por la acción de los radicales $\cdot\text{OH}$. El MDA en presencia

de ácido tiobarbitúrico (TBA), da lugar a un reactivo rojizo que absorbe luz a 535 nm (Buege y Aust, 1978).

Reactivos

- Ácido tricloracético (TCA) 15 % (p/v)
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.375 % (p/v)
- HCl 0.25 N
- Hidroxitolueno butilado (BHT) 0.01 % (p/v)
- Malondialdehido (MDA) 0.1 M

Procedimiento

Se prepara el siguiente reactivo extemporáneo: 15 g de TCA en 80 ml de HCl, una vez disuelto se añaden 0.375 g de TBA calentando ligeramente. La mezcla resultante se lleva a 100 ml con agua miliQ y se añaden 0.01 g de BHT disolviéndose mediante agitación durante 2 horas y calentando ligeramente.

Se realizó una curva patrón a partir de la solución madre de MDA con las siguientes concentraciones:

[MDA] (μ M)	Sol. madre (μ l)	Agua mili-Q (ml)	Vol. Total (ml)
0.1	10	9.990	10
0.25	25	9.975	10
1	100	9.900	10
5	500	9.500	10
10	1000	9.000	10
15	1500	8.500	10
20	2000	8.000	10

Para llevar a cabo la reacción, se mezclaron 0.1 ml de muestra (extractos y patrones) con 0.5 ml de reactivo. Tras una agitación vigorosa, se incubó durante 15 minutos a 100°C. A continuación se dejó enfriar y se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 10 minutos. Se tomó 0.2 ml del sobrenadante y se midió la absorbancia a 535 nm a 25°C frente al blanco de reactivo.

Cálculos

Los datos obtenidos de absorbancia se interpolaron en la recta de regresión construida a partir de la curva patrón. Los niveles de peroxidación lipídica se expresaron como μM de MDA = nmol de MDA g tejido⁻¹.

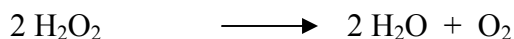
11.2. CATALASA (CAT; E.C. 1.11.1.6)

Fundamento

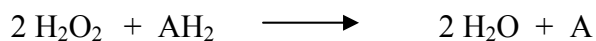
La determinación de la actividad catalasa se llevó a cabo usando el método de Aebi (1984).

La catalasa ejerce una doble acción:

1. Actividad catalítica:



2. Actividad peroxidásica: produciendo la oxidación de compuestos reducidos tales como metanol, etanol, ácido fórmico y fenoles. Tiene lugar a pHs básicos.



La actividad catalítica se determinó midiendo la desaparición de H_2O_2 registrada espectrofotométricamente como disminución de D.O.

Reactivos

- Tampón fosfato potásico 50 mM pH 7
- Solución extemporánea de peróxido de hidrógeno 10.6 mM en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.

Procedimiento

Se determinó el decremento de D.O. a 240 nm durante 3 minutos, cada 12 segundos, a 25°C. En cada pocillo se adicionó lo siguiente:

	Concentración en pocillo (mM)	ml/pocillo
H ₂ O ₂ 10.6 mM	10.1	0.190
Muestra		0.010

Cálculos

Para el cálculo de la actividad catalasa en $\mu\text{moles min}^{-1}\text{mg prot}^{-1}$ se utilizó la fórmula:

$$\text{Umg prot}^{-1} = \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg prot}^{-1} = \frac{(\Delta\text{D.O.}/\Delta t) \times V_t}{\epsilon_{240} \times d \times V_e \times P \times 10^{-6} \times 10^3}$$

Donde:

$\Delta\text{D.O.}/\Delta t$: Decremento de D.O./min

V_t : volumen total de reacción en ml

ϵ_{240} : coeficiente extinción molar del H₂O₂ a 240 nm ($39.58 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

V_e : volumen del extracto añadido en ml

d : longitud de paso de luz. Para las microplacas el valor de d es 0.6 cm

P : mg de proteína por ml

10^{-6} : factor de conversión a μM

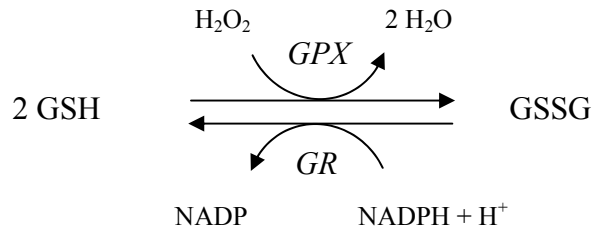
10^3 : conversión de litros a mililitros

11.3. GLUTATION PEROXIDASA (GPX; E.C. 1.11.1.9)

Fundamento

La actividad GPX fue determinada siguiendo el método de Flohé y Günzler (1984), el cual usa el peróxido de hidrógeno como sustrato.

La actividad enzimática fue cuantificada midiendo la variación de D.O. debida a la degradación de NADPH utilizado para la regeneración del glutation reducido a partir del glutation oxidado obtenido por la acción de la glutation peroxidasa.



Reactivos

- Solución reactiva extemporánea en tampón fosfato potasio 50 mM pH 7.2 de:
 - Azida sódica 4,3 mM
 - EDTA 1 mM
 - GSH 4 mM
 - NADPH 0.2 mM
 - Glutation reductasa 1.1 U·ml⁻¹
- Solución extemporánea de peróxido de hidrógeno 36.2 mM en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.2

Procedimiento

Se registró el decremento de D.O. a 340 nm cada 18 segundos durante un tiempo total de 3 minutos y una temperatura constante de 25°C. En cada pocillo se adicionó lo siguiente:

	Concentración en pocillo (mM)	ml/pocillo
Tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.2	35	0.14
Azida sódica 4.3 mM	0.23	0.01
EDTA 1 mM	0.05	0.01
GSH 4 mM	0.2	0.01
NADPH 0.2 mM	0.01	0.01
Glutation reductasa	1.1 U·ml ⁻¹	0.14μl
H ₂ O ₂ 36.2 mM	1.81	0.010
Muestra		0.010

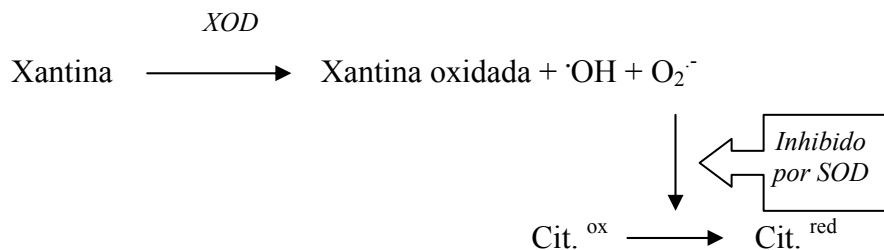
Cálculos

La actividad enzimática glutatión peroxidasa se expresa como $\text{nmol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ de NADPH oxidados a NADP según la fórmula general descrita para el cálculo de las actividades enzimáticas específicas.

11.4. SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD; E.C. 1.15.1.1)

Fundamento

La determinación de la actividad SOD se realizó siguiendo el método descrito por McCord y Fridovich (1969), basado en la medida de la tasa de inhibición, por parte de la SOD, en el proceso de reducción del citocromo C por radicales libres superóxidos $\text{O}_2^{\cdot-}$, generados por el sistema enzimático xantina – xantina oxidasa (XOD).



Reactivos

- Tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8, EDTA 0.1 mM
- Solución extemporánea en tampón fosfato potásico 60 mM pH 7.8 de:
 - Citocromo c 1 mM
 - Xantina 1 mM
- Solución extemporánea de xantina oxidasa comercial $0.5 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$
- Hidrosulfito sódico

Procedimiento

Se preparó un volumen total de cóctel de reacción, teniendo en cuenta las siguientes proporciones por pocillo:

	Concentración en pocillo (mM)	ml/pocillo
Tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8 EDTA 0.1 mM	44.5	0.178
Citocromo c 1 mM	0.10	0.019
Xantina 1 mM	0.01	0.003

Esta mezcla reactiva se mantuvo a 25°C protegida de la luz y con aireación durante 50 minutos para conseguir la total oxidación del citocromo c.

Se realizaron tres tipos de medidas:

- Comprobación de la solución de reacción:

Se le adiciona un poco de hidrosulfito sódico a 200 µl de solución reactiva. Previa agitación se mide la absorbancia a 550 nm. Se comprueba la reducción total del citocromo C al obtener valores de D.O. comprendidos entre 0.20 y 0.24.

- Reacción control:

Se realizaron tres réplicas adicionando al pocillo 200 µl de solución reactiva y 5 µl de XOD. Se llevó a cabo una lectura espectrofotométrica a 550 nm en intervalos de 13 segundos durante 3 minutos a 25 °C. La tasa de reducción del citocromo c de la reacción control debe de estar comprendida entre 0.023-0.028 unidades.

- Reacción problema:

En cada pocillo se adiciona 200 µl de cóctel de reacción, 5 µl de XOD y 5 µl de muestra problema. Se determina el incremento de absorbancia durante 3 minutos a intervalos de 13 segundos y una longitud de onda de 550 nm a 25°C.

Cálculos

1 U = 50 % inhibición de la reacción control a 25 °C

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\Delta D.O./ \text{min}(\text{control}) - \Delta D.O./ \text{min}(\text{problema})}{\Delta D.O./ \text{min}(\text{control})} \times 100$$

$$U \text{ SOD} \cdot \text{ml}^{-1} = \frac{\% \text{inhibición}}{50\%} \times \frac{1}{\text{Vol.muestra}(\text{ml})} \times \text{Factor dilución}$$

11.5. GLUTATION REDUCTASA (GR; E.C. 1.6.4.2)

Fundamento:

La actividad GR se determinó según el método de Carlberg y Mannervik (1975) con algunas modificaciones, registrándose el descenso de absorbancia a 340 nm producido por la oxidación del NADPH utilizado por la glutation reductasa en el paso de GSSG a GSH.

Reactivos:

- Tampón fosfato sódico 0.1 M pH 7.5, EDTA 1mM
- NADPH 0.63 mM
- Glutation oxidado (GSSG) 3.25 mM

Procedimiento:

Se registró el decremento de D.O. producido por la oxidación del NADPH a 340 nm durante 10 minutos cada 18 segundos a 25 °C. En cada pocillo se adicionó

	Concentración en pocillo (mM)	ml/pocillo
NADPH 0.66 mM	0.63	0.190
GSSG 3.25 mM	0.15	0.010
Muestra		0.010

Cálculos

La actividad se expresó como $\text{nmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ de NADPH oxidados a NADP según la fórmula general descrita para el cálculo de las actividades enzimáticas específicas.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**IV-1. ESTUDIO COMPARADO DE LAS
CAPACIDADES DIGESTIVAS EN EL ESTURIÓN
Acipenser naccarii Y EN LA TRUCHA *Oncorhynchus
mykiss.***

IV-1.1. ACTIVIDADES DE ENZIMAS DIGESTIVAS EN EL ESTURIÓN *Acipenser naccarii* Y EN LA TRUCHA *Oncorhynchus mykiss*. ESTUDIO COMPARADO.

Resumen

El estudio de las secreciones digestivas en peces podría dilucidar ciertos aspectos de su fisiología nutritiva así como resolver algunos problemas nutricionales, tales como la adecuación de una dieta artificial a las necesidades nutricionales del pez. El objetivo del presente estudio fue analizar la actividad digestiva proteasa, amilasa y lipasa en el esturión *A. naccarii* comparándolo con la trucha *O. mykiss*. Los resultados muestran que el esturión no sólo es capaz de digerir grasas y proteínas como otros peces carnívoros, sino que, además, digiere carbohidratos a niveles característicos de un pez omnívoro. Así mismo, la proporción de enzimas proteasas ácidas indican la presencia de una digestión gástrica importante.

Introducción

La digestión del alimento en subunidades apropiadas para su absorción en el tracto digestivo de los animales depende, en gran parte, de las enzimas disponibles. Los procesos digestivos suponen una pérdida de la energía contenida en el alimento que puede ir desde el 20% al 80% (Cho, 1987), la cual no puede ser usada para los procesos de mantenimiento y crecimiento de los animales.

Estudios sobre las secreciones digestivas en peces han ayudado a definir los límites de la proteína (Twining et al., 1983) y de los carbohidratos (Spannhof y Plantikow, 1983) en la dieta. Divakaran et al. (1999), estudiando las enzimas digestivas en *Polydactylus sexfilis* y en *Caranx melampygus* recomiendan distintas proporciones dietarias de macronutrientes para su mejor uso nutritivo. Hofer y Köck (1989) consideran que a partir del perfil de enzimas digestivas es posible predecir la capacidad de la especie para usar diferentes nutrientes. El conocimiento del funcionamiento de la maquinaria digestiva ayuda a comprender mejor la digestibilidad de los nutrientes (Glass et al.,

1989; Kolkovski, 2001). En definitiva, estudios sobre las secreciones digestivas en peces pueden dilucidar algunos aspectos de su fisiología nutritiva y contribuir a resolver problemas nutricionales, tales como la adecuación de una dieta artificial a la capacidad nutritiva del pez.

La nutrición es uno de los principales problemas a solventar en el cultivo de una nueva especie. La trucha arcoiris fue una de las primeras especies de peces cultivadas y, por tanto, la primera cuya nutrición fue extensamente estudiada. En la actualidad, en algunos países europeos como Italia y España, el esturión *A. naccarii* está comenzando a ser cultivado. El esturión *A. naccarii* migra estacionalmente desde los ríos Po, Ticino y Adigge al mar Adriático (Clementi et al., 1999). Estudios recientes (Garrido-Ramos et al., 1999; Hernando et al., 1999; De la Herrán et al., 2004) ponen de manifiesto que la distribución histórica de esta especie incluía ciertos ríos españoles.

Las distintas condiciones experimentales, los diferentes métodos de toma de muestras y la variedad de técnicas usadas para determinar las enzimas digestivas en peces obstaculizan el establecimiento de valores absolutos y la comparación entre diferentes especies y, por tanto, la obtención de conclusiones válidas y aplicables respecto a la fisiología nutritiva de las especies.

La trucha *O. mykiss*, un pez carnívoro, tiene baja actividad amilasa. En peces herbívoros y omnívoros, la actividad amilasa es más alta que en carnívoros (Hsu y Wu, 1979; Hofer et al., 1982; Kuzmina, 1986; Munilla-Morán y Saborido-Rey, 1996; Hidalgo et al., 1999). Así, en la anguila europea, la actividad amilasa fue superior a la de la trucha (Hidalgo et al., 1999). Con respecto a la actividad proteasa encontrada en diferentes especies de peces, no es posible la clasificación según el comportamiento alimentario. La trucha arcoiris y la carpa común tienen una alta actividad proteasa mientras que otras especies de peces carnívoras como la anguila europea y la dorada tienen bajas actividades (Hidalgo et al., 1999).

Existen pocos datos disponibles sobre las secreciones de actividad lipasa en peces. Legar et al. (1979) purificaron una lipasa y colipasa en trucha arcoiris. Lie y Lambertsen (1985) describieron una actividad lipasa digestiva en el bacalao del Atlántico. Borlongan (1990) determinó la actividad óptima para la lipasa pancreática e

intestinal de *Chanos chanos* a dos valores de pH. Parece ser que los peces carnívoros poseen una mayor actividad lipasa digestiva que los peces omnívoros o herbívoros (Chakrabarti et al., 1995; Opuszynski y Shireman, 1995; Tengjaroenkul et al., 2000).

El objetivo del presente trabajo fue el análisis comparado de las enzimas digestivas proteasa, amilasa y lipasa del esturión *A. naccarii* y la trucha *O. mykiss*, con el propósito de incrementar el conocimiento de la fisiología de esta especie de esturión y obtener más información acerca de su nutrición.

Material y Métodos

Animales de experimentación

Se usaron como animales de experimentación 10 esturiones (*Acipenser naccarii*) de edad 1+ y 537.6 ± 50.7 g de peso medio y 10 truchas (*Oncorhynchus mykiss*) de edad 1+ y 282.3 ± 12.2 g de peso medio. Ambas especies fueron obtenidas de la piscifactoría Sierra Nevada S.L. (Riofrío, Granada). Las condiciones de mantenimiento y alimentación fueron propias del régimen de piscifactoría. Ambas especies de peces fueron alimentadas con la misma dieta artificial (Le Gouessant, Francia), con una composición química aproximada de 48% de proteínas, 14% de lípidos, 11,4% de cenizas y 15% de carbohidratos.

Tras 48 horas de ayuno, los peces fueron sacrificados y se les extrajo in situ el tracto digestivo completo desde el esófago hasta el ano. Las muestras fueron inmediatamente introducidas en nitrógeno líquido y posteriormente se mantuvieron a -80°C hasta posterior análisis. Los parámetros e índices biométricos de los animales usados en los ensayos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros biométricos para el esturión *A. naccarii* y la trucha *O. mykiss*.

	Peso medio (g)	Peso del tracto digestivo (g)	RDS
Esturión	537.6 ± 50.7	25.4 ± 2.7	4.72 ± 0.26
Trucha	282.3 ± 12.2	14.1 ± 1.3	5.11 ± 0.55

RDS (Relación digestivo somática): (Peso del tracto digestivo/peso del pez) x 100

Tratamiento de las muestras

El digestivo completo de cada animal se homogeneizó en un homogeneizador eléctrico. Para la homogeneización se usó un tampón Tris-HCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, tritón X-100 0.1%, pH 7.8, en una proporción 1 g de tejido en 9 ml de tampón.

Los homogeneizados fueron sometidos a una centrifugación de 16000 rpm (30000 g) durante 30 minutos a 4 °C en una centrifuga “Kontron” mod. Centrikion H-401. Tras la centrifugación, se recogió el sobrenadante que fue congelado a -80 °C hasta su posterior análisis.

Determinaciones enzimáticas

La actividad proteolítica total fue estimada utilizando el método de la hidrólisis de la caseína de Walter (1984). La determinación enzimática se llevó a cabo usando varios valores de pH abarcando el rango de pHs fisiológicos propios del tracto digestivo. Los tampones usados fueron KCl-HCl 0.1 M (pH 1.5), glicina-HCl 0.2 M (3.0), citrato 0.1 M-fosfato 0.2 M (pHs 4.0 y 7.0), Tris-HCl 0.1 M (pH 8.5 y 9.0) y glicina-NaOH 0.1 M (pH 10.0). La mezcla de reacción enzimática se compuso de caseína al 1% (w/v) en agua (0.25 ml), tampón (0.25 ml) y extracto (0.1 ml), se incubó durante 1 hora a 37 °C. La reacción se paró mediante la adición de 0.6 ml de ácido tricloroacético al 8 % (w/v). Tras mantener las muestras durante 1 hora a 2°C, se centrifugaron a 1800 g durante 10 min, y se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm. A los tubos blancos se les añadió el extracto al final de la incubación justo antes de la adición del ácido tricloroacético. Las muestras se ensayaron por triplicado y los blancos por duplicado. Como estándar se utilizó L-tirosina. Se definió una Unidad de Actividad Proteolítica Total como la cantidad de enzima que libera un mM de tirosina $\text{ml}^{-1} \text{min}^{-1}$.

Aunque existen técnicas específicas para la determinación de la actividad de cada enzima proteolítica, nosotros elegimos una técnica no específica como otros autores (Clark et al., 1985; Uys y Hecht, 1987; Munilla-Morán y Stark, 1989). Este método permite cuantificar distintas actividades proteolíticas en función del pH de incubación: actividad de la pepsina (pH ácido), actividad de quimotripsina y tripsina (pH neutro o ligeramente básico) y otras enzimas como carboxipeptidasas, elastasas y colagenasas (pHs alcalinos). La actividad proteolítica total se estimó a partir de la suma de las distintas actividades a los distintos pHs.

La actividad α -amilasa fue determinada mediante el método de la hidrólisis del almidón, usando el procedimiento colorimétrico de Somogy-Nelson (Somogy, 1951), descrito por Robyt y Whelan (1968). La mezcla de reacción enzimática se compuso de una solución de almidón al 2% (w/v) (0.125 ml), tampón citrato-fosfato 0.1 M, pH 7.5 (0.125 ml), y extracto de digestivo (0.05 ml). La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a 37 °C. Tras la incubación se siguió la metodología descrita por Somogy-Nelson y se determinó la absorbancia a 600 nm. Para los tubos blancos se siguió el mismo procedimiento, salvo que la adición del extracto fue justo después de la incubación. Como estándar se realizó una curva patrón de maltosa y se definió una Unidad de Actividad α -amilasa como la cantidad de enzima produce un mM de maltosa $\text{ml}^{-1} \text{min}^{-1}$.

La actividad lipásica se determinó mediante la valoración de la degradación de triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos a ácidos grasos libres siguiendo el método descrito por Bier (1955). Para llevar a cabo la emulsión se uso una solución de 1 l de alcohol polivinílico (PVA) al 1% en agua purificada a la que se le adicionaron 5 ml de HCl 0.1 N, se calentó a 75-85°C durante 1 hora, se enfrió, se filtró y se ajustó a pH 8 con NaOH 0.1 N. A una alícuota de la solución anterior se le añade aceite de oliva virgen haciendo la concentración de sustrato 0.1 M. La mezcla se emulsionó durante 5 minutos. La mezcla de reacción enzimática se compuso de solución PVA-sustrato emulsionado (1 ml), tampón McIlvaine a pH 8 (0.5 ml) y extracto de digestivo (0.5 ml). El tampón McIlvaine se realizó a partir de soluciones de ácido cítrico 0.1 M y de fosfato bisódico 0.2 M. La mezcla de reacción se incubó durante 4 horas a 37°C. Tras la incubación, se adicionaron 3 ml de solución alcohol-acetona 1:1 para parar la reacción y romper la emulsión. A la mezcla de reacción se le adicionaron unas gotas de fenolftaleína al 1% en etanol y se valoró con NaOH 0.01 M. Para los tubos blancos se siguió el mismo procedimiento pero con la enzima inactivada por una corta ebullición. Como estándar, se realizó una curva patrón con lipasa pancreática porcina tipo II (Sigma). Se definió una Unidad de Actividad lipásica como la hidrólisis de 1.0 microequivalente de ácidos grasos a partir de triglicéridos en 1 hora a pH 7.7 y 37°C.

El contenido en proteína de las muestras se determinó por el método Bradford (Bradford, 1976), usando albúmina sérica bovina como estándar.

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar de la media. Se realizó el análisis estadístico de la t de Student usando el SPSS 13.0 para Windows para determinar diferencias significativas entre especies para las distintas actividades enzimáticas ($P < 0.05$)

Resultados

De manera global, la actividad enzimática digestiva en el tracto digestivo de la trucha *O. mykiss* fue mayor que en el esturión *A. naccarii* (Tabla 2). La actividad amilasa en el tracto digestivo del esturión fue ligeramente superior a la presente en la trucha. Sin embargo, para la actividad lipasa, la trucha mostró el doble de actividad que el esturión. Algo similar se encontró para la actividad proteasa, la cual alcanza valores más altos en el digestivo de la trucha con respecto al esturión.

Tabla 2. Actividad de enzimas digestivas en el tracto digestivo del esturión *A. naccarii* y la trucha *O. mykiss*.

	Especie	U·mg proteína ⁻¹	U·g tracto digestivo ⁻¹
Amilasa	Esturión	133.65 \pm 22.08	2129.37 \pm 202.46*
	Trucha	129.24 \pm 10.92	1622.35 \pm 40.27
Lipasa	Esturión	22.91 \pm 3.47*	362.06 \pm 37.39*
	Trucha	47.95 \pm 3.91*	598.65 \pm 36.57
Proteasa	Esturión	27.39 \pm 2.34*	43.20 \pm 3.00*
	Trucha	57.07 \pm 5.52	66.47 \pm 3.10

Los valores son media \pm error estándar.(n=10) * Diferencias significativas entre especies para una misma actividad enzimática ($P < 0.05$).

Al determinar la actividad proteasa a distintos valores de pH (Tabla 3), la actividad a pH ácido fue superior en la trucha. Este hecho viene determinado porque a pH 4 la trucha tiene 5.6 veces más actividad que el esturión, mientras que a pH 1.5 y 3.0 el esturión alcanza valores más altos (1.4 y 2.1 veces superiores respectivamente). A pH 7.0, los valores de actividad para la trucha fueron 1.6 veces más altos que para el esturión y a pH básico la trucha mostró una actividad proteolítica superior a la del esturión (2.2 a 2.3 veces más actividad).

Tabla 3. Actividad proteasa a diferentes pHs en el tracto digestivo del esturión *A. naccarii* y la trucha *O. mykiss*.

Actividad Proteásica (U·mg proteína ⁻¹)		
pHs	Esturión	Trucha
1.5	0.85 ± 0.10*	0.61 ± 0.07
3	0.97 ± 0.11*	0.45 ± 0.08
4.5	0.61 ± 0.09*	3.42 ± 0.28
7	5.55 ± 0.46*	9.09 ± 0.84
8.5	6.42 ± 0.64*	14.87 ± 1.58
9	6.51 ± 0.59*	14.20 ± 1.45
10	6.47 ± 0.64*	14.43 ± 1.55

Los valores son media ± error estándar.(n=10) * Diferencias significativas entre especies para una misma actividad enzimática ($P < 0.05$).

En ambas especies, el conjunto de la actividad proteasa básica y neutra fue más alta que la actividad proteasa ácida. Este hecho fue más pronunciado en la trucha. Es decir, el conjunto de enzimas con un pH óptimo ácido fue proporcionalmente mayor en el esturión que en la trucha (Figura 1).

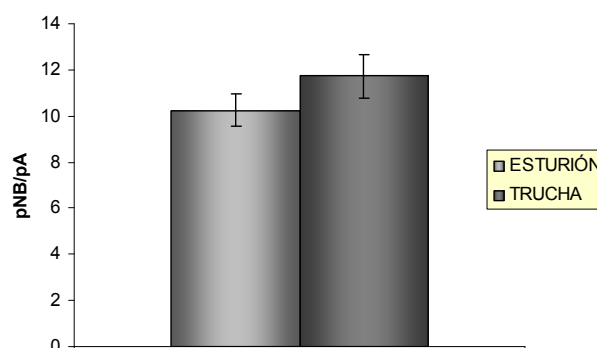


Figura 1. Actividad proteasa en el esturión *A. naccarii* y la trucha *O. mykiss*. Relación entre las actividades a pH neutro básico (pNB) y pH ácido (pA)

Discusión

En primer lugar, habría que destacar que la actividad enzimática determinada en el tracto digestivo de la trucha *O. mykiss* fue superior a la del esturión *A. naccarii* (Tabla 2). Este hecho podría ser indicativo de una menor utilización digestiva de los macronutrientes por parte del esturión. Existen pocos datos bibliográficos disponibles a

este respecto, pero los existentes demuestran que los coeficientes de digestibilidad de los nutrientes son elevados en los esturiones. De esta manera, en el esturión blanco, Buddington y Doroshov (1986) y Herold y Hung (1995) obtuvieron altos valores de digestibilidad, lo cual está de acuerdo con nuestros datos previos para el esturión *A. naccarii* (Sanz et al., 1997). Este mismo hecho ha sido constatado para el esturión siberiano (Medale et al., 1991; Kaushik et al., 1993).

Los datos disponibles sobre la utilización digestiva de los nutrientes, y particularmente de la proteína, por los esturiones son similares a los datos de digestibilidad existentes para la trucha arcoiris (Morales et al., 1994; Sanz et al., 1994; Gisbert et al., 1999; Burel et al., 2000; Refstie et al., 2000).

Para la digestión, es necesario que el alimento entre en contacto con las enzimas digestivas durante un cierto periodo de tiempo y que esté sujeto a movimientos de trituración, mezcla y de avance característicos del tracto digestivo. Una baja actividad de enzimas digestivas podría verse compensada por un mayor tiempo de permanencia del alimento en el tracto digestivo. En la trucha arcoiris se conoce el tiempo de vaciado gástrico, el tiempo de tránsito intestinal y los procesos digestivos (Sanz et al., 1987). De esta manera, se requieren de 12 a 24 horas para el vaciado gástrico, y entre 48 y 72 horas para la eliminación total del alimento del intestino. Esto no ha sido estudiado por nosotros en el esturión, pero hemos observado que tras algunos días de ayuno el esturión *A. naccarii* continúa eliminando heces, lo que indicaría que los procesos digestivos en este pez son más lentos que en la trucha *O. mykiss*. En consecuencia, podría ser que la baja actividad de enzimas digestivas en el tracto digestivo del esturión (lipasas y proteasas) estuviese compensada por un mayor tiempo de contacto con las mismas. No hay que descartar que, aunque la toma de muestras se realizó en ambas especies a las 48 horas de haber sido alimentadas, si la digestión es más lenta en el esturión, cierta cantidad de enzima haya podido perderse durante el tratamiento de las muestras junto con la comida que aún permanecía en el tracto digestivo. La determinación de la actividad enzimática en esta especie de manera secuencial durante un periodo de ayuno prolongado añadiría luz sobre la veracidad de esta última hipótesis.

Si aceptamos que el conjunto de enzimas digestivas del esturión lo capacita para una buena digestibilidad de los nutrientes (proteínas, grasas y carbohidratos), es necesario

examinar la proporción relativa de cada tipo de enzimas: amilasas, proteasas y lipasas. Nuestros datos indican que el esturión tiene proporcionalmente una mayor actividad amilasa que proteasa y lipasa, al contrario que la trucha, independientemente de la forma de expresión de su actividad (Tabla 2, Figura 2). Si consideramos las relaciones amilasa:lipasa y amilasa:proteasa, estas son superiores en el esturión, mientras que la relación proteasa:lipasa fue muy similar en ambas especies (Figura 2). Varios autores han demostrado que la actividad amilasa es mayor en peces omnívoros y herbívoros que en peces carnívoros (Fänge y Grove, 1979; Ugolev et al., 1983; Hidalgo et al., 1999). Además, Hidalgo et al. (1999) encontraron diferencias entre la cantidad de amilasa y la relación amilasa:proteasa entre especies carnívoras, mostrando la trucha arcoiris valores inferiores a los de la anguila europea. Esto concuerda con estudios que dicen que la anguila europea utiliza mejor los carbohidratos que la trucha arcoiris (Hidalgo et al., 1993; Sanz et al., 1993; García-Gallego et al., 1995).

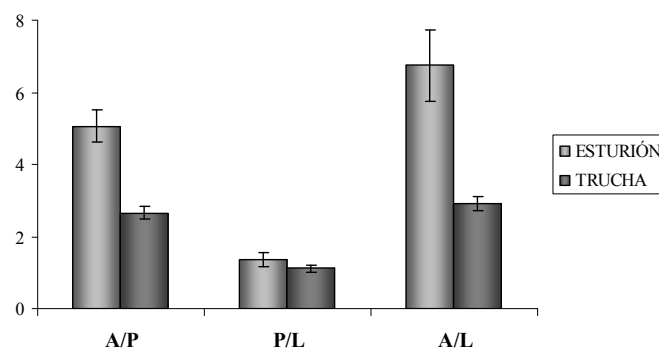


Figura 2. Actividad de enzimas digestivas en el tracto digestivo en el esturión *A. naccarii* y la trucha *O. mykiss*. Relación entre las actividades amilasa (A), proteasa (P) y lipasa (L).

Podría ser que el esturión *A. naccarii* esté mejor capacitado para utilizar los carbohidratos que la trucha arcoiris. Herold y Hung (1995) encontraron un coeficiente de digestibilidad para la dextrina del 75% en el esturión blanco. Sanz et al. (1997) determinaron un coeficiente de digestibilidad aparente superior al 68% para carbohidratos en forma de dextrina (42% de la dieta) en el esturión *A. naccarii*. Algunos estudios sugieren que la trucha *O. mykiss* digiere pobremente los carbohidratos (Singh y Nose, 1967; Bergot y Breque, 1983; Kim y Kaushik, 1992; Brauge et al., 1994; Storebakken et al., 1998). Además, la mejor utilización digestiva de carbohidratos del esturión con respecto a la trucha no es un hecho sorprendente, puesto que el esturión

consume material vegetal en su medio natural (semillas y detritus vegetal), lo que lo acerca más a un animal con hábitos omnívoros que carnívoros (Soriguer et al., 1999).

En referencia a la secreción enzimática proteasa con actividades óptimas a diferentes pHs (Tabla 3), nosotros encontramos actividad a pHs ácidos (1.5, 3.0 y 4.0). Los datos existentes en bibliografía describen diferentes pepsinas con distintos pHs óptimos (Gildberg, 1988), así como otras proteinasas originadas por otras enzimas caseinolíticas como la catepsina D y E (Cohen et al., 1981; Clark et al., 1985; Haard et al., 1996; Sabapathy y Teo, 1993; Chiu y Pan, 2002; Yetty et al., 2004). Las pepsinas y proteasas gástricas del esturión presentan mayor actividad a pHs ácidos que las de la trucha, quizás debido a la necesidad de romper las paredes celulares vegetales. Además, la cantidad de enzimas ácidas en comparación con las básicas es mayor en el esturión (Figura 1), indicando una mayor digestión gástrica que la trucha.

La mayor actividad enzimática encontrada en la trucha a pH 4.0 podría deberse a la presencia de una enzima llamada catepsina, la cual parece ser de origen pancreático o intestinal (Kirschke y Barret, 1987). Tras la digestión gástrica, las proteasas neutras y básicas de origen intestinal y pancreático finalizan la digestión. Nosotros hemos encontrado gran cantidad de proteasas básicas en ambas especies. Se han descrito enzimas como tripsinas, quimotripsinas, colagenasas, elastasas y carboxipeptidasas en diferentes especies de peces (Eshel et al., 1993; Chiu y Pan, 2002; Chong et al., 2002).

Con respecto a la actividad lipasa, los peces carnívoros consumen dietas ricas en grasas, lo que explica la presencia de dichas enzimas (Chakrabarti et al., 1995). La cantidad de lipasas es mayor en peces con hábitos alimenticios carnívoros que en peces omnívoros o herbívoros (Opuszynski y Shireman, 1995; Tengjaroenkul et al., 2000). La relación proteasa:lipasa en ambas especies fue muy similar (Figura 2). Como hemos comentado anteriormente, muchos estudios ponen de manifiesto que la digestibilidad de grasas es superior en la trucha. Sanz et al. (1997) encontraron una buena digestibilidad de lípidos para esta especie de esturión, con valores superiores al 90% para dietas con 17% de lípidos y de 84% para dietas con niveles del 22% de lípidos.

Para concluir, el estudio comparado del contenido enzimático de proteasas, amilasas y lipasas, en el tracto digestivo del esturión con respecto a la trucha, muestra no sólo que

el esturión está capacitado para digerir los lípidos y proteínas como cualquier carnívoro, sino que, además, el contenido en amilasas lo capacita para digerir carbohidratos a los niveles de un omnívoro. Esta capacidad sería ventajosa a la hora de la utilización de piensos, puesto que podría incorporarse mayor cantidad de carbohidratos que para un pez carnívoro, disminuyendo la proteína y abaratando, por tanto, el coste. A su vez, la alta proporción de proteasas ácidas indican una potente digestión gástrica. Estudios futuros a nivel fisiológico, con diferentes tipos de dietas, ayuno, etc, así como a nivel estructural, podrían proporcionarnos más información sobre las peculiaridades digestivas de esta especie de pez tan importante tanto a nivel científico como comercial.

IV-1.2. EFECTO DEL AYUNO Y LA REALIMENTACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS DIGESTIVAS EN EL ESTURIÓN *Acipenser naccarii* Y EN LA TRUCHA *Oncorhynchus mykiss*.

Resumen

Se determinaron las actividades de enzimas digestivas en el esturión *A. naccarii* y en la trucha *O. mykiss* durante un periodo de ayuno y posterior realimentación. De manera global, las actividades de las enzimas digestivas se vieron afectadas de la misma manera en ambas especies. La actividad amilasa sufrió durante el periodo de ayuno un descenso más rápido que las actividades proteasa y lipasa, que descendieron más tardíamente. Tras un mes de ayuno, ambas especies estarían preparadas para digerir la proteína y los lípidos de manera efectiva. Tras 72 días de ayuno, la maquinaria digestiva del esturión y la trucha se vio afectada en su capacidad para digerir los macronutrientes. La capacidad para la digestión de proteínas y lípidos se restableció totalmente en ambas especies tras 60 días de realimentación, mientras que la capacidad para digerir carbohidratos no se recuperó en ninguna de ellas.

Introducción

El crecimiento y la eficiencia del alimento en peces depende de sus capacidades fisiológicas y bioquímicas para digerir y transformar los nutrientes ingeridos, pero puede haber numerosas combinaciones de factores bióticos y abióticos que pueden tener una gran influencia sobre el estado fisiológico del animal y sobre los procesos relacionados con la digestión, absorción y transformación de esos nutrientes. La capacidad de los peces para hacer frente a situaciones adversas puede variar según la especie y, por tanto, el conocimiento de estas peculiaridades fisiológicas y metabólicas y cómo se pueden ver afectadas por diversos factores nos proporcionará una buena herramienta para optimizar su cultivo.

Estudios sobre la actividad de enzimas digestivas en peces han ayudado a definir los límites de la proteína (Twining et al., 1983) y de carbohidratos (Spannhof y Plantikow,

1983) en la dieta. Divakaran et al. (1999), estudiando las enzimas digestivas en *Polydactylus sexfilis* y en *Caranx melampygus* recomiendan distintas proporciones dietarias de macronutrientes para su mejor uso nutritivo. Hofer y Köck (1989) consideran que a partir del perfil de enzimas digestivas es posible predecir la capacidad de la especie para usar diferentes nutrientes. La comprensión del funcionamiento de la maquinaria digestiva, ayuda a comprender mejor la digestibilidad de los nutrientes (Glass et al., 1989; Kolkovski, 2001). En definitiva, estudios sobre la actividad de enzimas digestivas en peces pueden dilucidar algunos aspectos de su fisiología nutritiva y contribuir a resolver problemas nutricionales, tales como la adecuación de una dieta artificial a la capacidad nutritiva del pez.

El ayuno es una situación experimentada y tolerada por muchas especies de peces en el medio natural (Larsson y Lewander, 1973; McLeese y Moon, 1989; Navarro y Gutiérrez, 1995; Olivereau y Olivereau, 1997; Bélanger et al., 2002). Someter a los peces a situaciones de ayuno durante un determinado periodo de tiempo es una práctica habitual llevada a cabo en piscifactorías ante determinadas circunstancias. Investigar la maquinaria digestiva en estas condiciones puede indicar hasta qué punto el ayuno puede condicionar la utilización del alimento tras la realimentación. Datos bibliográficos muestran que la fosfatasa alcalina, enzima localizada en las microvellosidades del epitelio intestinal, disminuye gradualmente en carpas ayunadas (*Cyprinus carpio*), y tras 13 meses de ayuno esta actividad no pudo detectarse (Gas y Noailliac-Depeyre, 1976). Bélanger et al. (2002) observaron, en bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*), sometidos a un ayuno prolongado una disminución de las actividades enzimáticas, así como de la actividad tripsina, en los ciegos pilóricos e intestino, la cual se restablece tras la realimentación. Por otro lado, se ha observado un efecto muy diferente tras un ayuno corto, con un aumento en las actividades enzimáticas en la mucosa gástrica y a lo largo del tracto digestivo en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Mommsen et al., 2003). Krogdahl y Bakke-McKellep, (2005) detectaron un decremento en la actividad enzimática total de enzimas de las microvellosidades intestinales en el salmón Atlántico (*Salmo salar* L.) sometido a 40 días de ayuno y una rápida recuperación tras 7 días de realimentación.

Dentro del interés general que existe acerca de la búsqueda de nuevas especies de peces cultivables, merece especial atención el esturión. Constituye un preciado animal del cual todo se puede aprovechar (piel, cartílago, carne y por supuesto sus huevas).

En un trabajo anterior hemos estudiado el equipamiento enzimático digestivo de dos especies diferentes como son el esturión (*Acipenser naccarii*) y la trucha (*Oncorhynchus mykiss*), encontrando que la maquinaria enzimática digestiva del esturión es propia de un pez omnívoro más que de un carnívoro como la trucha.

El objetivo principal de este trabajo es la comparación de las actividades digestivas durante el ayuno y la realimentación en la trucha y el esturión. Ello nos permitirá conocer hasta qué punto la maquinaria enzimática digestiva puede verse alterada y si esta alteración es diferente en el esturión con respecto a la trucha. Ello supondrá un mayor conocimiento de las peculiaridades nutritivas del esturión lo que, sin duda, ayudará a optimizar su cultivo. Así mismo, el estudio de dichas enzimas en realimentación nos permitirá evaluar la capacidad de respuesta del animal y el grado de reversibilidad de dichas alteraciones.

Material y Métodos

Animales de experimentación

Como animales de experimentación, se utilizaron 30 esturiones de la especie *Acipenser naccarii* de edad 1+ y 552.12 ± 22.03 g de peso medio y 30 truchas de la especie *Oncorhynchus mykiss* de edad 1+ y 299.74 ± 26.67 g de peso medio. Ambas especies procedían de la piscifactoría Sierra Nevada S.L. (Riofrío, Granada). Las condiciones de mantenimiento y alimentación fueron propias del régimen de piscifactoría. Ambos animales, en el periodo de realimentación, se alimentaron con la misma dieta artificial (Le Gouessant, Francia), con una composición química aproximada de 48% de proteína, 14% de lípidos, 11,4% de cenizas y 15% de carbohidratos.

Los animales se mantuvieron en ayuno durante un periodo de 72 días. Se tomaron muestras para su posterior análisis a los 5, 10, 23, 40 y 72 días de ayuno. Tras el periodo

de ayuno, los animales fueron realimentados durante un periodo de 2 meses, muestreando animales a los 10 y 60 días de realimentación.

Tratamiento de las muestras

El digestivo completo de cada animal se homogeneizó en un homogeneizador eléctrico. Para la homogeneización se usó un tampón Tris-HCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, tritón X-100 0.1%, pH 7.8, en una proporción 1 g de tejido en 9 ml de tampón.

Los homogeneizados fueron sometidos a una centrifugación de 16000 rpm (30000 g) durante 30 minutos a 4°C en una centrifuga “Kontron” mod. Centrikon H-401. Tras la centrifugación, se recogió el sobrenadante que fue congelado a -80 °C hasta su posterior análisis.

Determinaciones enzimáticas

La actividad proteolítica total fue estimada utilizando el método de la hidrólisis de la caseína de Walter (1984). La determinación enzimática se llevó a cabo usando varios valores de pH abarcando el rango de pHs fisiológicos propios del tracto digestivo. Los tampones usados fueron KCl-HCl 0.1 M (pH 1.5), glicina-HCl 0.2 M (3.0), citrato 0.1 M-fosfato 0.2 M (pHs 4.0 y 7.0), Tris-HCl 0.1 M (pH 8.5 y 9.0) y glicina-NaOH 0.1 M (pH 10.0). La mezcla de reacción enzimática se compuso de caseína al 1% (w/v) en agua (0.25 ml), tampón (0.25 ml) y extracto (0.1 ml), se incubó durante 1 hora a 37 °C. La reacción se paró mediante la adición de 0.6 ml de ácido tricloroacético al 8 % (w/v). Tras mantener las muestras durante 1 hora a 2°C, se centrifugaron a 1800 g durante 10 min, y se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm. A los tubos blancos se les añadió el extracto al final de la incubación justo antes de la adición del ácido tricloroacético. Las muestras se ensayaron por triplicado y los blancos por duplicado. Como estándar se utilizó L-tirosina. Se definió una Unidad de Actividad Proteolítica Total como la cantidad de enzima que libera un mM de tirosina $\text{ml}^{-1} \text{min}^{-1}$.

Aunque existen técnicas específicas para la determinación de la actividad de cada enzima proteolítica, nosotros elegimos una técnica no específica como otros autores (Clark et al., 1985; Uys y Hecht, 1987; Munilla-Morán y Stark, 1989). Este método permite cuantificar distintas actividades proteolíticas en función del pH de incubación: actividad de la pepsina (pH ácido), actividad de quimotripsina y tripsina (pH neutro o

ligeramente básico) y otras enzimas como carboxipeptidasas, elastasas y colagenasas (pHs alcalinos). La actividad proteolítica total se estimó a partir de la suma de las distintas actividades a los distintos pHs.

La actividad α -amilasa fue determinada mediante el método de la hidrólisis del almidón, usando el procedimiento colorimétrico de Somogy-Nelson (Somogy, 1951), descrito por Robyt y Whelan (1968). La mezcla de reacción enzimática se compuso de una solución de almidón al 2% (w/v) (0.125 ml), tampón citrato-fosfato 0.1 M, pH 7.5 (0.125 ml), y extracto de digestivo (0.05 ml). La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a 37 °C. Tras la incubación se siguió la metodología descrita por Somogy-Nelson y se determinó la absorbancia a 600 nm. Para los tubos blancos se siguió el mismo procedimiento, salvo que la adición del extracto fue justo después de la incubación. Como estándar se realizó una curva patrón de maltosa y se definió una Unidad de Actividad α -amilasa como la cantidad de enzima produce un mM de maltosa $\text{ml}^{-1} \text{min}^{-1}$.

La actividad lipásica se determinó mediante la valoración de la degradación de triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos a ácidos grasos libres siguiendo el método descrito por Bier (1955). Para llevar a cabo la emulsión se uso una solución de 1 l de alcohol polivinílico (PVA) al 1% en agua purificada a la que se le adicionaron 5 ml de HCl 0.1 N, se calentó a 75-85°C durante 1 hora, se enfrió, se filtró y se ajustó a pH 8 con NaOH 0.1 N. A una alícuota de la solución anterior se le añade aceite de oliva virgen haciendo la concentración de sustrato 0.1 M. La mezcla se emulsionó durante 5 minutos. La mezcla de reacción enzimática se compuso de solución PVA-sustrato emulsionado (1 ml), tampón McIlvaine a pH 8 (0.5 ml) y extracto de digestivo (0.5 ml). El tampón McIlvaine se realizó a partir de soluciones de ácido cítrico 0.1 M y de fosfato bisódico 0.2 M. La mezcla de reacción se incubó durante 4 horas a 37°C. Tras la incubación, se adicionaron 3 ml de solución alcohol-acetona 1:1 para parar la reacción y romper la emulsión. A la mezcla de reacción se le adicionaron unas gotas de fenoltaleina al 1% en etanol y se valoró con NaOH 0.01 M. Para los tubos blancos se siguió el mismo procedimiento pero con la enzima inactivada por una corta ebullición. Como estándar, se realizó una curva patrón con lipasa pancreática porcina tipo II (Sigma). Se definió una Unidad de Actividad lipásica como la hidrólisis de 1.0 microequivalente de ácidos grasos a partir de triglicéridos en 1 hora a pH 7.7 y 37°C.

El contenido en proteína de las muestras se determinó por el método Bradford (Bradford, 1976), usando albúmina sérica bovina como estándar.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm error estándar. Los datos se analizaron mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) usando el paquete estadístico SPSS 13.0 para Windows. Las diferencias significativas dentro de la misma especie en los distintos puntos de muestreo ($P < 0.05$) se determinó por el test de Duncan (Duncan, 1955).

Resultados

En los resultados obtenidos para la relación digestivo somática (Tabla 1) se aprecia una tendencia al decremento durante el periodo de ayuno en ambas especies, aunque esta disminución no es significativa. No se aprecian diferencias significativas para la relación digestivosomática (RDS) entre especies.

La actividad amilásica específica del tracto digestivo (Figura 1), muestra para ambas especies una disminución estadísticamente significativa a los 10 días de ayuno, y continúa en decremento durante todo el periodo. Tras la realimentación, la actividad amilasa sufre una ligera recuperación sólo en esturión sin llegar a alcanzar los valores iniciales.

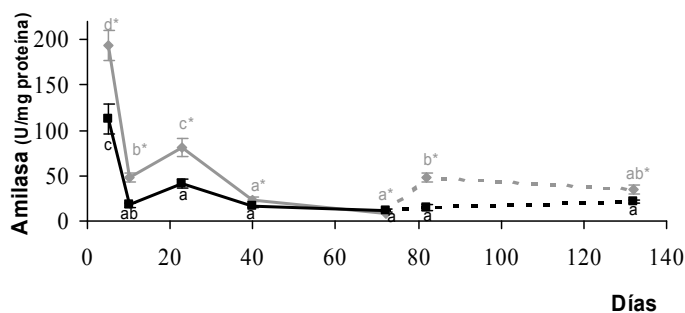


Figura 1. Evolución de la actividad amilasa específica durante el ayuno (línea continua) y la realimentación (línea discontinua) en el esturión (línea gris) y la trucha (línea negra). Diferencias significativas dentro de cada especie entre los distintos días de experimento se indican con letras diferentes. El asterisco indica diferencias significativas entre especies en un mismo punto de muestreo ($P < 0.05$).

Tabla 1. Parámetros biométricos para el esturión *A. naccarii* y la trucha *O. mykiss* durante un periodo de ayuno (A) y de realimentación (R).

Días	Peso de pez (g)			Peso del tracto digestivo (g)			RDS		
	Esturión	Trucha		Esturión	Trucha		Esturión	Trucha	
5A	584.40 ± 55.77 ^{a*}	248.40 ± 10.42 ^a		21.93 ± 2.76 ^{bc*}	10.12 ± 0.90 ^b		3.73 ± 0.24 ^{ab}	4.12 ± 0.46 ^b	
10A	502.25 ± 22.19 ^{a*}	254.20 ± 5.53 ^a		21.27 ± 2.17 ^{bc*}	8.76 ± 0.93 ^{ab}		4.23 ± 0.38 ^b	3.44 ± 0.32 ^{ab}	
23A	507.75 ± 32.92 ^{a*}	244.40 ± 6.77 ^a		22.18 ± 2.64 ^{abc*}	6.89 ± 0.94 ^{ab}		4.35 ± 0.43 ^{b*}	2.83 ± 0.40 ^a	
40A	567.40 ± 31.38 ^{a*}	234.80 ± 9.19 ^a		19.55 ± 1.38 ^{ab*}	7.04 ± 1.44 ^{ab}		3.44 ± 0.10 ^{ab}	3.03 ± 0.66 ^{ab}	
72A	475.80 ± 64.92 ^{a*}	252.60 ± 14.29 ^a		17.26 ± 3.15 ^{ab*}	6.61 ± 0.53 ^{ab}		3.71 ± 0.61 ^{ab}	2.62 ± 0.14 ^a	
10R	457.25 ± 58.23 ^{a*}	220.80 ± 10.54 ^a		13.35 ± 1.18 ^{a*}	5.16 ± 0.14 ^a		2.98 ± 0.30 ^{a*}	2.35 ± 0.10 ^a	
60R	751.00 ± 54.95 ^{b*}	643.00 ± 87.06 ^b		25.00 ± 2.72 ^{c*}	19.31 ± 2.92 ^c		3.32 ± 0.24 ^{ab}	3.09 ± 0.41 ^{ab}	

Los valores son media ± error estándar (n=5; número de peces por punto de muestreo)

RDS (Relación digestivosomática): (peso de tracto digestivo/peso de pez) x 100

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre puntos de muestreo para cada especie.

Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre especies en cada punto de muestreo.

Por otra parte, la actividad amilasa en esturión supera de forma estadísticamente significativa a la de la trucha en todo momento tanto durante el periodo de ayuno como en el de realimentación.

Por lo que respecta a la actividad proteasa total expresada por mg de proteína (Figura 2) sufre una disminución progresiva durante el periodo de ayuno, haciéndose significativo este decremento a partir del día 23 en la trucha y del 40 en el esturión y comienza a recuperarse durante la realimentación en ambas especies. Así mismo, la trucha presenta mayor actividad proteasa total que el esturión, existiendo diferencias significativas a los 5, 10 y 72 días de ayuno y a los 60 días de realimentación.

La actividad proteasa a distintos pHs sigue la misma tendencia que la actividad proteasa total, salvo a pH 4 donde los niveles encontrados en ambas especies son muy bajos, existiendo pocas variaciones tanto en ayuno como en realimentación (tablas 2 y 3)

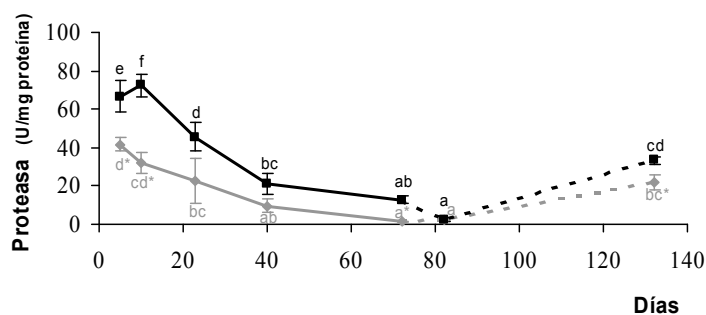


Figura 2. Evolución de la actividad proteasa específica durante el ayuno (línea continua) y la realimentación (línea discontinua) en el esturión *A. naccarii* (línea gris) y la trucha *O. mykiss* (línea negra). Diferencias significativas dentro de cada especie entre los distintos días de experimento se indican con letras diferentes. El asterisco indica diferencias significativas entre especies en un mismo punto de muestreo ($P < 0.05$).

De forma global, la actividad lipasa específica sigue una tendencia al decremento durante el ayuno, haciéndose estadísticamente significativa al final del mismo. Durante la realimentación no se recuperan los valores previos al ayuno prolongado en ninguna de las especies (Figura 3). Por último, existen diferencias significativas en los días 10 y 72 de ayuno en la actividad lipasa específica a favor de la trucha.

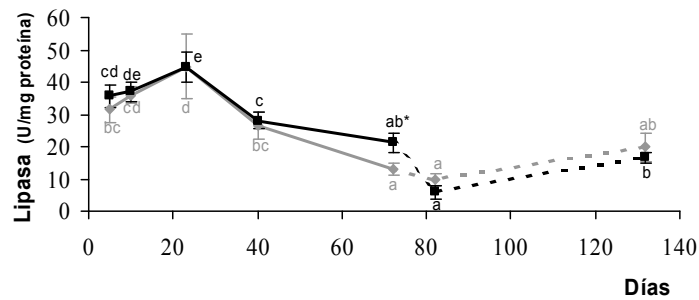


Figura 3. Evolución de la actividad lipasa específica durante el ayuno (línea continua) y la realimentación (línea discontinua) en el esturión *A. naccarii* (línea gris) y la trucha *O. mykiss* (línea negra). Diferencias significativas dentro de cada especie entre los distintos días de experimento se indican con letras diferentes. El asterisco indica diferencias significativas entre especies en un mismo punto de muestreo ($P < 0.05$).

Discusión

La utilización de las reservas energéticas durante el ayuno parece ser diferente en las distintas especies de peces. La estrategia metabólica utilizada para suministrar energía al organismo depende de varios factores tales como la especie, estado fisiológico del pez, condiciones ambientales, etc. Así, algunos peces usan la proteína como principal fuente energética manteniendo las reservas de glucógeno hepático por medio de la gluconeogénesis, mientras que otros peces usan los lípidos y las reservas de glucógeno en primer lugar (Alliot et al, 1984). Así mismo, no todos los tejidos corporales contribuyen con sus reservas del mismo modo, de esta manera, hay peces que tienen un importante acúmulo de reservas energéticas en los mesenterios, en el digestivo, otros en el hígado y otras a nivel muscular.

Los resultados encontrados en la RDS (Tabla 1) indican que el comportamiento de la trucha y del esturión a lo largo del ayuno y tras la realimentación es muy parecido, existiendo una tendencia general a una disminución durante el ayuno y una recuperación de los valores iniciales tras la realimentación y, aunque puede hablarse de diferencias significativas, podría admitirse que la disminución durante el ayuno podría

Tabla 2. Actividad proteasa a distintos pHs en el tracto digestivo del esturión *A. naccarii* durante un periodo de ayuno (A) y realimentación (R) expresada como U·mg proteína⁻¹.

Días	pH 1.5	pH 3	pH 4	pH 7	pH 8.5	pH 9	pH 10
5A	6.799 ± 0.529 ^{ct*}	7.388 ± 0.652 ^{dt*}	0.000 ± 0.000 ^{at*}	6.766 ± 0.425 ^d	7.214 ± 0.521 ^{ct*}	6.847 ± 0.633 ^{ct*}	6.997 ± 0.677 ^{ct*}
10A	4.409 ± 0.715 ^{bc*}	5.389 ± 1.013 ^{cd*}	0.480 ± 0.043 ^{b*}	4.808 ± 1.011 ^{cd*}	5.771 ± 0.992 ^{de*}	5.488 ± 0.802 ^{de*}	5.674 ± 0.885 ^{ct*}
23A	5.471 ± 2.544 ^{bc}	4.228 ± 2.261 ^c	1.046 ± 0.392 ^e	3.740 ± 2.147 ^{bc}	2.864 ± 1.939 ^{bc}	2.853 ± 1.789 ^{bc*}	2.648 ± 1.669 ^{b*}
40A	1.076 ± 0.564 ^d	1.337 ± 0.608 ^{ab}	0.359 ± 0.121 ^{ab}	1.361 ± 0.723 ^{ab}	1.886 ± 0.482 ^{abc}	1.791 ± 0.613 ^{ab*}	1.868 ± 0.470 ^{ab*}
72A	0.102 ± 0.017 ^{at*}	0.099 ± 0.040 ^{at*}	0.072 ± 0.025 ^{at*}	0.127 ± 0.038 ^{at*}	0.256 ± 0.099 ^{at*}	0.333 ± 0.151 ^{at*}	0.289 ± 0.133 ^d
10R	0.293 ± 0.029 ^d	0.286 ± 0.033 ^d	0.026 ± 0.007 ^d	0.208 ± 0.019 ^d	0.409 ± 0.039 ^d	0.488 ± 0.055 ^{ab}	0.454 ± 0.069 ^d
60R	3.131 ± 0.621 ^{ab*}	3.432 ± 0.594 ^{bc*}	0.483 ± 0.129 ^{ab}	2.835 ± 0.610 ^{abc*}	4.385 ± 0.933 ^{cd}	4.120 ± 0.709 ^{cd}	3.757 ± 0.610 ^{b*}

Los valores son media ± error estándar (n=5; número de peces por punto de muestreo)

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre puntos de muestreo para cada especie.

Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre especies en cada punto de muestreo.

Tabla 3. Actividad proteasa a distintos pHs en el tracto digestivo de la trucha *O. mykiss* durante un periodo de ayuno (A) y realimentación (R) expresada como U·mg proteína⁻¹.

Días	pH 1.5	pH 3	pH 4	pH 7	pH 8.5	pH 9	pH 10
5A	10.764 ± 1.079 ^{c*}	11.330 ± 1.332 ^{d*}	1.191 ± 0.220 ^{ab*}	9.467 ± 1.250 ^d	11.403 ± 1.386 ^{e*}	11.204 ± 1.521 ^{d*}	11.421 ± 1.244 ^{de*}
10A	14.516 ± 1.327 ^{d*}	14.415 ± 1.239 ^{e*}	2.932 ± 0.892 ^{c*}	12.870 ± 0.983 ^{e*}	8.474 ± 0.908 ^{de*}	8.864 ± 0.782 ^{d*}	10.495 ± 1.219 ^{e*}
23A	5.108 ± 1.176 ^b	6.873 ± 1.325 ^c	1.802 ± 0.500 ^b	5.260 ± 1.533 ^c	8.226 ± 1.770 ^d	9.183 ± 1.490 ^{d*}	9.240 ± 1.865 ^{d*}
40A	2.027 ± 0.960 ^a	2.935 ± 0.919 ^b	1.065 ± 0.445 ^{ab}	2.988 ± 1.382 ^{bc}	4.277 ± 1.071 ^{bc}	4.168 ± 0.840 ^{bc*}	3.840 ± 0.705 ^{bc*}
72A	1.291 ± 0.205 ^{a*}	1.646 ± 0.306 ^{b*}	0.530 ± 0.168 ^{ab*}	1.821 ± 0.313 ^{ab*}	2.381 ± 0.463 ^{ab*}	2.503 ± 0.472 ^{ab*}	2.493 ± 0.487 ^{ab}
10R	0.369 ± 0.064 ^a	0.326 ± 0.054 ^a	0.174 ± 0.097 ^a	0.256 ± 0.048 ^a	0.511 ± 0.113 ^a	0.382 ± 0.079 ^a	0.431 ± 0.119 ^a
60R	5.305 ± 0.404 ^{b*}	5.600 ± 0.343 ^{c*}	0.648 ± 0.154 ^{ab}	5.282 ± 0.301 ^{c*}	5.353 ± 0.340 ^c	5.640 ± 0.377 ^c	5.560 ± 0.407 ^{c*}

Los valores son media ± error estándar (n=5; número de peces por punto de muestreo)

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre puntos de muestreo para cada especie.

Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre especies en cada punto de muestreo.

indicar una movilización más rápida de las reservas energéticas procedentes del digestivo con respecto al conjunto de la masa corporal. Algo similar ha sido puesto de manifiesto por otros autores en el esturión blanco (*Acipenser transmontanus*) (Hung et al., 1997) y en la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Storebakken et al., 1991). Así mismo, aunque no hay diferencias significativas en la RDS entre ambas especies, los valores obtenidos insinúan una mayor tendencia a la movilización de la reserva energética perivisceral en la trucha con respecto al esturión. Resultados sobre estudios del metabolismo en ambas especies nos indican que, en el caso del tejido muscular y hepático, existe mayor predisposición a la movilización energética durante el ayuno en los del esturión.

Desde una perspectiva global, la trucha presenta una mayor actividad proteásica que el esturión (Figura 3). Por el contrario, la actividad amilásica es más alta en esturión que en trucha (Figura 1). De esta manera, se confirma la mayor capacidad de digestión de hidratos de carbono del esturión con respecto a la trucha (Furné et al., 2005), catalogándolo como un animal con hábitos más cercanos a la omnivoría. Varios estudios han demostrado que la actividad amilásica es mayor en especies de peces omnívoras y herbívoras que en carnívoras (Fänge y Grove, 1979; Ugolev et al., 1983; Sabapathy y Teo, 1993; Hidalgo et al., 1999).

De manera general, los resultados obtenidos en las distintas actividades enzimáticas a los 5 días de ayuno son muy parecidos a los obtenidos en un trabajo anterior (Furné et al., 2005) donde se analizaba la maquinaria enzimática digestiva a las 48 horas de ayuno en ambas especies. Ello equivaldría a decir que en este periodo de tiempo (5 días) el animal estaría preparado para digerir el alimento con la misma efectividad que en estado de alimentación continua.

El ayuno provoca una reducción en la actividad amilásica de forma más temprana que en la actividad proteásica (Figura 1 y 3). Así, a los 10 días de ayuno hay una reducción en la actividad amilásica superior al 50%, siendo del 80% a los 72 días en ambas especies. Sin embargo, la actividad proteásica a los 10 días no sufre cambios en la trucha, y en el esturión disminuye pero de forma no significativa. Tan solo a los 23 días para la trucha y a los 40 días para el esturión la reducción en dicha actividad alcanza valores inferiores al 50%.

Al final del periodo de realimentación hay una recuperación de la actividad proteásica de forma más evidente que la amilásica en ambas especies. Tras 60 días de realimentación aún no se ha recuperado la actividad amilásica específica en ninguna de las dos especies, aunque a los 10 días de realimentación en el esturión se observa un mayor incremento en la actividad amilásica que en la trucha.

El mantenimiento de la capacidad de digerir proteínas aún en estado avanzado de ayuno y la recuperación de esta capacidad de forma relativamente rápida después de un ayuno prolongado, facultaría a los peces para la digestión del nutriente principal de su dieta que es la proteína, en cualquier momento. A este respecto, Gildberg (2004) encuentra una alta actividad proteásica en el bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) tras 25 días de ayuno e indica las ventajas nutritivas que ello puede suponer para el animal.

Los resultados obtenidos al determinar la actividad digestiva proteásica a distinto pH (Tablas 3 y 4) muestran que las glándulas gástricas responsables de la secreción proteásica ácida, el páncreas y los propios enterocitos responsables de la secreción proteásica neutro-alcalina, sufren una reducción en su actividad ante el ayuno y un aumento tras la realimentación de forma semejante.

Los cambios ocurridos en la actividad lipásica durante el ayuno (Figura 2) son similares a los mostrados en la actividad proteásica, en cuanto a que el decremento en dicha actividad es más tardío, haciéndose estadísticamente significativo a partir de los 40 días de ayuno. Por otra parte, aparece una mayor tendencia a la disminución de la actividad lipásica en el esturión que en la trucha. Esta circunstancia estaría de acuerdo con resultados anteriores (Furné et al., 2005) y confirmaría lo expuesto por Chakrabarti et al. (1995) acerca de la necesidad de una buena actividad lipásica en peces carnívoros. La realimentación induce un incremento en dicha actividad, pero no se puede hablar de recuperación con respecto a los valores iniciales.

En resumen, podemos destacar que:

- Globalmente, el comportamiento de la maquinaria digestiva del esturión con respecto a la de la trucha es muy parecida ante el ayuno de 72 días y ante los 60 días de posterior alimentación.

- Por las proporciones relativas de las actividades de las enzimas digestivas amilásicas y proteásicas, el esturión se muestra como un pez omnívoro y diferente de un carnívoro como la trucha.

- El ayuno provoca en el esturión y la trucha una reducción, aunque no significativa, del peso y, por consiguiente, de las reservas energéticas proporcionalmente mayor en el tubo digestivo que en el animal completo, siendo este hecho más marcado en la trucha.

- La actividad de las enzimas digestivas comienza a reducirse a partir de la segunda semana de ayuno, tanto en el esturión como en la trucha

- En el esturión y en la trucha, las actividades proteásica y lipásica se ven afectadas de forma más tardía que la actividad amilásica como consecuencia del ayuno. Aún, tras un mes de ayuno, ambas especies estarían preparadas para digerir la proteína y los lípidos de forma efectiva.

- Después de un periodo de 72 días de ayuno la maquinaria digestiva del esturión y de la trucha se ve alterada en su capacidad para digerir los macronutrientes.

- La capacidad de digerir proteínas y lípidos tras 60 días de realimentación, y después de un periodo de 72 días de ayuno, comienza a restablecerse en el esturión y en la trucha. Por el contrario, la capacidad para digerir carbohidratos aún permanece disminuida en ambas especies.

- A efectos prácticos, para un mejor aprovechamiento del alimento dispensado y un mayor rendimiento del cultivo, la reintroducción de alimento en los peces después de un periodo prolongado de ayuno debería hacerse de forma gradual.

IV-1.3. CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos al determinar las enzimas digestivas en el esturión *Acipenser naccarii* y en la trucha *Onchorynchus mykiss* nos indican que:

- 1.- El esturión no solo estaría preparado para digerir la grasa y la proteína como cualquier pez carnívoro como la trucha, sino que también el *pool* enzimático amilásico lo capacitaría para digerir los hidratos de carbono a niveles característicos de un omnívoro.
- 2.- La proporción de enzimas proteásicas ácidas en el esturión indica la necesidad de una importante digestión gástrica.
- 3.- La actividad de las enzimas digestivas comienza a reducirse a partir de la 2ª semana de ayuno en ambas especies.
- 4.- Como consecuencia del ayuno, en ambas especies, la capacidad de digerir hidratos de carbono se ve alterada en mayor medida que la de proteínas y lípidos, no sólo por la más temprana reducción de la actividad amilásica sino también por la más tardía recuperación de la misma después de la realimentación. Al mes de ayuno ambas especies estarían preparadas para digerir proteína y lípidos de forma efectiva. A los 60 días de realimentación, después de un periodo de 72 días de ayuno, la capacidad de digerir proteínas y lípidos comienza a restablecerse, mientras que la capacidad para digerir carbohidratos aún se ve mermada.
- 5.- Después de un periodo de 72 días de ayuno la maquinaria digestiva del animal se ve alterada en su capacidad para digerir los macronutrientes por lo que, a efectos prácticos y para un mejor aprovechamiento del alimento dispensado, la reintroducción de alimento debería hacerse de forma gradual.

**IV-2. ESTUDIO COMPARADO DE ENZIMAS DEL
METABOLISMO INTERMEDIARIO EN EL
ESTURIÓN *Acipenser naccarii* Y EN LA TRUCHA
Oncorhynchus mykiss.**

IV-2.1. ACTIVIDADES DE ENZIMAS DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO EN EL ESTURIÓN *Acipenser naccarii* Y EN LA TRUCHA *Oncorhynchus mykiss*. ESTUDIO COMPARADO.

Resumen

En el presente estudio se analizó la organización metabólica del esturión *A. naccarii*, comparándolo con la trucha *O. mykiss* a través de la determinación de la actividad de enzimas clave de las principales vías metabólicas en hígado, músculo blanco, corazón y branquias. Así mismo, se evaluaron niveles de metabolitos plasmáticos y el contenido de proteína, lípidos y glucógeno en hígado y músculo blanco. En términos generales, el carácter epibentónico de *A. naccarii* se ve reflejado en la menor actividad específica de la mayoría de las enzimas evaluadas, en comparación con la mayor actividad de estas en *O. mykiss*. No obstante, la organización metabólica de esta especie de esturión muestra algunas particularidades que lo diferencian claramente de los teleósteos. Mientras que el hígado es el principal órgano gluconeogénico en trucha, en esturión, tanto el hígado como el músculo blanco poseen la misma capacidad para sintetizar glucosa, siendo el glicerol el precursor más propicio. A diferencia de los teleósteos, el hígado es el principal órgano de almacen de lípidos en el esturión, lo cual está relacionado con la menor capacidad de transporte de lípidos plasmáticos. Aunque la capacidad para transportar ácidos grasos libres es menor en el esturión que en la trucha, la actividad HOAD muestra que los acipenséridos son capaces de oxidar ácidos grasos en tejidos extrahepáticos como el corazón. El hígado del esturión posee una mayor capacidad para sintetizar cuerpos cetónicos que el de la trucha, lo cual podría ser un carácter primitivo surgido de la necesidad de transportar estos combustibles a tejidos periféricos debido a la baja capacidad de transporte de ácidos grasos en plasma.

Introducción

Los esturiones son el único miembro de un grupo primitivo de peces, los condrósteos, que aún sobreviven en la actualidad. Su interés radica tanto en aspectos biológicos, por su posición evolutiva intermedia entre elasmobranquios y teleósteos, como por su valor

comercial debido al alto precio de su carne y del caviar. Puesto que los esturiones en su medio natural se encuentran en peligro de extinción, la mayoría de los esfuerzos se focalizan en programas de conservación, en los cuales la acuicultura juega un papel crucial.

El establecimiento de un régimen óptimo de alimentación es el principal aspecto a solventar para la producción exitosa de una nueva especie en acuicultura, puesto que el suministro de un alimento equilibrado nutricionalmente, es de gran importancia para el crecimiento adecuado del animal, la reproducción y la salud. La consecución de este objetivo es posible a través del conocimiento profundo de los procesos fisiológicos que regulan la asimilación del alimento y, en este sentido, el conocer la organización metabólica de la especie puede ser esencial.

Estudios realizados por Singer et al. (1990) han puesto de manifiesto que la organización metabólica del esturión de lago (*Acipenser fulvescens*) es intermedia entre la de elasmobranquios y teleósteos, dos grupos filogenéticamente muy distantes con marcadas diferencias en su organización metabólica, sobre todo en el metabolismo de lípidos y cuerpos cetónicos (Zammit y Newsholme, 1979; Singer y Ballantyne, 1989).

El esturión *Acipenser naccarii* es una de las especies en peligro de extinción (Bronzi et al. 2005). En la actualidad, esta especie de esturión está siendo cultivada en Italia y España. Estudios recientes han puesto de manifiesto que la distribución histórica de esta especie incluía algunos ríos españoles (Garrido-Ramos et al., 1997; Hernando et al., 1999; De la Herrán et al., 2004) por tanto, la importancia de su cultivo en nuestro país es significativo para las políticas de conservación.

La biología de *Acipenser naccarii* está poco investigada. Los estudios llevados a cabo con esta especie de esturión se han centrado en adaptaciones morfológicas y fisiológicas como consecuencia de cambios en la salinidad ambiental (Cataldi et al., 1995, 1999; McKenzie et al., 1999, 2001a,b; Martínez-Álvarez et al., 2002, 2005; Carmona et al., 2004), ontogénesis de varios órganos (Cataldi et al., 2002; Vázquez et al., 2002; Grande y Chicca, 2004; Icardo et al., 2004), algunos aspectos relacionados con la alimentación y nutrición (Agradi et al., 1993; Soriguier et al., 2002), y las capacidades digestivas

(Furné et al., 2005, 2008; Llorente et al., 2005) y antioxidantes (Trenzado et al., 2006), pero no existen estudios concernientes a su metabolismo.

El objetivo del presente estudio fue analizar la organización metabólica del esturión *A. naccarii* y compararla con la trucha *O. mykiss*, uno de las primeras especies cultivadas y cuya organización metabólica ha sido extensamente estudiada. Con este propósito se ha analizado en ambas especies la actividad de enzimas clave de las principales vías metabólicas en hígado, músculo blanco, corazón y branquias. Así mismo, se han evaluado niveles de metabolitos plasmáticos y contenido de proteína, lípidos y glucógeno en hígado y músculo blanco.

Este estudio es el primero referente a la organización metabólica de *Acipenser naccarii*. Teniendo en cuenta la posición que el esturión ocupa en la evolución de los vertebrados, este estudio comparativo contribuiría al entendimiento de la evolución del metabolismo de peces. Además, el incremento del conocimiento sobre la organización metabólica de esta especie proporcionaría información provechosa para el cultivo y el desarrollo de programas de recuperación.

Material y métodos

Animales de experimentación

Como animales de experimentación se usaron 10 esturiones de la especie *Acipenser naccarii* de edad 1+ y 656.15 ± 15.00 g de peso medio y 10 truchas de la especie *Oncorhynchus mykiss* de edad 1+ y 289.5 ± 5.0 g de peso medio. Ambas especies procedían de la piscifactoría Sierra Nevada S.L. (Riofrío, Granada). Las condiciones de mantenimiento y alimentación fueron propias del régimen de piscifactoría. Ambos animales se alimentaron con la misma dieta artificial (Le Gouessant, Francia), con una composición química aproximada de 48% de proteína, 14% de lípidos, 11,4% de cenizas y 15% de carbohidratos.

Toma de muestras

Previo sacrificio de los animales se tomaron muestras de sangre de la vena caudal usando jeringas heparinizadas. Las muestras se mantuvieron en hielo hasta su centrifugación. Posteriormente, se extrajo el hígado, arcos branquiales, el corazón y una porción de músculo blanco de la región dorsal. Las muestras fueron introducidas rápidamente en nitrógeno líquido. La conservación se realizó a -80°C hasta posterior tratamiento y análisis.

Tratamiento de las muestras

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 650 g durante 10 minutos para separar el plasma, el cual se mantuvo a -80 °C hasta la determinación de metabolitos.

Las muestras de tejidos tomadas de todos los animales fueron homogeneizadas. Para ello se usó un tampón Tris-HCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, tritón X-100 0.1 %, pH 7.8, en una proporción 1 g de tejido en 9 ml de tampón.

Los homogeneizados fueron sometidos a una centrifugación de 30000 g durante 30 minutos a 4°C en una centrifuga “Kontron” mod. Centrikon H-401. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante que fue congelado a -80°C hasta su posterior análisis.

Para la determinación del glucógeno, las muestras de hígado y músculo fueron homogeneizadas en agua purificada muy fría en proporción 1:5 (p/v) y congeladas a -80°C hasta su posterior análisis.

Métodos analíticos

Los niveles de glucosa plasmática fueron determinados usando un test enzimático-colorimétrico basado en el método de la glucosa oxidasa (Labkit 30236). Los lípidos totales, los triglicéridos, el colesterol total, el colesterol HDL y LDL se determinaron usando tests colorimétricos (Labkit 30345, 30360, 30184, 30189, 30181). La concentración de proteína en plasma y en los extractos de tejido se analizó siguiendo el

método de Bradford (1976), usando albúmina sérica bovina como estándar. La extracción de lípidos totales de hígado y músculo se realizó usando el método de Soxhlet. El glucógeno muscular y hepático se determinó según el ensayo de la glucosa, previa rotura del glucógeno por adición de amiloglucosidasa (Roehrig y Alfred (1974).

Determinaciones enzimáticas

Todas las determinaciones enzimáticas se llevaron a cabo a $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ usando un espectrofotómetro de microplacas PowerWave_x. Las concentraciones de sustratos y proteínas óptimas para la medida de la actividad máxima de cada enzima, en cada tejido y para cada especie se establecieron mediante ensayos preliminares. Las reacciones enzimáticas se iniciaron por la adición del extracto de tejido.

Para la determinación de la mayoría de las actividades enzimáticas se registraron los cambios de absorbancia del NADH o NADPH a 340 nm (coeficiente de extinción molar $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La actividad citrato sintasa se determinó registrando la reducción del DTNB (ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) a 412 nm (coeficiente de extinción molar, $13.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La actividad acetoacetylCoA tiolasa se determinó a 313 nm (coeficiente de extinción molar, $20.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Las actividades enzimáticas se expresaron en mU: miliunidades (nmol de sustrato transformado por minuto) por mg de proteína.

Las condiciones de ensayo, en un volumen final de 200 μl fueron las siguientes:

Piruvato quinasa (PK; EC 2.7.1.40): tampón imidazol-HCl 50 mM pH 7.4, KCl 100 mM, MgCl_2 5 mM, ADP 1 mM, NADH 0.15 mM, 2 unidades $\cdot\text{ml}^{-1}$ LDH, fosfoenolpiruvato 2 mM.

Fructosa 1,6-bifosfatasa (FBPasa; EC 3.1.3.11): tampón imidazol-HCl 50 mM pH 7.4, MgCl_2 5 mM, 2-mercaptoetanol 12 mM, NADP 0.5 mM, G6PDH 2 unidades $\cdot\text{ml}^{-1}$, PGI 2 unidades $\cdot\text{ml}^{-1}$, Fructosa 1,6-difosfato 0.5 mM en trucha y 0.75 mM en esturión.

Lactato deshidrogenasa (LDH; EC 1.1.1.27): tampón imidazol-HCl 50 mM pH 7.4, NADH 0.16 mM, piruvato 1 mM.

Glicerol quinasa (GK; EC 2.7.1.30) tampón imidazol-HCl 50 mM pH 7.4, MgCl₂, ATP 5 mM, PEP 10 mM, NADH 0.75 mM, LDH 4 unidades·ml⁻¹, PK 4 unidades·ml⁻¹, glicerol 2.5 mM.

3-Hidroxiacil CoA deshidrogenasa (HOAD; EC 1.1.1.35): tampón imidazol-HCl 50 mM pH 8, NADH 0.1 mM, acetoacetil CoA 0.2 mM.

Citrato sintasa (CS; EC 4.1.3.7): tampón imidazol-HCl 50 mM pH 8, DTNB 0.1 mM, acetil CoA 0.2 mM, oxalacetato 0.2 mM.

Enzima málico (EM; EC 1.1.1.40) tampón imidazol-HCl pH 7.4, MgCl₂ 5 mM, NADP 0.4 mM, l-malato 2 mM en esturión y 4 mM en trucha.

Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH; EC 1.1.1.49): tampón imidazol-HCl 50 mM pH 7.4, MgCl₂ 5 mM, NADP 2 mM, glucosa 6-fosfato 1 mM.

Glutamato oxalacetato transaminasa (GOT; EC 2.6.1.1): tampón imidazol-HCl 50 mM pH 7.4, α-cetoglutarato 10 mM, NADH 0.3 mM, piridoxal fosfato 0.05 mM, MDH 3 unidades·ml⁻¹, L-aspartato 25 mM.

Glutamato piruvato transaminasa (GPT; EC 2.6.1.2): tampón imidazol-HCl 50 mM pH 7.4, α-cetoglutarato 10 mM, NADH 0.3 mM, piridoxal fosfato 0.05 mM, LDH 2 unidades·ml⁻¹, L-alanina 25 mM.

Glutamato deshidrogenasa (GDH; EC 1.4.1.2): tampón imidazol-HCl 50 mM pH 8, NADH/ADP 0.2/0.1 mM, acetato amónico 100 mM, LDH 2 unidades·ml⁻¹, α-cetoglutarato 10 mM.

Acetoacetil CoA tiolasa (ACoAT; EC 2.3.1.9): tampón imidazol-HCl 50 mM pH 8, MgCl₂ 5 mM, acetoacetil CoA 0.14 mM, CoA 0.24 mM.

β-hidroxiacil CoA deshidrogenasa (β-OHBDH; EC 1.1.1.30): tampón imidazol-HCl pH 8, NADH 0.1 mM, acetoacetato 2 mM.

Análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron como media \pm error estándar. Los datos fueron analizados por el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) usando el paquete estadístico SPSS 13.0 para Windows.

Resultados*Metabolitos plasmáticos y tisulares*

Los metabolitos plasmáticos se expresan en la tabla 1. A excepción de los niveles de triglicéridos en plasma, donde los valores para trucha y esturión son muy similares, en el resto de metabolitos determinados, los valores en trucha superan significativamente a los de esturión.

Tabla 1. Metabolitos plasmáticos en el esturión *A. naccarii* y la trucha *O. mykiss* ($\text{mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$)

($\text{mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$)	Esturión	Trucha
Proteínas	1821.8 \pm 158.4*	4906.6 \pm 172.8
Glucosa	42.2 \pm 3.2*	96.0 \pm 7.6
Lípidos totales	565.0 \pm 37.6*	1388.4 \pm 79.5
Triglicéridos	377.9 \pm 28.7	383.1 \pm 41.2
Colesterol total	82.0 \pm 4.8*	313.5 \pm 12.5
HDL colesterol	11.1 \pm 1.7*	109.9 \pm 6.2
LDL colesterol	35.3 \pm 2.1*	204.9 \pm 7.1

Los valores son media \pm error estándar. (n=10) * Diferencias significativas entre especies para un mismo parámetro ($P < 0.05$).

En la tabla 2 se resumen los metabolitos tisulares en hígado y músculo de ambas especies de peces. Los niveles de glucógeno hepático en músculo son significativamente superiores en trucha que en esturión, mientras que los lípidos hepáticos son significativamente superiores en esturión que en trucha. Por otro lado, en músculo no existen diferencias significativas entre ambas especies.

Finalmente, el nivel de proteínas solubles es semejante en ambas especies y para ambos tejidos.

Tabla 2. Composición de hígado y músculo blanco en el esturión *A. naccarii* y la trucha *O. mykiss*.

	Hígado (% Peso fresco)		Músculo (% Peso fresco)	
	Esturión	Trucha	Esturión	Trucha
Proteína	11.09 ± 0.50	12.75 ± 1.31	5.41 ± 0.63*	7.03 ± 0.52
Lípidos totales	42.77 ± 1.82*	5.10 ± 0.31	21.43 ± 2.13	17.32 ± 1.29
Glucógeno	4.61 ± 0.42*	8.13 ± 0.67	0.37 ± 0.09*	0.98 ± 0.16

Los valores son media ± error estándar. (n=10) * Diferencias significativas entre especies para un mismo parámetro ($P < 0.05$).

Enzimas clave del metabolismo intermediario

Las actividades específicas de las distintas enzimas del metabolismo intermediario en los diferentes tejidos quedan reflejadas en las tablas 3 y 4

Tabla 3. Actividad específica de enzimas claves del metabolismo intermediario en el hígado y músculo blanco del esturión *A. naccarii* y la trucha *O. mykiss*.

	Hígado		Músculo blanco	
	Esturión	Trucha	Esturión	Trucha
FBPasa	13.16 ± 1.81*	21.68 ± 1.98	12.96 ± 1.33	11.26 ± 1.21
PK	43.32 ± 6.89	47.69 ± 7.40	1960.3 ± 31.18*	4910.9 ± 274.4
LDH	86.23 ± 12.44*	848.33 ± 101.99	512.36 ± 93.35*	12924.2 ± 1218.7
GPT	113.58 ± 12.35*	310.69 ± 23.30	31.73 ± 2.40*	18.24 ± 1.95
GOT	269.3 ± 38.8*	497.7 ± 54.7	277.93 ± 34.46	277.14 ± 28.34
GDH	129.45 ± 29.38	181.29 ± 27.59	36.67 ± 7.42	23.12 ± 6.81
G6PDH	7.19 ± 0.92*	71.89 ± 9.96	1.08 ± 0.30	1.04 ± 0.23
ME	4.55 ± 0.82*	38.70 ± 4.71	1.13 ± 0.13*	8.24 ± 0.85
CS	16.14 ± 1.91*	23.23 ± 1.37	40.11 ± 2.41*	50.02 ± 2.91
GK	4.75 ± 1.04	3.05 ± 0.26	5.47 ± 0.88	6.29 ± 0.89
HOAD	33.73 ± 2.63	32.13 ± 3.02	10.35 ± 0.75	10.40 ± 1.12
ACoAT	47.42 ± 5.86*	27.07 ± 2.96	1.89 ± 0.31	1.31 ± 0.14
β-OHBDH	3.38 ± 0.43*	0.92 ± 0.15	0.94 ± 0.24	0.45 ± 0.10

Los valores son media ± error estándar y se expresan como mU·mg proteína⁻¹ (n=10). * Diferencias significativas entre especies para una misma actividad enzimática en cada tejido ($P < 0.05$).

Metabolismo glucídico

La actividad PK fue superior en músculo blanco y corazón en ambas especies, mientras que el hígado mostró la menor actividad. Sólo existieron diferencias significativas entre especies en músculo blanco y corazón, en ambos casos la actividad enzimática fue mayor en la trucha que en el esturión.

Referente a la actividad FBPasa ésta fue superior en el hígado de ambas especies con respecto al resto de tejidos. Comparando entre especies, la actividad fue significativamente superior en esturión en músculo blanco, mientras que la trucha presentó mayor actividad de manera significativa que el esturión en el corazón e hígado. En el tejido branquial no se apreciaron diferencias significativas entre especies.

El enzima LDH tuvo mayor actividad en músculo blanco y corazón en ambas especies, mientras que la menor actividad estuvo presente en hígado. En todos los tejidos ensayados, la actividad LDH fue superior de manera significativa en la trucha con respecto al esturión.

Metabolismo lipídico

La G6PDH mostró una mayor actividad en el hígado en comparación con el resto de tejidos, los cuales mostraron valores similares. La trucha mostró significativamente mayor actividad que el esturión a nivel hepático, mientras que en el resto de tejidos no se apreciaron diferencias significativas entre ambas especies.

La actividad del EM fue superior en tejido cardíaco de ambas especies con respecto al resto de tejidos. En músculo blanco, corazón e hígado, la actividad en trucha fue superior de manera significativa a la presente en esturión. Por otro lado, en branquias, fue el esturión el que mostró significativamente una mayor actividad.

Se observó una mayor actividad de la HOAD en corazón de ambas especies, seguida de hígado, branquias y músculo. La actividad fue significativamente superior en trucha con respecto a esturión sólo en corazón y branquias.

Tabla 4. Actividad específica de enzimas claves del metabolismo intermediario en el corazón y branquias del esturión *A. naccarii* y la trucha *O. mykiss*.

	Corazón		Branquias	
	Esturión	Trucha	Esturión	Trucha
FBPasa	4.12 ± 0.39*	8.92 ± 1.00	2.46 ± 0.59	2.99 ± 0.53
PK	1013.6 ± 55.4*	2015.0 ± 125.6	256.07 ± 47.55	257.69 ± 45.33
LDH	1707.4 ± 182.78*	4198.3 ± 532.16	-	-
GPT	27.66 ± 3.43	28.83 ± 2.67	17.45 ± 2.64	21.96 ± 1.77
GOT	1040.9 ± 92.5*	1779.1 ± 154.2	197.26 ± 19.76	235.87 ± 17.02
GDH	163.30 ± 16.77	138.35 ± 26.28	-	-
G6PDH	1.15 ± 0.14	2.79 ± 0.42	2.29 ± 0.61	3.17 ± 1.01
ME	31.31 ± 3.42*	60.59 ± 6.81	7.66 ± 0.97*	4.03 ± 0.91
CS	145.27 ± 9.81*	216.84 ± 17.88	81.49 ± 7.71	86.97 ± 7.67
GK	3.20 ± 0.41*	9.01 ± 0.97	2.74 ± 0.96	4.22 ± 0.56
HOAD	68.45 ± 4.45*	116.95 ± 8.30	19.68 ± 1.48*	26.33 ± 1.81
ACoAT	18.95 ± 1.86	19.23 ± 1.38	3.09 ± 0.46	1.94 ± 0.57
β-OHBDH	1.26 ± 0.10*	2.28 ± 0.24	0.41 ± 0.08	1.75 ± 0.38

Los valores son media ± error estándar y se expresan como mU·mg proteína⁻¹ (n=10). * Diferencias significativas entre especies para una misma actividad enzimática en cada tejido ($P < 0.05$).

Para la actividad GK no se aprecian diferencias entre tejidos en ninguna de las especies. Sólo existen diferencias significativas entre especies en músculo cardiaco, siendo la actividad superior en trucha.

Metabolismo de aminoácidos

Tanto en esturión como en trucha, el hígado reflejó la mayor actividad GPT con respecto al resto de tejidos. Comparando entre especies, el hígado de trucha y el músculo de esturión mostraron mayor actividad de manera significativa. En el resto de tejidos no hubo diferencias significativas entre especies.

La actividad GOT fue superior en corazón de ambas especies con respecto al resto de tejidos. Sólo hígado y corazón mostraron diferencias significativas entre especies, siendo superior la actividad enzimática en trucha.

La mayor actividad GDH se encontró en el hígado para la trucha y en el corazón para el esturión, mientras que el músculo mostró los valores más bajos para ambas especies. No se apreciaron diferencias significativas entre especies en ninguno de los tejidos.

Metabolismo oxidativo

En ambas especies, la CS mostró una mayor actividad en corazón, seguida de branquias, músculo e hígado. A excepción de las branquias, el resto de tejidos muestra significativamente mayor actividad en trucha que en esturión.

Metabolismo de cuerpos cetónicos

La actividad ACoAT fue superior en hígado, seguida de corazón, mientras que el músculo y branquias mostraron las menores actividades en ambas especies. Solo se apreciaron diferencias significativas entre especies a nivel hepático, siendo la actividad enzimática superior en el esturión.

La β -OHBDH presentó una actividad similar en todos los tejidos de las dos especies estudiadas. En el hígado del esturión, la actividad enzimática fue significativamente superior a la del hígado de trucha. Por otro lado, existieron diferencias significativas entre especies en corazón y branquias, siendo la actividad superior en trucha. En el músculo no existieron diferencias significativas entre especies.

Discusión

La presencia de particularidades fisiológicas en acipenséridos, intermedias entre teleósteos y elasmobranquios, ya ha sido puesto de manifiesto por algunos autores (Ballantyne, 1997). No obstante, las investigaciones sobre el metabolismo de este grupo ancestral de peces son escasas. El descenso de las poblaciones naturales de la mayoría de los acipenséridos ha incrementado los esfuerzos para conseguir su cultivo, y conocer las particularidades metabólicas de cada especie de esturión es esencial para establecer un régimen de alimentación óptimo que posibilite el mismo. *Acipenser naccarii* es una

especie catalogada como en peligro de extinción y el objetivo del presente estudio fue investigar su perfil metabólico desconocido hasta la fecha.

Los resultados obtenidos al determinar la enzima glucolítica PK muestran que es el tejido muscular, y especialmente el cardiaco, el que está más capacitado para la utilización de los carbohidratos como fuente mayoritaria de energía en las dos especies objeto de estudio, el esturión y la trucha (Tablas 3-5). Estos resultados están de acuerdo con lo manifestado por otros autores para *Acipenser fulvescens* (Singer et al., 1990; Singer y Ballantyne, 1990). Así mismo, los resultados para la actividad LDH indican que el músculo blanco de ambas especies posee la mayor capacidad para utilizar glucosa vía anaerobia, aunque esta capacidad es menor en el esturión *A. naccarii*, de acuerdo con lo expuesto por Singer et al., (1990). Además, la relación LDH:CS es menor en esturión que en trucha, siendo la diferencia más pronunciada en músculo e hígado, lo cual podría indicar una menor capacidad anaeróbica del esturión (Tabla 5). Este hecho contradice la tolerancia a la anoxia de los esturiones, pero esta de acuerdo con lo expuesto por Singer y Ballantyne (2004) que argumentan una baja tasa metabólica en los esturiones y una fermentación alternativa de carbohidratos para sobrevivir bajo condiciones de anoxia evitando la acidosis láctica.

En cuanto a la gluconeogénesis, los resultados muestran que la actividad FBPasa es máxima en el hígado de trucha, mientras que la capacidad gluconeogénica en el esturión es similar en hígado y en músculo blanco. Varios trabajos han demostrado que el hígado es el principal lugar gluconeogénico en los peces (Singer et al., 1990, Moon y Mommsen, 1987; Singer y Ballantyne, 1989; Suárez y Mommsen, 1987), pero nuestros resultados parecen indicar que el músculo blanco del esturión también juega un papel importante en la síntesis de glucosa. Aunque las investigaciones concernientes a la capacidad gluconeogénica de acipenséridos son escasas, Kieffer et al. (2001) encontraron una recuperación más temprana de los depósitos de glucógeno muscular en el esturión *A. brevirostrum* que en teleósteos tras un ejercicio intenso. Los autores indicaron que el lactato muscular no participaba en el proceso, sino que serían otros sustratos no determinados los que actuarían como precursores en la gluconeogénesis muscular. Además, en un estudio con lampreas (*Lamprea fluviatilis*) Zavina y Woitczak (1977) constataron una alta capacidad gluconeogénica a partir de glicerol en el músculo blanco de esta especie, lo que podría jugar un papel importante en la recuperación del

glucógeno en este tejido durante el periodo de migración. El ciclo de vida de *Acipenser naccarii*, una especie anádroma, incluye un largo periodo de migración, y nuestros resultados parecen indicar que este esturión podría poseer una alta capacidad gluconeogénica en el músculo blanco, siendo el glicerol el precursor más probable basándonos en la actividad GK. Con respecto a los posibles precursores para la síntesis hepática de glucosa, la actividad de las enzimas GPT y GOT indican que alanina y aspartato podrían estar siendo usados como sustratos gluconeogénicos en el hígado de ambas especies, aunque el glicerol también parece ser usado, aunque en menor medida, como precursor gluconeogénico.

Tabla 5. Relaciones entre distintas enzimas del metabolismo intermediario en el esturión *A. naccarii* y trucha *O. mykiss* en hígado, músculo blanco y corazón.

	Hígado		Músculo blanco		Corazón	
	Esturión	Trucha	Esturión	Trucha	Esturión	Trucha
GOT/GPT	2.37	1.60	8.76	15.20	37.63	61.71
HOAD/CS	2.09	1.38	0.26	0.21	0.47	0.54
PK/CS	2.68	2.05	48.88	98.18	6.98	9.29
LDH/CS	5.34	36.51	12.78	258.38	11.75	19.36
GOT/CS	16.68	21.42	6.93	5.54	7.17	8.20

La menor capacidad general de glucólisis y gluconeogénesis en el hígado de esturión con respecto a la trucha está de acuerdo con los menores depósitos de glucógeno hepático así como con la menor glucemia observada en esturión. Niveles similares de glucosa plasmática han sido encontrados en otras especies de esturiones (Maxime et al., 1995; Hung et al., 1997; Cataldi et al., 1998; Di Marco et al., 1999; Barton et al., 2000; Bélanger et al., 2001; Kieffer et al., 2001; Baker et al., 2005).

En referencia al metabolismo oxidativo, los resultados para la actividad CS indican que el corazón es el principal tejido aeróbico en ambas especies, como ha sido constatado para todos los peces. El esturión es un pez epibentónico y menos activo que la trucha; así, se ha encontrado que el consumo de oxígeno en el esturión del Atlántico (*A. oxyrinchus*) y el esturión hociquicorto (*A. brevirostrum*) es del 10 al 20% inferior que en la trucha arcoiris (Kieffer et al., 2001). Esta menor actividad del animal está de acuerdo con la menor actividad CS observada en tejidos de *A. naccarii* comparado con

la trucha en el presente estudio, al igual que con lo mostrado en estudios previos para *Acipenser fulvescens* (Singer et al., 1990).

La actividad de la enzima HOAD refleja que los ácidos grasos están siendo usados activamente como sustratos oxidativos en el corazón de ambas especies, siendo este tejido el que muestra la mayor capacidad lipolítica seguido del hígado. En este sentido, la relación GOT:GPT parece indicar que el aspartato podría jugar un papel importante para proveer de intermediarios del ciclo de Krebs principalmente en corazón, el tejido más aeróbico. Estos resultados están de acuerdo con Singer et al. (1990), que indica que los esturiones tienen la capacidad de oxidar ácidos grasos en tejidos extrahepáticos, como el corazón. La menor tasa oxidativa observada en *A. naccarii* comparada con la trucha arcoíris podría, además, reflejar la menor actividad de esta especie de esturión. No obstante, cabe destacar que la capacidad para oxidar ácidos grasos a nivel hepático encontrada en el presente estudio es similar en esturión y en trucha.

Las actividades G6PDH y EM, enzimas esenciales para la producción del NADPH necesario para la síntesis de ácidos grasos, apoyan lo ya expuesto en bibliografía acerca de que el hígado es el principal órgano lipogénico de vertebrados (Fynn-Aikins et al., 1992). El análisis de los metabolitos plasmáticos relacionados con el metabolismo de los lípidos muestra menores niveles de lípidos circulantes en el esturión con respecto a la trucha, excepto para los TG. Si comparamos los valores de lípidos totales y de TG en el plasma de ambas especies podemos deducir que los niveles de ácidos grasos libres en plasma son inferiores en el esturión que en la trucha. Los ácidos grasos libres en plasma son el principal vehículo para el transporte de lípidos desde los lugares de depósito hasta los tejidos periféricos para su oxidación, y nuestros resultados indican que dicha capacidad de transporte es muy superior en la trucha. Larsson y Fänge (1977) indicaron que tanto el lugar de depósito de lípidos como la tasa de actividad de los peces influyen sobre los niveles de ácidos grasos libres circulantes. En este sentido, nuestros resultados muestran que, tal como en elasmobranchios, el hígado es el principal lugar de depósito de lípidos en el esturión, mientras que la trucha los deposita preferentemente en el tejido adiposo perivisceral.

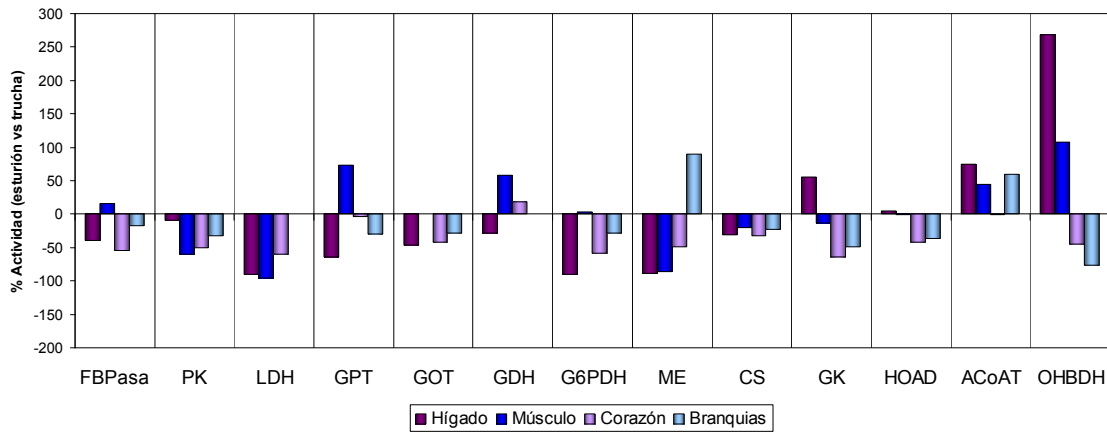


Figura 1. Actividad de las enzimas clave del metabolismo intermediario en los diferentes tejidos. El valor 0 corresponde a las actividades enzimáticas para la trucha, las barras representan las variaciones de la actividad enzimática para el esturión con respecto a este valor

Los menores niveles de lípidos circulantes en plasma encontrados en el esturión estarían de acuerdo con lo expuesto por Ballantyne (1997) en elasmobranquios. Según este autor, debido a que este grupo de peces utiliza la urea con fines osmorreguladores, los niveles de urea en sangre serían incompatibles con altos niveles de albúmina, la principal proteína transportadora de ácidos grasos en plasma. En este sentido, nuestros resultados muestran que los niveles de proteínas plasmáticas en el esturión son casi tres veces menores a los de la trucha. Así, de acuerdo con Larsson y Fänge (1977), la capacidad para depositar lípidos en tejidos diferentes a aquellos en los que son sintetizados parece estar directamente relacionada con el nivel de proteínas transportadoras. A este respecto, el esturión *Acipenser naccarii* se encontraría en una situación intermedia entre elasmobranquios y teleósteos. El bajo nivel de proteínas circulantes en esta especie anádroma podría estar relacionado con su capacidad de usar urea como osmolito, como ya hemos demostrado previamente al estudiar los procesos de aclimatación al agua salada en esta especie (Martínez-Álvarez et al., 2002). Aunque en condiciones ambientales de agua dulce este pez es fundamentalmente amoniotélico, debe conservar las condiciones plasmáticas adecuadas para poder desarrollar el mecanismo osmorregulador adaptativo al agua salada incrementando los niveles de urea. Este hecho no sería aplicable a los esturiones en general, pues no todos poseen capacidad osmorreguladora (Rasmussen, 1980).

Las actividades de las enzimas implicadas en el metabolismo de cuerpos cetónicos (ACoAT y β -OHBDH) indican que es en el hígado donde existe mayor capacidad de

síntesis y que el corazón es el principal tejido que usa estos metabolitos como combustible. Hay que destacar que el hígado del esturión posee una mayor capacidad de síntesis de cuerpos cetónicos que el de la trucha, circunstancia también encontrada en elasmobranquios (Ballantyne 1997). La gran capacidad de síntesis de cuerpos cetónicos en esturiones sería un rasgo primitivo que los capacita para exportar estos compuestos para ser usados como combustible en tejidos periféricos subsanando, de este modo, su baja capacidad de transporte de ácidos grasos en plasma. Este hecho justificaría, una vez más, que el principal lugar de depósito de lípidos en el esturión sea el hígado, el mismo lugar donde se sintetizan.

Por otra parte, Speers-Roesch et al. (2006), manifestaron que la existencia de urea como osmolito en los elasmobranquios no está relacionada con una mayor utilización de los cuerpos cetónicos como fuente de energía en elasmobranquios en relación con teleósteos, sino que este hecho sería un carácter ancestral. Desde este punto de vista, podemos considerar que el esturión *A. naccarii* también presenta este carácter ancestral que precedió a las adaptaciones metabólicas aparecidas en teleósteos que los capacitan para la utilización de lípidos como fuente más rentable de energía que los cuerpos cetónicos.

Así pues, en general, en este estudio encontramos una menor actividad de las enzimas implicadas en las diferentes rutas metabólicas de los diferentes tejidos en el esturión con respecto a la trucha, lo que estaría de acuerdo con las diferentes tasas metabólicas de ambas especies, mayor en animales más activos como es la trucha (Kieffer et al., 2001). Ahora bien, dentro de esta menor actividad metabólica en los diferentes tejidos del esturión, hay que destacar que en el hígado de este animal las actividades enzimáticas no difieren en gran medida con respecto al hígado de la trucha, sobre todo las relacionadas con el catabolismo de carbohidratos y lípidos. En la Figura 1 se representan las distintas actividades enzimáticas en los diferentes tejidos del esturión en relación con la trucha. En ella se observa que a nivel hepático no existen diferencias en la actividad de las enzimas PK y HOAD en comparación con el resto de enzimas estudiadas, lo cual indicaría una mayor capacidad relativa de utilización a nivel metabólico de los hidratos de carbono y los lípidos en el hígado del esturión con respecto al de la trucha, circunstancia que estaría de acuerdo con lo encontrado en otros estudios nutritivos (Furné et al, 2005) expuestos en el capítulo IV-1.1 de presente Tesis,

donde hemos puesto de manifiesto una relativa mayor capacidad de uso nutritivo de los carbohidratos en el esturión. También en la Figura 1 se puede observar una mayor capacidad de síntesis y de utilización de los cuerpos cetónicos en el esturión con respecto a la trucha en hígado y corazón, característica que, como se ha comentado anteriormente, vendría determinada por una menor capacidad de transporte de ácidos grasos libres en plasma.

Así pues, el hígado del esturión es un importante lugar de síntesis de lípidos y de cuerpos cetónicos, así como de depósito lipídico. Quizás debido a estas peculiaridades, el esturión posee una mayor capacidad antioxidante que la trucha a nivel hepático, como se comentará ampliamente en el capítulo IV-3.1 de la presente Tesis, lo que es una salvaguarda efectiva frente a la oxidación de las elevadas cantidades de lípidos almacenadas en este tejido.

En branquias se corrobora un mayor uso de ácidos grasos (HOAD) en trucha, lo que estaría en concordancia con lo anteriormente expuesto en referencia a una mayor utilización extrahepática de ácidos grasos.

Futuros estudios acerca de las adaptaciones metabólicas de esta especie frente a diferentes retos ambientales y nutricionales servirán para comprender mejor las diferencias existentes en el metabolismo de este pez condrósteo como es el esturión *Acipenser naccarii* con respecto al mejor conocido de los teleósteos como la trucha.

IV-2.2. EFECTO DEL AYUNO Y LA REALIMENTACIÓN SOBRE ENZIMAS DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO EN EL ESTURIÓN *Acipenser naccarii* Y EN LA TRUCHA *Oncorhynchus mykiss*.

Resumen

En el presente estudio se determinaron enzimas clave del metabolismo intermediario durante un periodo de ayuno y realimentación en el esturión *A. naccarii* en comparación con la trucha *O. mykiss* en el hígado, músculo blanco y corazón. En las primeras etapas del ayuno, se produjo un aumento de la actividad de las enzimas implicadas en la glucólisis en ambas especies, junto con un descenso en las reservas de glucógeno. A partir de los 5 días de ayuno, la actividad de las enzimas glucolíticas disminuye y se mantienen los niveles de glucosa plasmática y glucógeno hepático, incrementando la gluconeogénesis a partir de lactato y aminoácidos en mayor medida en la trucha. La oxidación de ácidos grasos ocurre durante todo el periodo de ayuno, siendo más evidente en el esturión, puesto que en esta especie el hígado es el principal órgano de reserva lipídica. El exceso de acetil CoA, procedente de la β -oxidación, que no puede ingresar en el ciclo de Krebs, es desviado hacia la formación de cuerpos cetónicos, en mayor medida en la trucha. La realimentación produjo la recuperación de todas las actividades enzimáticas que sufrieron variaciones con el ayuno. Los lípidos y lipoproteínas plasmáticas fueron más elevadas en trucha, lo que indicaría la movilización hacia los lugares de depósito lipídico, siendo en esta especie el tejido perivisceral.

En el músculo blanco de ambas especies, en las primeras etapas del ayuno, prevalecería el consumo del glucógeno, junto con el de lípidos. En estadios más tardíos adquiere importancia el catabolismo proteico.

A nivel cardiaco, durante la inanición ambas especies utilizan carbohidratos y ácidos grasos provenientes de la sangre con fines oxidativos. El lactato es uno de los combustibles preferenciales para el metabolismo aeróbico cardiaco. Así mismo, ambas especies utilizan los cuerpos cetónicos producidos por el hígado con fines energéticos durante el ayuno.

Introducción

El ayuno es una situación experimentada y tolerada por muchas especies de peces, tanto en su medio natural como en condiciones de piscifactoría. La respuesta metabólica frente a la condición de ayuno es variable y depende de múltiples factores. En este sentido, se ha constatado la existencia de una capacidad diferencial entre especies para priorizar la utilización de las distintas reservas energéticas ante una condición de ayuno.

Los hábitos alimentarios de la especie influyen en su capacidad de respuesta metabólica ante una situación de privación de alimento, de ésta manera, las especies carnívoras están mejor adaptadas, puesto que en condiciones naturales se alimentan con menos frecuencia y experimentan periodos de inanición, mientras que las especies omnívoras y herbívoras ingieren alimento de forma continua (Bond, 1996).

Existen especies de peces donde la primera fuente energética movilizada ante un periodo de ayuno es el glucógeno muscular y hepático (Stirling, 1976; Machado et al., 1988; Pérez-Jiménez, 2007). La hidrólisis del glucógeno ayuda a mantener la homeostasis de la glucosa sanguínea en los primeros días de ayuno (Metón et al., 2003). De una forma paralela a la movilización del glucógeno, se produce la movilización de las reservas lipídicas con fines energéticos. En estas especies, la proteína muscular sería la última reserva movilizada durante el ayuno (Black y Love, 1986; Lim y Ip, 1989; Blasco et al., 1992; Méndez y Wieser, 1993; Böhm et al., 1994).

Por otro lado, existen especies en las que largos periodos de ayuno no producen un decremento de las reservas de glucógeno. Este hecho ha sido constatado en especies como el salmón del Pacífico durante las largas migraciones para reproducirse, en el que la proteína muscular se degrada en primera instancia con fines energéticos o como esqueleto carbonado para mantener los niveles de glucógeno hepático, mientras que éste último se conserva como combustible para el desove (Mommensen et al., 1980).

Algunos autores han puesto de manifiesto la síntesis hepática de cuerpos cetónicos bajo condiciones de ayuno, ante la imposibilidad de ingresar en el ciclo de Krebs las cantidades ingentes de acetil CoA procedentes de la β -oxidación, debido a la menor disponibilidad de oxalacetato desviado hacia gluconeogénesis. La producción y

exportación de cuerpos cetónicos durante el ayuno provee de sustratos energéticos alternativos que pueden ser usados por órganos tales como el cerebro y el corazón (Harmon y Sheridan, 1992; Soengas et al., 1996). Por otro lado, otros autores (Zammit y Newsholme, 1979; Black y Love, 1986) han otorgado muy baja importancia al metabolismo de cuerpos cetónicos como suministro energético en peces durante el ayuno.

El efecto de la alimentación tras un periodo de ayuno es variable y dependiente de factores tales como la especie de pez, la edad de los animales, las condiciones ambientales, la duración del ayuno y el régimen y tipo de alimentación previa al mismo (Navarro y Gutierrez, 1995). De manera general, la realimentación conduce a una rápida recuperación de peso conocida como crecimiento compensatorio. También los parámetros metabólicos, y los niveles de glucógeno hepático y muscular suelen restablecerse relativamente rápido (Black y Love, 1986; Lim y Ip, 1989; Blasco et al., 1992; Méndez y Wieser, 1993; Böhm et al., 1994; Metón et al., 2003). La recuperación de la proteína tisular ocurre de manera más gradual y una vez que este proceso está avanzado, comienzan a depositarse las reservas lipídicas (Black y Love, 1986; Böhm et al., 1994).

Dentro de la búsqueda de nuevas especies para el cultivo en piscifactorías, algunos países europeos, tales como Italia y España, han introducido el cultivo del esturión *Acipenser naccarii*, también conocido como el esturión del Adriático, el cual migra estacionalmente desde los ríos Po, Ticino y Adigge al mar Adriático (Clementi et al., 1999). Recientes estudios han puesto de manifiesto que la distribución histórica de esta especie incluía algunos ríos españoles (Garrido-Ramos et al., 1997; Hernando et al., 1999; De la Herrán et al., 2004).

El objetivo de este trabajo es conocer la respuesta metabólica del esturión del Adriático ante una situación de ayuno y posterior realimentación, para ello utilizaremos como animal de referencia una especie ampliamente estudiada como es la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*).

Material y métodos

Animales de experimentación

Como animales de experimentación 40 esturiones de la especie *Acipenser naccarii* de edad 1+ y 604.14 ± 18.52 g de peso medio y 40 truchas de la especie *Oncorhynchus mykiss* de edad 1+ y 299.74 ± 26.67 g de peso medio. Ambas especies procedían de la piscifactoría Sierra Nevada S.L. (Riofrío, Granada). Las condiciones de mantenimiento y alimentación fueron propias del régimen de piscifactoría. Ambos animales se alimentaron con la misma dieta artificial (Le Gouessant, Francia), con una composición química aproximada de 48% de proteína, 14% de lípidos, 11,4% de cenizas y 15% de carbohidratos.

Los animales se mantuvieron en ayuno durante un periodo total de 72 días. Se tomaron muestras para su posterior análisis a los 1, 2, 5, 10, 40 y 72 días de ayuno. Tras el periodo de ayuno los animales fueron realimentados durante un periodo total de 2 meses, muestreando animales a los 10 y 60 días de realimentación.

Toma de muestras

Previo sacrificio de los animales se tomaron muestras de sangre de la vena caudal usando jeringas heparinizadas. Las muestras se mantuvieron en hielo hasta su centrifugación. Posteriormente, se extrajo el hígado, arcos branquiales, el corazón y una porción de músculo blanco de la región dorsal. Las muestras fueron introducidas rápidamente en nitrógeno líquido. La conservación se realizó a -80°C hasta posterior tratamiento y análisis.

Tratamiento de las muestras

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 650 g durante 10 minutos para separar el plasma, el cual se mantuvo a -80°C hasta la determinación de metabolitos.

Las muestras de tejidos tomadas de todos los animales fueron homogeneizadas. Para ello se usó un tampón Tris-HCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, tritón X-100 0.1 %, pH 7.8, en una proporción 1 g de tejido en 9 ml de tampón.

Los homogeneizados fueron sometidos a una centrifugación de 30000 g durante 30 minutos a 4°C en una centrifuga “Kontron” mod. Centrikon H-401. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante que fue congelado a -80°C hasta su posterior análisis.

Para la determinación del glucógeno, las muestras de hígado y músculo fueron homogeneizadas en agua purificada muy fría en proporción 1:5 (p/v) y congeladas a -80°C hasta su posterior análisis.

Métodos analíticos

Los niveles de glucosa plasmática fueron determinados usando un test enzimático-colorimétrico basado en el método de la glucosa oxidasa (Labkit 30236). Los lípidos totales, los triglicéridos, el colesterol total, el colesterol HDL y LDL se determinaron usando tests colorimétricos (Labkit 30345, 30360, 30184, 30189, 30181). La concentración de proteína en plasma y en los extractos de tejido se analizó siguiendo el método de Bradford (1976), usando albúmina sérica bovina como estándar. La extracción de lípidos totales de hígado y músculo se realizó usando el método de Soxhlet. El glucógeno muscular y hepático se determinó según el ensayo de la glucosa, previa rotura del glucógeno por adición de amiloglucosidasa (Roehrig y Alfred (1974).

Determinaciones enzimáticas

Todas las determinaciones enzimáticas se llevaron a cabo a 25 ± 0.5 °C usando un espectrofotómetro de microplacas PowerWave_x. Las concentraciones de sustratos y proteínas óptimas para la medida de la actividad máxima de cada enzima, en cada tejido y para cada especie se establecieron mediante ensayos preliminares. Las reacciones enzimáticas se iniciaron por la adición del extracto de tejido.

Para la determinación de la mayoría de las actividades enzimáticas se registraron los cambios de absorbancia del NADH o NADPH a 340 nm (coeficiente de extinción molar $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La actividad citrato sintasa se determinó registrando la reducción del DTNB (ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzónico) a 412 nm (coeficiente de extinción molar, $13.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La actividad acetoacetylCoA tiolasa se determinó a 313 nm (coeficiente de extinción molar, $20.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Las actividades enzimáticas se expresaron en mU: miliunidades (nmol de sustrato transformado por minuto) por mg de proteína.

Las condiciones de ensayo, en un volumen final de 200 μl fueron las siguientes:

Piruvato quinasa (PK; EC 2.7.1.40): tampón imidazol-HCl 50 mM pH 7.4, KCl 100 mM, MgCl_2 5 mM, ADP 1 mM, NADH 0.15 mM, 2 unidades $\cdot\text{ml}^{-1}$ LDH, fosfoenolpiruvato 2 mM.

Fructosa 1,6-bifosfatasa (FBPasa; EC 3.1.3.11): tampón imidazol-HCl 50 mM pH 7.4, MgCl_2 5 mM, 2-mercaptoetanol 12 mM, NADP 0.5 mM, G6PDH 2 unidades $\cdot\text{ml}^{-1}$, PGI 2 unidades $\cdot\text{ml}^{-1}$, Fructosa 1,6-difosfato 0.5 mM en trucha y 0.75 mM en esturión.

Lactato deshidrogenasa (LDH; EC 1.1.1.27): tampón imidazol-HCl 50 mM pH 7.4, NADH 0.16 mM, piruvato 1 mM.

Glicerol quinasa (GK; EC 2.7.1.30) tampón imidazol-HCl 50 mM pH 7.4, MgCl_2 , ATP 5 mM, PEP 10 mM, NADH 0.75 mM, LDH 4 unidades $\cdot\text{ml}^{-1}$, PK 4 unidades $\cdot\text{ml}^{-1}$, glicerol 2.5 mM.

3-Hidroxiacil CoA deshidrogenasa (HOAD; EC 1.1.1.35): tampón imidazol-HCl 50 mM pH 8, NADH 0.1 mM, acetoacetyl CoA 0.2 mM.

Citrato sintasa (CS; EC 4.1.3.7): tampón imidazol-HCl 50 mM pH 8, DTNB 0.1 mM, acetyl CoA 0.2 mM, oxalacetato 0.2 mM.

Enzima málico (EM; EC 1.1.1.40) tampón imidazol-HCl pH 7.4, MgCl_2 5 mM, NADP 0.4 mM, l-malato 2 mM en esturión y 4 mM en trucha.

Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH; EC 1.1.1.49): tampón imidazol-HCl 50 mM pH 7.4, MgCl₂ 5 mM, NADP 2 mM, glucosa 6-fosfato 1 mM.

Glutamato oxalacetato transaminasa (GOT; EC 2.6.1.1): tampón imidazol-HCl 50 mM pH 7.4, α -cetoglutarato 10 mM, NADH 0.3 mM, piridoxal fosfato 0.05 mM, MDH 3 unidades·ml⁻¹, L-aspartato 25 mM.

Glutamato piruvato transaminasa (GPT; EC 2.6.1.2): tampón imidazol-HCl 50 mM pH 7.4, α -cetoglutarato 10 mM, NADH 0.3 mM, piridoxal fosfato 0.05 mM, LDH 2 unidades·ml⁻¹, L-alanina 25 mM.

Glutamato deshidrogenasa (GDH; EC 1.4.1.2): tampón imidazol-HCl 50 mM pH 8, NADH/ADP 0.2/0.1 mM, acetato amónico 100 mM, LDH 2 unidades·ml⁻¹, α -cetoglutarato 10 mM.

Acetoacetil CoA tiolasa (ACoAT; EC 2.3.1.9): tampón imidazol-HCl 50 mM pH 8, MgCl₂ 5 mM, acetoacetil CoA 0.14 mM, CoA 0.24 mM.

β -hidroxibutirato deshidrogenasa (β -OHBDH; EC 1.1.1.30): tampón imidazol-HCl pH 8, NADH 0.1 mM, acetoacetato 2 mM.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como medias \pm error estándar. Los datos se analizaron por el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) usando el SPSS 13.0 para Windows. Las diferencias significativas dentro de la misma especie en los distintos puntos de muestreo ($P < 0.05$) se determinó por el test de Duncan (Duncan, 1955).

Resultados

Movilización de reservas musculares y hepáticas

Las reservas de glucógeno hepático sufrieron un descenso significativo a los 2 días de ayuno en el esturión y a los 5 días en la trucha, manteniéndose a esos niveles durante el resto del periodo de ayuno. La realimentación condujo a la recuperación del glucógeno hepático en ambas especies. Las proteínas en hígado disminuyeron significativamente a los 5 días de ayuno en ambas especies, manteniéndose durante el ayuno y no recuperándose tras la realimentación. El contenido en lípidos en hígado disminuyó drásticamente en el esturión, de manera significativa a los 2 días de ayuno, mientras que en la trucha se mantuvo sin variaciones. Tras la realimentación, las reservas lipídicas se incrementaron significativamente en esturión. (Tabla 1)

Tabla 1. Composición del hígado (% Peso fresco) en el esturión *A. naccarii* (E) y la trucha *O. mykiss* (T) durante el ayuno (A) y la realimentación (R).

Días	Glucógeno		Proteínas		Lípidos	
	E	T	E	T	E	T
1A	5.22 ^a 0.58	7.23 ^a 0.21	10.76 ^{a*} 0.66	12.49 ^a 1.88	55.32 ^{b*} 2.31	5.25 0.23
2A	3.69 ^{b*} 0.12	8.80 ^a 0.84	11.60 ^a 0.67	13.06 ^a 2.29	30.22 ^{c*} 1.32	4.95 0.39
5A	2.78 ^{b*} 0.19	4.46 ^b 0.24	6.90 ^c 0.42	7.78 ^c 0.56	25.15 ^{d*} 1.21	4.37 0.46
10A	3.71 ^b 0.32	3.17 ^b 0.53	7.70 ^{bc*} 0.26	9.70 ^b 0.45	17.32 ^{e*} 0.23	4.13 0.35
40A	2.38 ^b 0.11	2.46 ^b 0.27	9.34 ^b 0.77	9.28 ^b 0.40	4.73 ^c 0.21	4.03 0.12
72A	2.59 ^b 0.25	2.64 ^b 0.23	9.69 ^{b*} 0.61	10.98 ^{ab} 0.72	5.45 ^c 0.35	4.97 0.21
10R	4.63 ^a 1.04	3.81 ^b 0.73	9.03 ^b 0.55	8.71 ^b 0.35	21.63 ^{c*} 0.99	4.32 0.20
60R	4.35 ^{a*} 0.72	8.40 ^a 1.16	9.27 ^b 0.70	8.45 ^b 0.26	60.02 ^{a*} 2.50	6.91 0.24

Los valores son media \pm error estándar (n=5; número de peces por punto de muestreo)

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre puntos de muestreo para cada especie. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre especies en cada punto de muestreo.

A nivel muscular, se produce un descenso significativo del contenido en glucógeno, proteínas y lípidos a los 5 días de ayuno en ambas especies, manteniéndose los niveles

durante el resto del ayuno. Tras la realimentación, sólo se recuperó el contenido en proteínas en el músculo de esturión y el contenido lipídico en ambas especies (Tabla 2).

Tabla 2. Composición del músculo blanco (% Peso fresco) en el esturión *A. naccarii* (E) y la trucha *O. mykiss* (T) durante el ayuno (A) y la realimentación (R).

Días	Glucógeno		Proteínas		Lípidos	
	E	T	E	T	E	T
1A	-	-	5.20 ^{cd*}	7.22 ^c	25.54 ^{c*}	19.52 ^c
			0.51	0.45	3.22	2.09
2A	0.355 ^c	0.944 ^a	5.61 ^d	6.83 ^c	17.32 ^b	15.12 ^b
	0.129	0.017	0.74	0.58	1.03	0.49
5A	0.125 ^a	0.110 ^b	3.57 ^{ab}	3.15 ^a	8.24 ^a	9.65 ^{ab}
	0.017	0.006	0.14	0.17	1.21	2.83
10A	0.141 ^a	0.146 ^b	2.96 ^a	3.14 ^a	6.86 ^{ad*}	12.69 ^{bc}
	0.025	0.019	0.17	0.20	1.46	2.74
40A	0.126 ^a	0.122 ^b	2.85 ^a	3.28 ^a	4.00 ^d	9.32 ^{ab}
	0.017	0.023	0.43	0.43	0.81	2.26
72A	0.113 ^a	0.152 ^b	3.29 ^{ab}	3.58 ^a	4.22 ^{d*}	7.31 ^a
	0.010	0.013	0.08	0.15	0.81	0.22
10R	0.105 ^a	0.169 ^b	3.46 ^{ab}	3.83 ^a	15.40 ^{b*}	10.12 ^{ab}
	0.006	0.043	0.25	0.36	1.52	0.04
60R	0.204 ^b	0.245 ^b	4.19 ^{bc}	4.79 ^b	22.86 ^c	17.37 ^c
	0.036	0.050	0.32	0.32	4.62	3.28

Los valores son media \pm error estándar (n=5; número de peces por punto de muestreo). Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre puntos de muestreo para cada especie. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre especies en cada punto de muestreo.

Metabolitos plasmáticos

La concentración de los distintos metabolitos plasmáticos durante el experimento queda expresada en la Tabla 3. Los niveles de glucosa plasmática experimentan un incremento inicial significativo a los 5 días de ayuno en esturión, con un posterior descenso alcanzando los niveles iniciales a los 10 días de ayuno, manteniéndose la glucemia durante el resto del ayuno. La trucha sufre un descenso significativo de la glucemia a los 5 días de ayuno, los niveles de glucosa permanecen bajos hasta el final del periodo de ayuno. Tras la realimentación, ambas especies recuperan las concentraciones de glucosa en sangre iniciales, y en el esturión se alcanzan valores significativamente superiores a los iniciales. Las proteínas plasmáticas no experimentan variaciones significativas en ninguna de las especies objeto de estudio.

El colesterol total no sufre variaciones significativas en esturión durante el ayuno, mientras que en la trucha se aprecia un descenso en su concentración a los 5 días, manteniéndose durante todo el periodo de ayuno. La realimentación no produjo variaciones en el esturión, mientras que en la trucha el colesterol total incrementó de manera significativa alcanzando valores superiores a los iniciales.

El colesterol HDL y LDL descienden significativamente en ambas especies durante el ayuno, y sólo se recupera tras la realimentación el HDL para la trucha.

Tabla 3. Metabolitos plasmáticos en el esturión *A. naccarii* (E) y la trucha *O. mykiss* (T) durante el ayuno (A) y la posterior realimentación (R).en mg·100ml⁻¹.

		Días							
Pez		1A	2A	5A	10A	40A	72A	10R	60R
Glucosa	E	37.82 ^{ab*} 2.14	48.67 ^{bc*} 7.44	55.82 ^c 5.31	41.94 ^{ab*} 3.61	30.11 ^{a*} 1.80	38.62 ^{ab*} 4.33	95.82 ^d 5.79	91.43 ^d 5.63
	T	103.47 ^c 11.30	88.56 ^c 6.69	66.15 ^b 4.99	56.37 ^{ab} 2.18	47.86 ^a 2.29	68.57 ^b 3.96	87.14 ^c 4.75	96.61 ^c 8.90
Proteínas	E	1804.4 ^{a*} 284.5	1848.1 ^{a*} 160.0	2906.7 ^{bc*} 503.7	1805.0 ^{a*} 64.4	2104.6 ^{ab} 677.3	2122.0 ^{ab*} 154.7	2447.5 ^{ab} 294.7	3456.4 ^{c*} 128.7
	T	4747.2 ^{bc} 285.02	5106.0 ^c 187.60	4202.4 ^{abc} 215.9	4502.4 ^{bc} 401.0	3297.2 ^a 491.6	3874.9 ^{ab} 197.2	3166.5 ^a 646.8	5233.4 ^c 412.8
Lípidos totales	E	517.7 ^{b*} 44.0	624.0 ^{b*} 56.2	458.2 ^{ab*} 28.5	561.2 ^{b*} 1.4	163.9 ^{a*} 33.4	548.0 ^{b*} 77.4	706.9 ^{b*} 57.8	1154.6 ^{c*} 287.3
	T	1434.2 ^a 119.8	1342.7 ^a 140.9	1421.8 ^a 192.9	1391.9 ^a 233.7	1101.5 ^a 100.6	1319.1 ^a 126.3	1181.6 ^a 142.2	3645.4 ^b 397.5
Triglicéridos	E	342.36 ^{abc} 31.44	431.11 ^{bc} 58.39	381.01 ^{abc} 84.23 [*]	259.13 ^{ab*} 16.66	139.81 ^a 11.08	344.96 ^{ab} 13.02	540.25 ^{b*} 37.10	1208.42 ^c 208.42
	T	440.9 ^b 66.5	336.7 ^{ab} 41.4	161.5 ^{ab} 6.0	143.3 ^a 14.0	134.2 ^a 16.6	324.4 ^{ab} 76.3	369.5 ^{ab} 66.1	1725.8 ^c 257.3
Colesterol total	E	73.57 ^{bc*} 5.24	94.54 ^{a*} 6.38	54.55 ^{ab*} 4.67	65.34 ^{b*} 2.41	39.32 ^{a*} 3.60	86.43 ^{cd*} 12.20	68.59 ^{bc*} 6.58	66.48 ^{bc*} 8.47
	T	314.83 ^b 22.77	312.12 ^b 18.78	200.00 ^a 10.38	205.34 ^a 26.50	155.57 ^a 14.73	196.34 ^a 14.73	196.34 ^a 8.49	409.09 ^c 46.05
HDL Colesterol	E	9.10 ^{b*} 0.88	13.69 ^{c*} 3.79	0.00 ^{a*} 0.00	3.34 ^{a*} 1.97	4.38 ^{b*} 0.57	5.96 ^{bc*} 1.27	0.00 ^{a*} 0.00	0.00 ^{a*} 0.00
	T	116.41 ^a 7.47	101.71 ^a 9.21	85.53 ^b 7.61	85.22 ^b 7.90	66.56 ^a 5.68	84.83 ^b 6.80	101.56 ^a 1.61	175.31 ^b 9.68
LDL Colesterol	E	34.27 ^{c*} 2.09	36.95 ^{c*} 5.52	6.89 ^a 3.13	5.77 ^a 2.27	7.78 ^{ab} 2.22	15.00 ^b 3.76	9.75 ^{ab} 1.65	9.62 ^{ab*} 1.48
	T	199.64 ^b 8.05	210.19 ^b 14.14	12.00 ^a 3.17	14.54 ^a 5.31	12.53 ^a 2.84	15.69 ^a 2.72	10.82 ^a 2.75	21.71 ^a 5.12

Los valores son media ± error estándar (n=5; número de peces por punto de muestreo) Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre puntos de muestreo para cada especie. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre especies en cada punto de muestreo.

Los lípidos totales y los triglicéridos no sufren variaciones significativas durante el ayuno en ninguna de las especies, tras dos meses de realimentación, alcanzan concentraciones significativamente superiores a las iniciales.

Actividad de enzimas hepáticas

Las enzima implicada en la vía glucolítica HK sufre un pico de actividad a los 5 días de ayuno en ambas especies, aunque sólo es significativo en esturión. A partir de este momento, experimenta un descenso significativo en su actividad a los 10 días de ayuno en trucha y a los 40 días de ayuno en esturión. La actividad PK en esturión experimenta un pico de actividad significativo a los 5 días de ayuno, con un posterior descenso en su actividad durante todo el periodo de ayuno alcanzando valores similares a los control. En trucha, la actividad PK experimenta un descenso significativo a los 2 días de ayuno, con un posterior recuperación a los 5 días de ayuno, seguido por una tendencia al descenso durante el resto del periodo experimental. Tras la realimentación, en ambas especies se alcanzan los valores iniciales para ambas enzimas.

La actividad FBPasa, enzima gluconeogénica, no varía de manera significativa durante el periodo de ayuno, pero se aprecia un ligero incremento a los 5 días de ayuno y una posterior tendencia al decremento en ambas especies. La realimentación tampoco produjo variaciones significativas en su actividad.

En esturión, la enzima LDH no muestra variaciones significativas en su actividad durante el periodo de ayuno, pero la realimentación produjo un descenso significativo sólo a los 2 meses de realimentación. Por otro lado, la trucha experimentó un incremento significativo a los 5 días de ayuno en la actividad LDH, manteniéndose durante todo el periodo de inanición. Tras la realimentación se recuperaron los valores iniciales.

La actividad HOAD no sufre variaciones significativas con el ayuno ni con la posterior realimentación en ninguna de las especies, aunque se observa un incremento temprano de la oxidación de lípidos en el esturión. Por otro lado, la enzima GK experimenta un incremento significativo en su actividad a los 5 días de ayuno, con un posterior descenso durante todo el periodo de ayuno, significativo a los 40 días en ambas especies. Tras la realimentación, en trucha se produce un incremento significativo en la actividad, alcanzando los valores más altos de todo el periodo experimental. En esturión, la realimentación no produjo cambios significativos con respecto a los últimos puntos de ayuno. La actividad CS presenta un pico de actividad significativo a los 5 días

de ayuno, permaneciendo sin bruscas variaciones durante el resto del periodo de ayuno en ambas especies. Tras la realimentación, en ambas especies se aprecia un incremento significativo, alcanzando valores superiores al control.

La EM desciende de manera continua durante los primeros días de ayuno, haciéndose significativa su reducción a los 10 días de ayuno sólo en trucha. En esturión, a los 5 días de ayuno se aprecia un pico de actividad significativo, seguido por un descenso en su actividad no estadísticamente significativo durante el resto del ayuno. Tras la realimentación, su actividad incrementa en ambas especies, alcanzando valores muy superiores a los iniciales en esturión, mientras que en trucha no llega a recuperarse la actividad inicial. La actividad G6PDH no se ve afectada por el ayuno en ninguna de las especies, pero incrementa de manera significativa a los 60 días de realimentación en ambas especies, alcanzando valores superiores a los presentes al comienzo del ayuno.

La transaminasa hepática GOT disminuye su actividad de manera significativa a los 40 días de ayuno en la trucha, mientras que en el esturión no experimenta variaciones durante dicho periodo de ayuno y realimentación. Al final de la realimentación, se alcanzan los valores iniciales para la trucha. Por otro lado, la actividad GPT sufre un incremento significativo a los 5 días de ayuno, volviendo a los valores controles durante el resto del ayuno en ambas especies. La realimentación no produjo variaciones en la actividad GPT en ninguna de las especies. La actividad GDH sigue una tendencia al descenso, sólo significativa a los 40 días de ayuno en la trucha, Tras la realimentación, dicha actividad se recupera.

La enzima ACoAT en esturión sigue una tendencia al decremento durante el periodo de ayuno, significativa a los 2 días de ayuno, mientras que en trucha, experimenta un incremento significativo a los 5 días de ayuno para alcanzar los valores controles durante el resto del periodo experimental. La realimentación no produjo variaciones en esta actividad enzimática en esturión, pero en trucha se aprecia un incremento en dicha actividad alcanzando valores superiores a los iniciales en ambas especies.

Tabla 4. Actividad específica de enzimas clave del metabolismo intermediario en el hígado del esturión *A. naccarii* (E) y la trucha *O. mykiss* (T) durante el ayuno (A) y la posterior realimentación (R).

Enzima	Pez	Días							
		1A	2A	5A	10A	40A	72A	10R	60R
HK	E	4.99 ^a 0.98	4.50 ^a 0.99	6.78 ^b 0.98	7.42 ^{b*} 0.91	2.80 ^a 0.21	2.81 ^a 0.49	4.05 ^a 0.95	3.39 ^{a*} 0.20
	T	5.20 ^b 0.77	5.05 ^b 0.77	6.46 ^b 0.77	2.51 ^a 0.30	2.98 ^a 0.32	2.92 ^a 0.49	3.24 ^a 0.37	5.27 ^b 0.55
PK	E	46.17 ^a 9.28	39.89 ^a 13.60	108.12 ^{c*} 14.34	75.02 ^{b*} 3.53	34.05 ^a 6.40	34.88 ^{a*} 2.45	40.45 ^a 5.73	26.22 ^{a*} 3.79
	T	65.35 ^c 8.48	26.50 ^a 2.69	50.90 ^{bc} 11.45	34.14 ^{ab} 4.69	22.11 ^a 2.63	23.01 ^a 3.17	35.42 ^{ab} 3.99	57.12 ^c 7.30
FBPasa	E	14.85 [*] 2.12	11.14 3.62	19.54 2.00	12.23 [*] 0.62	11.97 [*] 1.69	11.75 3.50	13.39 2.36	16.20 [*] 2.76
	T	24.22 2.99	18.64 2.79	28.46 4.35	25.19 3.13	25.15 1.61	15.68 2.56	20.58 4.36	24.57 2.09
LDH	E	292.3 ^{a*} 25.3	260.3 ^{a*} 22.5	241.5 ^{a*} 41.0	223.6 ^{ab*} 25.4	281.6 ^{a*} 38.7	202.8 ^{ab*} 46.9	134.8 ^{bc*} 19.1	86.2 ^{c*} 12.4
	T	625.3 ^b 48.3	706.0 ^b 62.3	1726.9 ^a 309.1	1758.8 ^a 114.3	2121.5 ^a 187.8	2091.3 ^a 479.5	520.5 ^b 58.5	848.3 ^b 102.0
GK	E	3.65 ^a 0.68	3.98 ^a 0.74	21.73 ^d 4.03	18.61 ^{cd*} 1.85	12.62 ^b 1.91	10.27 ^b 1.27	15.47 ^{bc*} 2.49	9.64 ^{b*} 2.43
	T	3.28 ^a 0.49	2.78 ^a 0.18	26.10 ^c 1.44	29.12 ^c 3.44	10.67 ^b 1.00	12.54 ^b 2.34	35.77 ^d 4.07	40.84 ^d 2.38
HOAD	E	33.86 4.09	33.56 4.62	53.16 11.60	29.15 3.37	32.72 2.47	43.58 [*] 5.09	39.37 [*] 2.27	34.14 6.60
	T	33.37 5.67	30.65 3.36	34.00 3.49	27.98 1.95	29.17 1.38	28.50 4.01	29.51 1.02	22.90 2.22
CS	E	15.48 ^{a*} 1.20	16.92 ^{ab} 4.73	27.07 ^d 2.80	21.77 ^{abc*} 1.03	25.04 ^{cd*} 2.77	24.73 ^{abc} 2.91	23.11 ^{abc*} 2.61	27.75 ^d 5.92
	T	21.52 ^a 1.83	25.29 ^{ab} 2.27	32.67 ^{cd} 2.50	28.12 ^{abc} 2.39	35.82 ^d 1.54	31.88 ^{bcd} 2.88	43.45 ^e 3.45	36.03 ^d 3.19
EM	E	5.47 ^{a*} 0.98	3.44 ^{a*} 1.55	10.68 ^c 0.76	8.21 ^{b*} 1.76	3.15 ^{b*} 0.40	3.74 ^b 1.36	5.91 ^b 0.98	24.51 ^{bc*} 6.02
	T	40.87 ^c 8.06	36.09 ^{bc} 6.86	28.79 ^{abc} 2.85	16.72 ^{ab} 1.08	18.00 ^{ab} 1.09	16.04 ^a 3.31	14.39 ^a 1.92	30.82 ^{ab} 3.10
G6PDH	E	7.05 ^{a*} 1.06	7.36 ^{a*} 2.02	22.75 [*] 2.69	14.07 ^{a*} 1.83	27.76 [*] 2.77	27.39 ^{b*} 2.08	11.86 ^{a*} 2.30	39.00 ^{c*} 7.29
	T	78.29 ^{abc} 18.98	64.21 ^{ab} 9.26	103.60 ^c 10.91	98.31 ^{bc} 16.87	114.74 ^c 4.86	86.04 ^{abc} 18.36	50.18 ^a 5.03	162.08 ^d 12.08
GOT	E	258.48 [*] 32.59	282.18 92.71	360.17 [*] 53.62	284.85 [*] 24.75	284.30 45.10	282.84 29.42	269.62 [*] 24.47	321.52 50.27
	T	498.33 ^{bc} 69.28	497.01 ^{bc} 114.16	601.36 ^{cd} 76.98	512.04 ^{bc} 79.54	380.41 ^{ab} 50.14	272.85 ^a 32.34	701.88 ^d 52.10	382.82 ^{ab} 33.80
GPT	E	125.14 ^{ab*} 14.10	99.71 ^{a*} 25.05	199.26 ^{d*} 13.36	178.24 ^{cd*} 22.00	149.21 ^{bc*} 14.74	151.62 ^{bc*} 20.32	164.86 ^{bcd} 7.03 [*]	118.28 ^{oab*} 12.01
	T	318.18 ^{ab} 21.76	301.71 ^{ab} 54.29	654.19 ^c 99.93	375.78 ^{ab} 48.28	393.04 ^b 29.04	350.83 ^{ab} 44.59	373.94 ^{ab} 30.79	240.43 ^a 11.19
GDH	E	131.87 ^a 25.32	129.45 ^a 29.38	92.75 ^{ab*} 9.34	85.82 ^{b*} 7.90	61.97 ^{b*} 9.17	57.31 ^b 5.98	86.49 ^b 7.56	129.45 ^a 29.38
	T	181.29 ^a 27.59	178.92 ^a 25.43	187.11 ^a 16.40	135.46 ^{ab} 8.01	98.42 ^b 7.77	92.44 ^b 30.50	157.95 ^{ab} 38.06	181.29 ^a 27.59
ACoAT	E	53.69 ^{d*} 6.61	34.86 ^{bc} 4.95	39.29 ^{c*} 3.52	34.46 ^{bc*} 3.53	20.84 ^{a*} 1.84	24.43 ^{ab*} 1.88	29.38 ^{abc*} 1.63	28.43 ^{abc*} 3.80
	T	28.06 ^{ab} 4.26	25.09 ^a 2.35	97.81 ^d 14.66	74.24 ^c 4.70	47.58 ^b 4.59	46.03 ^b 4.63	77.16 ^c 9.39	91.49 ^{cd} 6.65
βOHBDH	E	3.63 ^{a*} 0.74	3.08 ^{a*} 0.75	5.51 ^{b*} 0.76	2.99 ^{a*} 0.24	2.73 ^{a*} 0.32	2.07 ^a 0.44	1.97 ^a 0.33	7.83 ^c 0.75
	T	0.97 ^c 0.20	0.85 ^a 0.20	2.16 ^a 0.45	1.89 ^a 0.37	1.51 ^a 0.22	1.48 ^a 0.44	2.47 ^a 0.32	10.25 ^b 2.79

Los valores son medias \pm error estándar (n=5; número de peces por punto de muestreo) y se expresaron com mU mg de proteína⁻¹. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre puntos de muestreo para cada especie. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre especies en cada punto de muestreo.

La enzima β -OHBDH implicada en el metabolismo de cuerpos cetónicos, no sufre variaciones en su actividad en la trucha durante el periodo de ayuno, en esturión se aprecia un pico de actividad significativo a los 5 días de ayuno. La realimentación produjo un incremento significativo en esta actividad enzimática, alcanzando valores muy superiores a los iniciales en trucha. Se aprecia un descenso brusco durante el primer punto de realimentación en el esturión, con un incremento de manera significativa a los 2 meses de realimentación, alcanzando valores superiores a los iniciales.

Actividad de enzimas musculares

La actividad HK muscular sufre un descenso significativo a los 40 días de ayuno y un incremento significativo a los 72 días de ayuno en esturión. En trucha, existe un pico de actividad significativo a los 10 días de ayuno con la posterior recuperación de los valores iniciales en el resto del periodo de ayuno. Dicha actividad se recuperó en ambas especies tras la realimentación. La actividad PK incrementa significativamente a los 5 días de ayuno en ambas especies, disminuyendo a continuación hasta alcanzar los valores control hacia el final del ayuno en el esturión, mientras que en la trucha se mantienen elevados. Tras la realimentación, en el esturión se alcanzaron los valores control, en la trucha fueron significativamente superiores a los controles.

La actividad FBPasa en esturión mostró un descenso de actividad, significativo a los 2 días de ayuno, manteniéndose la actividad durante todo el ayuno. En contraposición, la trucha sufrió un incremento inicial significativo a los 5 días de ayuno, con una tendencia al descenso hasta la recuperación de los valores control hacia el día 40 de ayuno. Tras la realimentación la actividad FBPasa se recuperó en esturión, mientras que en trucha se mantuvo con valores similares al control.

La actividad LDH permanece invariable durante el ayuno en ambas especies, sin embargo, al final de la realimentación experimenta un incremento significativo sólo en esturión, alcanzando valores superiores a los iniciales.

Tabla 5. Actividad específica de enzimas clave del metabolismo intermediario en el músculo blanco del esturión *A. naccarii* (E) y la trucha *O. mykiss* (T) durante el ayuno (A) y la posterior realimentación (R).

Enzima	Pez	Días							
		1A	2A	5A	10A	40A	72A	10R	60R
HK	E	10.06 ^b 1.25	9.82 ^b 0.95	9.12 ^b 1.42	6.16 ^{ab} 1.29	3.13 ^a 0.86	16.52 ^{c*} 2.70	10.02 ^b 2.33	10.09 ^b 2.79
	T	5.35 ^a 0.28	4.92 ^a 0.33	9.12 ^{ab} 1.36	13.57 ^c 4.13	5.61 ^a 1.66	8.81 ^{ab} 0.52	4.89 ^a 1.39	7.62 ^a 0.79
PK	E	2012.5 ^{ab*} 558.0	1908.1 ^{ab*} 284.5	5235.8 ^{c*} 522.6	5414.1 ^{c*} 765.3	1654.2 ^{a*} 342.4	2374.4 ^{ab*} 438.4	1421.1 ^{a*} 278.3	3273.3 ^{a*} 950.2
	T	4661.9 ^a 468.7	5209.6 ^{ab} 351.1	14061.1 ^f 1424.7	10061.8 ^e 734.4	6323.6 ^{abc} 546.6	8691.7 ^{cde} 570.5	7384.5 ^{bcd} 1650.9	9457.4 ^{de*} 904.2
FBPasa	E	16.39 ^{c*} 1.03	9.54 ^{b*} 1.41	7.24 ^{ab*} 1.76	7.78 ^{ab} 1.88	4.75 ^{a*} 1.21	7.96 ^{ab*} 1.73	8.67 ^{ab} 0.68	11.65 ^b 2.22
	T	6.36 ^a 0.63	5.56 ^a 1.14	16.74 ^c 3.64	15.06 ^c 3.27	8.68 ^{ab} 1.31	13.09 ^{bc} 1.16	11.08 ^{abc} 2.34	11.26 ^{abc} 1.21
LDH	E	525.62 ^{a*} 82.32	499.52 ^{a*} 90.32	127.94 ^{b*} 22.07	251.58 ^{b*} 46.02	198.82 ^{b*} 44.50	224.23 ^{b*} 40.28	184.13 ^{b*} 35.13	512.36 ^{a*} 93.35
	T	9832.4 962.8	11365.3 1009.3	9626.9 867.4	11341.0 1001.4	10422.4 1162.1	11644.5 789.3	8955.3 1496.9	12924.2 1218.7
GK	E	5.65 ^a 1.53	5.19 ^a 1.06	136.40 ^b 8.91	248.99 ^c 41.62	170.94 ^{b*} 26.18	147.91 ^{b*} 24.40	205.58 ^{bc} 43.22	192.30 ^{bc*} 14.88
	T	6.30 ^a 1.43	6.28 ^a 1.33	127.03 ^c 22.35	162.57 ^e 15.97	70.06 ^b 9.85	67.69 ^b 4.73	111.89 ^c 32.40	64.61 ^b 9.68
HOAD	E	11.08 ^{dc} 0.95	9.48 ^{cd} 1.40	2.90 ^{a*} 0.36	4.55 ^{ab} 0.55	6.99 ^{bc*} 1.62	12.68 ^c 1.01	6.68 ^{bc} 0.73	6.73 ^{bc} 1.26
	T	11.79 ^{bc} 1.80	8.75 ^{ab} 1.39	8.29 ^{ab} 0.56	7.09 ^{ab} 1.14	16.86 ^d 2.70	15.74 ^{cd} 2.44	8.05 ^{ab} 0.96	5.81 ^a 1.06
CS	E	36.73 ^{ab*} 2.60	45.17 ^{bcd} 3.85	39.18 ^{abc*} 2.53	50.24 ^{cd*} 4.73	29.12 ^a 5.25	33.00 ^a 3.22	29.80 ^{a*} 5.17	55.72 ^d 4.88
	T	48.89 ^{ab} 5.34	50.17 ^{ab} 3.68	93.13 ^c 9.48	96.91 ^c 13.29	43.19 ^a 4.67	45.39 ^a 5.36	70.56 ^b 7.67	68.44 ^b 10.41
EM	E	1.12 ^{a*} 0.25	1.15 ^{a*} 0.13	5.65 ^{b*} 1.12	8.54 ^{cd*} 0.78	2.29 ^{a*} 0.53	6.63 ^{bc*} 1.61	6.13 ^{b*} 1.13	10.74 ^{d*} 0.56
	T	8.22 ^a 0.91	8.27 ^a 1.93	59.47 ^c 6.29	58.47 ^c 16.15	26.07 ^{ab} 2.50	29.04 ^b 2.50	23.75 ^{ab} 4.48	25.77 ^{ab} 1.03
G6PDH	E	0.78 ^a 0.34	1.38 ^a 0.59	11.62 ^b 4.65	2.80 ^{a*} 1.30	0.44 ^{a*} 0.14	1.35 ^{a*} 0.68	3.92 ^a 1.29	4.40 ^a 0.51
	T	0.66 ^a 0.07	1.43 ^{ab} 0.48	16.90 ^c 5.02	17.33 ^c 2.02	4.04 ^{ab} 0.94	6.90 ^b 1.25	5.14 ^{ab} 0.93	5.13 ^{ab} 0.44
GOT	E	281.90 ^a 63.63	273.17 ^a 42.74	319.61 ^a 28.69	497.63 ^{bc} 35.17	225.51 ^{a*} 49.87	356.74 ^{ab} 42.64	271.31 ^a 51.27	521.46 ^{c*} 91.31
	T	231.73 ^a 17.73	331.64 ^{ab} 57.68	531.98 ^c 102.18	477.60 ^{bc} 82.08	365.97 ^{ab} 43.21	299.06 ^a 32.50	285.43 ^a 43.20	264.30 ^a 40.09
GPT	E	32.43 ^{b*} 3.30	30.88 ^{b*} 4.70	36.85 ^b 2.12	33.98 ^b 4.27	15.86 ^a 3.66	20.20 ^a 1.80	17.84 ^{a*} 2.09	32.49 ^b 5.16
	T	18.90 ^a 3.19	17.44 ^a 3.15	38.08 ^b 4.76	49.71 ^b 6.96	22.84 ^a 3.53	15.72 ^a 1.88	38.88 ^b 7.41	22.06 ^a 4.21
GDH	E	32.20 6.25	34.32 8.02	19.46 4.12	21.05 2.87	38.68 7.16	26.83 7.49	25.67 2.90	36.67 7.42
	T	27.28 5.20	24.31 6.35	33.39 5.53	17.57 1.76	29.47 5.37	26.29 1.84	31.54 5.42	23.12 6.81
ACoAT	E	1.89 0.28	1.92 0.23	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	2.58 0.48	2.81 0.37
	T	1.31 0.14	1.45 0.16	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00
βOHBDH	E	0.98 ^{abc} 0.36	0.90 ^{ab} 0.34	1.11 ^{abc} 0.48	2.22 ^c 0.95	0.00 ^a 0.00	0.00 ^a 0.00	1.03 ^{abc} 0.24	1.66 ^{bc*} 0.43
	T	0.40 ^a 0.08	0.52 ^a 0.22	2.78 ^c 0.65	1.75 ^b 0.54	0.00 ^a 0.00	0.00 ^a 0.00	0.47 ^a 0.25	0.52 ^a 0.09

Los valores son medias ± error estándar (n=5; número de peces por punto de muestreo) y se expresaron com mU mg de proteína⁻¹. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre puntos de muestreo para cada especie. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre especies en cada punto de muestreo.

La actividad GK incrementa al comienzo del ayuno haciéndose significativo a los 5 días, alcanzando un máximo de actividad en el día 10 en ambas especies. Durante el resto del periodo de ayuno la actividad GK sigue una tendencia al descenso en el esturión y la trucha aunque sin alcanzar los valores control. Durante la realimentación, la actividad GK no se recuperó en ninguna de las especies, manteniendo valores cercanos a los del final del ayuno. La enzima HOAD tiende al descenso en su actividad inicial hacia los 5 días de ayuno en ambas especies, aunque sólo de manera significativa en el esturión, a partir de este momento, en ambas especies incrementa de manera significativa alcanzando los valores control al final del ayuno en ambas especies. La realimentación produjo un descenso de su actividad alcanzando valores inferiores a los controles.

La actividad CS experimenta un pico de actividad a los 10 días de ayuno en ambas especies de manera significativa, alcanzando de nuevo los valores control al final del ayuno. La realimentación la actividad en trucha se mantuvo cercana a los valores control mientras que en esturión alcanzó valores superiores a los control.

La EM sufre un pico de actividad significativo a los 5 días de ayuno en trucha y a los 10 días de ayuno en esturión, en el resto del periodo de ayuno la actividad enzimática fue igual o superior que en los controles. Tras la realimentación, en esturión se alcanzaron valores significativamente superiores al control, mientras que en la trucha la actividad se mantuvo sin diferencias significativas con respecto a los controles. Por otro lado, la actividad G6PDH experimenta un pico de actividad a los 5 días de ayuno en ambas especies, para retornar a los valores control hacia el final del ayuno. La realimentación no produjo variaciones significativas.

La actividad GOT sufre un incremento al comienzo del ayuno, significativo a los 5 días en la trucha y a los 10 días de ayuno en el esturión. Durante el resto del periodo de ayuno, en ambas especies, los valores no difieren significativamente con los controles. La introducción del alimento produjo un incremento de la actividad GOT de manera significativa sólo en esturión, mientras que la trucha no sufrió alteraciones.

La actividad GPT disminuye de manera significativa en esturión a los 40 días de ayuno, en trucha incrementa hasta los 10 días de ayuno haciéndose significativo y recuperando

los valores iniciales al final del ayuno, tras la realimentación en ambas especies se alcanzan los valores iniciales. La GDH no sufre variaciones significativas durante el ayuno y realimentación ni en esturión ni en trucha.

La actividad ACoAT cae hasta hacerse no detectable a los 10 días de ayuno en esturión y a los 5 días de ayuno en trucha. Tras la realimentación la actividad alcanza los valores iniciales sólo para el esturión. La β -OHBDH sufre un incremento en la actividad en la trucha a los 5 días de ayuno y en el esturión a los 10 días, en el resto del periodo experimental la actividad desciende hasta alcanzar los valores control. Tras la realimentación se recuperó la actividad inicial en ambas especies.

Actividad de enzimas en corazón

La enzima HK y PK no sufre variaciones significativas durante el ayuno en ninguna de las especies. Tras 72 días de realimentación, la actividad PK incrementó de manera significativa en el esturión, mientras que en la trucha se alcanzaron los valores iniciales. Por otro lado, la actividad HK en ambas especies permaneció sin variaciones.

La FBPasa, enzima gluconeogénica, en trucha sufre un descenso significativo a los 2 días de ayuno, manteniéndose la tendencia hasta los 5 días de ayuno, a partir del cuál dicha actividad sufre un incremento alcanzando los valores iniciales hacia el final del ayuno. En esta especie, en el periodo de realimentación, la enzima incrementa su actividad de manera significativa con valores superiores a los del comienzo del experimento. Por otro lado, en esturión, el ayuno y la posterior realimentación no produjo variaciones en su actividad.

La LDH muestra un incremento muy elevado a los 40 días de ayuno en ambas especies. Tras la realimentación dicha actividad disminuye significativamente pero sin alcanzar los valores iniciales en el esturión, mientras que en la trucha dicha actividad permanece elevada.

Tabla 6. Actividad específica de enzimas clave del metabolismo intermediario en el corazón del esturión *A. naccarii* (E) y la trucha *O. mykiss* (T) durante el ayuno (A) y la posterior realimentación (R).

Enzima	Pez	Días							
		1A	2A	5A	10A	40A	72A	10R	60R
HK	E	6.25	5.92	4.20	4.92	6.82*	7.61	5.36*	7.31
		0.31	0.43	1.86	1.54	2.00	0.75	0.52	0.48
	T	9.09	8.92	9.86	9.50	12.50	8.09	15.81	9.30
PK	E	993.8 ^{a*}	1037.5 ^{a*}	1397.3 ^{ab*}	948.4 ^{a*}	1312.7 ^{ab}	1316.8 ^{ab}	1540.0 ^{bc}	1859.3 ^c
		91.8	87.2	172.0	130.7	201.3	177.4	81.3	298.4
	T	2164.7 ^{bcd}	1790.4 ^{abc}	2590.0 ^{ad}	2269.3 ^{cd}	1787.0 ^{abc}	1597.9 ^{ab}	1235.1 ^a	2244.6 ^{cd}
FBPasa	E	4.17 ^{abc*}	4.05 ^{abc*}	2.66 ^{ab}	1.92 ^a	2.64 ^{ab*}	4.08 ^{abc}	4.96 ^{bc*}	5.25 ^{c*}
		0.39	0.90	0.49	0.33	0.57	1.54	1.27	0.89
	T	10.57 ^d	6.44 ^c	2.30 ^a	2.60 ^{ab}	6.02 ^{bc}	8.72 ^{cd}	22.72 ^e	19.24 ^c
LDH	E	1409.3 ^{bc*}	1608.3 ^{bc*}	626.6 ^{d*}	500.0 ^{d*}	2223.2 ^{ab*}	2389.4 ^{a*}	1391.6 ^{c*}	1707.4 ^{bc*}
		125.08	95.85	122.50	94.74	372.31	351.90	144.77	182.78
	T	4100.1 ^{ab}	4526.9 ^a	902.5 ^c	861.4 ^c	3399.2 ^b	3392.6 ^b	4776.5 ^a	4198.3 ^{ab}
GK	E	3.43 ^{a*}	2.86 ^{a*}	53.72 ^{cd*}	35.91 ^{b*}	31.06 ^{b*}	37.04 ^b	43.83 ^{bc*}	59.42 ^{a*}
		0.67	0.46	10.61	3.93	4.70	4.80	3.85	7.46
	T	9.43 ^a	8.17 ^a	93.90 ^c	127.42 ^{de}	57.84 ^b	60.03 ^b	100.07 ^{cd}	132.56 ^c
HOAD	E	70.57 ^{a*}	65.91 ^{a*}	79.22 ^{a*}	64.58 ^{a*}	77.74	72.90 ^{a*}	95.46 ^{a*}	86.96
		8.49	4.48	10.53	7.46	14.12	6.56	3.54	12.93
	T	125.82 ^a	103.63 ^a	117.57 ^a	118.08 ^a	103.14 ^a	129.73 ^a	194.85 ^b	121.46 ^a
CS	E	157.70 ^{bc*}	130.37 ^{ab*}	90.27 ^a	80.55 ^a	158.44 ^{bc}	124.21 ^{ab*}	208.81 ^{c*}	296.85 ^{d*}
		16.60	10.16	17.23	10.32	22.89	19.39	15.53	34.88
	T	246.84 ^b	171.83 ^{ab}	101.72 ^a	104.79 ^a	171.36 ^{ab}	215.27 ^b	555.40 ^d	416.66 ^c
EM	E	27.91 ^{abc*}	35.38 ^c	20.60 ^{ab}	18.63 ^{ab*}	34.74 ^c	15.16 ^{a*}	14.46 ^{a*}	29.83 ^{bc}
		4.27	6.49	4.59	2.68	6.83	2.32	1.82	5.52
	T	72.10 ^d	43.31 ^{abc}	31.06 ^a	50.75 ^{bc}	32.79 ^{ab}	51.86 ^c	48.60 ^{abc}	45.27 ^{abc}
G6PDH	E	1.15 ^{a*}	2.41	4.28 ^{a*}	2.84	3.37	2.84	3.14	2.71
		0.26	1.42	0.55	0.57	1.01	0.74	0.40	0.56
	T	3.20	2.05	2.53	3.03	2.90	2.62	4.50	4.40
GOT	E	1038.5 ^{a*}	1043.8 ^a	1628.0 ^{ab*}	1322.8 ^{a*}	1566.0 ^{ab*}	1964.2 ^{b*}	1415.7 ^{ab*}	1647.8 ^{ab*}
		154.9	145.8	303.9	110.4	304.8	210.3	113.4	291.8
	T	2013.2 ^{ab}	1427.6 ^a	2682.3 ^{bc}	2452.7 ^{bc}	2720.8 ^{bc}	2899.7 ^c	2718.3 ^{bc}	2915.9 ^c
GPT	E	33.07	21.18	44.05	31.60 ^{a*}	43.12 ^{a*}	37.77 ^{a*}	44.37	46.47
		5.93	1.33	8.37	3.47	8.09	7.24	6.14	8.03
	T	32.20 ^{ab}	23.77 ^a	38.30 ^{ab}	46.43 ^b	66.76 ^c	62.74 ^c	42.90 ^b	38.80 ^{ab}
GDH	E	150.26	156.82	151.33	135.13	182.19	164.40	132.41	163.30 ^{a*}
		12.31	10.52	26.02	18.14	29.68	12.47	14.70	16.77
	T	112.25	121.31	147.89	124.02	175.84	158.19	138.35	92.34
ACoAT	E	21.93 ^{ab}	13.99 ^a	27.11 ^b	24.67 ^b	32.58 ^b	23.79 ^{ab*}	28.62 ^b	27.88 ^b
		1.65	0.70	3.92	2.76	7.73	3.86	0.70	4.32
	T	20.53 ^{ab}	16.63 ^a	30.37 ^{bcd}	27.32 ^{bc}	38.51 ^{de}	41.91 ^{de}	39.94 ^e	33.14 ^{cde}
βOHBHDH	E	1.28 ^a	1.24 ^a	2.04 ^{a*}	1.60 ^{a*}	1.23 ^{a*}	1.54 ^{a*}	3.86 ^{b*}	5.19 ^{b*}
		0.16	0.19	0.53	0.17	0.19	0.26	1.22	1.19
	T	2.42 ^a	2.08 ^a	5.22 ^b	5.88 ^{bc}	5.21 ^b	8.12 ^{cd}	16.60 ^c	10.04 ^d
		0.26	0.65	0.72	0.82	1.07	0.47	1.62	0.80

Los valores son medias \pm error estándar ($n=5$; número de peces por punto de muestreo) y se expresaron com mU mg de proteína⁻¹. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre puntos de muestreo para cada especie. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre especies en cada punto de muestreo.

La actividad GK incrementa de manera significativa a los 5 días de ayuno en ambas especies. En esturión, a los 10 días dicha actividad disminuye de manera significativa y se mantiene durante el resto del periodo de ayuno con valores superiores a los iniciales. Por otro lado, en trucha, sigue incrementando la actividad GK de manera significativa a los 10 días de ayuno para descender significativamente a los 40 días, manteniéndose durante el resto del periodo. Tras la realimentación, en esturión la actividad no sufre ninguna variación, manteniéndose más elevada que al comienzo del experimento. Por otro lado, en trucha incrementa su actividad alcanzando valores superiores a los controles.

En contraposición, la enzima HOAD, no sufre variaciones significativas durante el ayuno en ambas especies. La introducción del alimento no produjo cambios en su actividad para el esturión, sin embargo en la trucha se aprecia un incremento significativo en el primer punto de realimentación, restaurándose su actividad a los valores controles tras dos meses de realimentación.

La actividad CS sufre un descenso significativo a los 5 días en esturión y a los 2 días de ayuno en trucha, en el resto del periodo experimental la actividad es mantenida con un incremento significativo hacia el final del periodo. La realimentación produjo la recuperación de dicha actividad con valores superiores a los controles en ambas especies.

La EM en esturión no sufre variaciones significativas durante el ayuno y realimentación. Por otro lado en trucha sufre un descenso inicial significativo a los 2 días de ayuno, sin seguir posteriormente ninguna tendencia. Por otro lado, la actividad G6PDH no sufre variaciones significativas durante todo el periodo experimental en ninguna de las especies.

La actividad GOT se mantiene durante el ayuno y realimentación en ambas especies. Por otro lado, la actividad GPT no sufre variaciones significativas en el esturión, mientras que en la trucha sufre un incremento que se hace significativo a los 40 días de ayuno y se mantiene hasta el final del periodo de ayuno, la realimentación produjo la recuperación a los valores controles en esta especie. La GDH no sufren variaciones significativas durante el periodo de ayuno y realimentación en ni ninguna especie.

La ACoAT se mantiene elevada en ambas especies durante el periodo de ayuno y realimentación. Por otro lado, la β -OHBDH no muestra variaciones significativas en el esturión durante el ayuno, mientras que la trucha experimenta un incremento inicial manteniendo posteriormente su actividad. La realimentación produjo un incremento de la actividad en ambas especies.

Discusión

Durante los primeros 5 días de ayuno, se aprecia un incremento en la utilización de la glucosa como combustible energético, apoyado por el incremento significativo de la actividad PK en el hígado del esturión (Figura 1). La utilización de los carbohidratos durante los primeros 5 días de ayuno con fines glucolíticos queda constatada por una reducción significativa de las reservas de glucógeno hepático en ambas especies. Ello estaría de acuerdo con lo encontrado en la mayoría de las especies, donde el glucógeno hepático es el principal sustrato movilizado ante un periodo de ayuno (Machado et al., 1988; Navarro y Gutiérrez, 1995; Hung et al., 1997; Figueiredo-Garutti et al., 2002; Metón et al., 2003; Pérez-Jiménez et al., 2007). A partir de los 5 días de ayuno, se aprecia un descenso en las actividades PK y HK en ambas especies, así como el mantenimiento de los niveles de glucosa plasmática y de glucógeno hepático (Figura 1). La disminución de la actividad HK inducida por el ayuno prolongado ha sido puesto de manifiesto en otras especies de peces (Shimeno et al., 1997; Kirchner et al., 2005), hecho que tendría como objetivo la limitación del uso de la glucosa con fines glucolíticos. Paralelamente, se produciría un incremento en la gluconeogénesis a partir de sustratos no carbohidratados tales como aminoácidos, como lo demuestra la actividad GPT que permanece elevada en ambas especies a partir de los 5 días de ayuno y durante el resto del periodo de inanición, lo cual estaría de acuerdo con lo encontrado por Shimeno et al. (1990) en carpas. De la misma manera, la actividad LDH permanece a niveles elevados durante el ayuno en ambas especies, indicando la utilización del lactato con fines gluconeogénicos (French et al., 1983). La gluconeogénesis hepática durante un periodo de ayuno prolongado ha sido constatada por otros autores para la trucha arcoiris (*O. mykiss*) (Moon et al., 1989) o la perca amarilla (*Perca flavescens*) (Foster y Moon, 1991). En mamíferos, la conservación de las reservas de glucógeno

durante el ayuno prolongado parece ser esencial para el mantenimiento de la integridad de los tejidos (Phan et al., 1974)

El hígado utiliza dos sustratos fundamentales para la gluconeogénesis, que son el lactato y los aminoácidos.

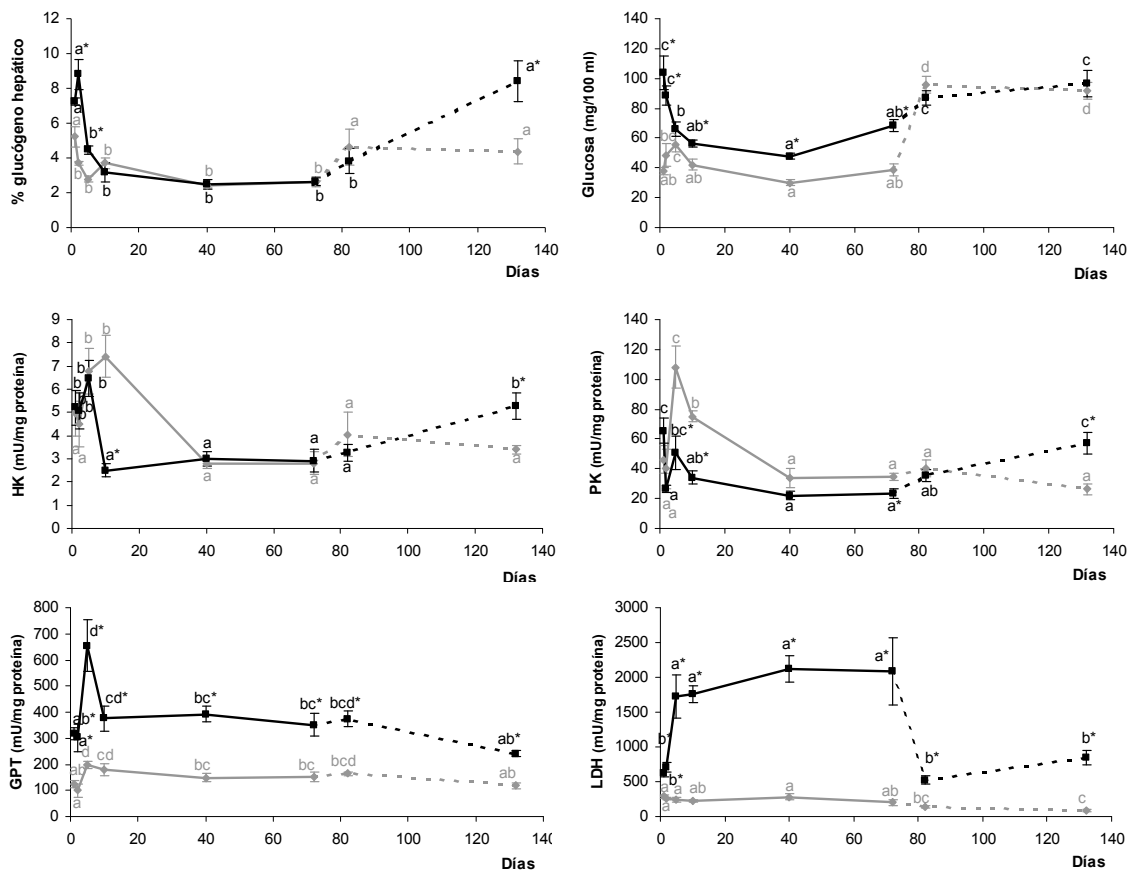


Figura 1. Evolución del contenido en glucógeno hepático, de la glucosa plasmática, y de las principales enzimas implicadas en el metabolismo de hidratos de carbono en hígado (hexoquinasa, HK; piruvato quinasa, PK; glutamato piruvato transaminasa, GPT y lactato deshidrogenasa, LDH durante el ayuno (línea continua) y la realimentación (línea discontinua) en el esturión *A. naccarii* (línea gris) y la trucha *O. mykiss* (línea negra). Diferencias significativas dentro de cada especie entre los distintos días de experimento se indican con letras diferentes. El asterisco indica diferencias significativas entre especies en un mismo punto de muestreo ($P < 0.05$).

Las enzimas indicadoras de gluconeogénesis a partir de sustratos no carbohidratados como GPT y LDH, tienen mayor actividad en trucha con respecto al esturión, mientras que no se aprecian diferencias significativas entre especies para la enzimas indicadora de la oxidación de ácidos grasos (HOAD), por lo que podría decirse que los procesos gluconeogénicos son más importantes en la trucha que en el esturión. Está demostrado que bajo condiciones de ayuno, el acetylCoA procedente de la oxidación de ácidos

grasos no puede ingresar en su totalidad en el ciclo de Krebs por falta de oxalacetato que está siendo utilizado con fines gluconeogénicos, siendo desviado este exceso hacia la formación de cuerpos cetónicos. Nuestros resultados estarían de acuerdo con este hecho, siendo la trucha, la especie con mayor actividad gluconeogénica hepática la que presentaría mayor actividad ACoAT durante el ayuno con respecto al esturión.

En referencia a la utilización de ácidos grasos con fines energéticos, se aprecia un incremento en la β -oxidación, de esta manera, la actividad HOAD incrementa a los 5 días de ayuno sólo en el esturión, aunque no de manera significativa. Así mismo, el incremento de la actividad GK indicaría un aumento de la incorporación del glicerol procedente de la degradación de triglicéridos a la vía glucolítica en ambas especies. La mayor utilización de lípidos hepáticos con fines energéticos en el esturión con respecto a la trucha viene apoyado por un mayor contenido lipídico en el hígado de esta especie, así como una reducción en dichas reservas durante todo el periodo de ayuno, en contraposición a la trucha, cuyo contenido lipídico en hígado no varía. Es conocido que el uso de lípidos hepáticos como combustible energético durante el ayuno depende de la especie, del tejido de reserva lipídica y de la estrategia seguida para movilizar otras reservas tales como los carbohidratos. De esta manera, el esturión movilizaría los lípidos hepáticos en mayor medida que la trucha, puesto que en esta especie el hígado es el principal órgano de reserva lipídica, en contraposición a la trucha que los almacena en el tejido perivisceral.

La transaminasa hepática GPT, encargada de la producción de piruvato a partir de alanina, experimenta un incremento en su actividad a los 5 días de ayuno en ambas especies, aunque este incremento de actividad es mayor en la trucha que en el esturión. Por otro lado, cabe destacar que la GOT no sufre variaciones en ninguna de las especies. El incremento de la actividad GPT hepática durante el ayuno ya ha sido puesto de manifiesto anteriormente en muchos teleósteos como indicadora del flujo de aminoácidos con fines gluconeogénicos (French et al., 1981; Suárez y Mommsen, 1987).

La enzima CS, indicadora del metabolismo oxidativo, experimentó un incremento significativo en ambas especies en los primeros días de ayuno (5 días), lo que indicaría un incremento en la oxidación de los diferentes combustibles energéticos,

fundamentalmente carbohidratos en ambas especies. A partir de los 5 días de ayuno y durante el resto del periodo experimental la enzima CS presenta una actividad sostenida en ambas especies.

Por otro lado, la enzima EM sufre un descenso evidente sólo en la trucha en los primeros días de ayuno, lo que podría ser indicativo de un descenso en la síntesis de lípidos, fundamentalmente en esta especie. La influencia negativa del ayuno sobre la síntesis de lípidos ha sido constatada por otros autores en salmónidos (Lin et al., 1977; Jürss et al., 1986)

El periodo de realimentación produjo un incremento significativo de las reservas hepáticas de glucógeno en ambas especies, alcanzando valores similares a los controles. Este hecho ha sido constatado por otros autores, tales como Soengas et al. (1996) en *Salmo salar*. No obstante, la recuperación de las reservas de glucógeno en hígado en realimentación varía con la especie. De esta manera, algunos autores han observado un incremento del glucógeno hepático tras la realimentación, superando ampliamente los valores iniciales (Machado et al., 1988; Shimeno et al., 1990). Por otro lado, Doraswamy Reddy et al. (1988), en estudios realizados con tilapias, observan una reducción del glucógeno hepático en esta especie. El contenido en lípidos se ve incrementado durante la realimentación, aunque sólo fue significativo en el esturión, alcanzando valores similares a los iniciales. La trucha no mostró variaciones significativas. Este hecho confirma la importancia del hígado como tejido de reserva en el esturión, a diferencia de la trucha, que los exporta para almacenarlos en el tejido perivisceral. El mayor incremento y los mayores niveles de triglicéridos, lípidos totales, colesterol total, y colesterol HDL de la trucha con respecto al esturión, apoyan la mayor movilización de grasas por parte de la trucha desde el hígado hacia los tejidos periviscerales.

Todas las enzimas del metabolismo intermediario que sufrieron variaciones durante el periodo de ayuno se recuperan tras dos meses de realimentación.

La recuperación de las reservas de glucógeno en hígado tienen como consecuencia una estimulación de la vía glucolítica, lo cual se ve evidenciado por la recuperación de la actividad HK y PK, así como de la vía de las pentosas fosfato por el incremento de la

actividad G6PDH. Así mismo, la actividad CS incrementó en ambas especies, alcanzando valores superiores al control, lo que indicaría un incremento de la oxidación de los sustratos que están siendo introducidos con el alimento. La estimulación de la enzima G6PDH, productora de NADPH, junto con la gran cantidad de acetilCoA generado por la vía glucolítica favorecerían la lipogénesis. Por otra parte, las enzimas indicadoras de la síntesis de cuerpos cetónicos (ACoAT y β OHBDH), incrementan su actividad, tal vez para evitar el colapso el ciclo de Krebs por el exceso de acetilCoA proveniente de los procesos oxidativos.

En el músculo blanco de ambas especies, los niveles de glucógeno sufren un descenso significativo a los 5 días de ayuno, coincidiendo con un pico de actividad de la enzima glucolítica PK, lo que sería indicativo de una movilización de las reservas glucídicas como combustible energético en los primeros momentos de ayuno. La movilización del glucógeno muscular en los primeros estadios del ayuno ha sido puesto de manifiesto por Black y Love (1986) en el bacalao del Atlántico. Por otro lado, en otras especies sometidas a ayuno no se aprecian variaciones en las reservas de glucógeno muscular (Dave et al., 1975; Blasco et al., 1992; Gutiérrez et al., 1991). Así mismo, se aprecia durante todo el ayuno un descenso en los niveles de lípidos musculares en ambas especies que, junto con el incremento de la actividad HOAD y GK, indican la utilización de las reservas lipídicas musculares durante todo el periodo experimental con fines energéticos. Por otro lado, el mantenimiento de las actividades LDH y FBPasa durante el ayuno podría indicar que el lactato está siendo utilizado en parte como sustrato gluconeogénico, aspecto que ya ha sido indicado en otras especies de peces (Ferguson y Storey, 1991).

Así mismo, el mantenimiento y/o incremento de la actividad GPT, junto con el descenso de las proteínas musculares también parece indicar el uso de este sustrato como fuente de energía durante el ayuno en ambas especies. La transaminasa hepática GOT y la enzima GDH también permanecieron activas durante el ayuno, corroborando el catabolismo proteico. Las proteínas son la principal fuente energética en el músculo ante condiciones de ayuno, puesto que en términos absolutos es el principal componente muscular (Machado et al., 1988). Algunos autores como Lowery y Somero (1990) y Beaulieu y Guderley (1998) sostienen que la respuesta adaptativa muscular al ayuno compromete más al músculo blanco glucolítico que al rojo oxidativo.

El mantenimiento de la actividad CS en ambas especies corrobora la utilización de los distintos sustratos energéticos para obtener energía fundamentalmente con fines oxidativos para el mantenimiento de la función muscular. En el presente estudio se confirma que, tanto en esturión como en trucha, los cuerpos cetónicos tienen un papel poco relevante en el metabolismo del músculo blanco, lo que se traduce en una baja actividad de las enzimas encargadas de metabolizar estos sustratos (Moyes et al., 1989).

De manera global, nuestros resultados estarían en concordancia con estudios previos (Méndez y Wieser, 1993), en los que se postula una priorización de la utilización de las reservas energéticas musculares en los peces ante situaciones de ayuno, utilizando en primer lugar las reservas de glucógeno, seguido por la movilización de lípidos endógenos y en última instancia la degradación proteica como fuente principal de energía.

Al igual que lo observado en otras especies de peces (Guderley et al., 2003) también en el músculo blanco de ambas especies la realimentación dio lugar al restablecimiento del perfil metabólico previo al ayuno. No obstante, se observa como algunas reservas energéticas, tales como el contenido en glucógeno muscular, no son totalmente restablecidas tras la realimentación.

El músculo cardíaco utiliza principalmente glucosa y ácidos grasos provenientes de la sangre con sustratos oxidativos durante el ayuno. En este sentido, la utilización de estos metabolitos energéticos queda puesto de manifiesto por el mantenimiento y/o incremento de las enzimas implicadas en las rutas metabólicas correspondientes. De esta manera, las actividades enzimáticas HK y PK no experimentan variaciones, indicando el mantenimiento de la vía glucolítica. Así mismo, las actividades GK y HOAD, indicativas de la utilización de lípidos, permanecen elevadas. El mantenimiento del metabolismo oxidativo queda constatado por una actividad sostenida de la enzima CS cardíaca en ambas especies. En la utilización de distintos combustibles por el corazón, el lactato es uno de los preferenciales, siendo utilizado como combustible para el metabolismo aerobio, apreciándose una activación de la enzima LDH durante el ayuno. De acuerdo con lo indicado por otros autores (Zammit y Newsholme, 1979; Moon y Mommsen, 1987; Singer y Ballantyne 1989), los cuerpos cetónicos parecen ser un importante combustible durante el ayuno para el corazón de ambas especies. Así,

tanto la actividad ACoAT como la β OHBDH se mantienen o incluso aumentan a lo largo del periodo de ayuno. El metabolismo proteico no se ve afectado por el ayuno, manteniéndose las actividades de las tres enzimas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos, e incluso en el caso de la trucha se produce un aumento de la actividad GPT como consecuencia de la inanición. Esto indicaría que también los aminoácidos jugarían un papel importante en el metabolismo cardiaco durante la ausencia de alimento.

Respecto a la realimentación, el corazón refleja un aumento de la actividad oxidativa como una clara respuesta al lógico incremento de actividad del animal derivado de la ingestión de alimento. En las primeras etapas de la realimentación, los principales sustratos serían los ácidos grasos y los cuerpos cetónicos. Aunque a largo plazo el corazón parece utilizar todos los combustibles disponibles, aunque, por el nivel de actividad de las distintas enzimas implicadas en su metabolismo, confirmarían que los ácidos grasos serían los sustratos preferentes para el corazón de ambas especies.

En conclusión, durante los primeros días de ayuno incrementa el uso de carbohidratos como combustible energético en el hígado, constatado por un descenso en las reservas de glucógeno en ambas especies. En periodos más prolongados de ayuno, se aprecia un incremento en la gluconeogénesis a partir de sustratos no carbohidratados como aminoácidos y lactato, en mayor medida en la trucha que en el esturión. El hecho de que los procesos gluconeogénicos sean más importantes en la trucha que en el esturión provoca que el exceso de acetilCoA procedente de la oxidación de ácidos grasos, no pueda ser ingresado en el ciclo de Krebs, sea desviado hacia la formación de cuerpos cetónicos en mayor medida en esta especie impuesto por la circunstancia del ayuno. No obstante, en condiciones control, el hígado del esturión está más capacitado para sintetizar cuerpos cetónicos que el de la trucha, al igual que ocurre en elasmobranquios. Por otro lado, el esturión utiliza en mayor medida los lípidos hepáticos con fines energéticos que la trucha, puesto que el hígado es el principal órgano de reserva lipídica en esta especie, en contraposición a la trucha, que los almacena perivisceralmente.

La realimentación produjo la recuperación del glucógeno hepático en ambas especies, mientras que sólo en esturión se produjo el incremento del contenido en lípidos.

Los lípidos plasmáticos se vieron incrementados en mayor medida en la trucha con respecto al esturión, puesto que el esturión almacena los lípidos en hígado, mientras que la trucha los exporta al tejido perivisceral para ser almacenados.

A nivel muscular, las reservas de glucógeno son las primeras movilizadas durante el ayuno en ambas especies, así como la reserva lipídica que es consumida durante todo el periodo de ayuno. No obstante, el metabolismo muscular durante el ayuno es soportado principalmente por las proteínas, puesto que en términos absolutos es el principal componente muscular.

En el corazón de ambas especies, los sustratos utilizados con fines oxidativos son la glucosa y los ácidos grasos provenientes de la sangre, así como el lactato. Hay que destacar el papel de los cuerpos cetónicos, los cuales son utilizados como combustible energético por el corazón ante un ayuno prolongado.

IV-2.3. CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos al determinar enzimas del metabolismo intermediario en el esturión *Acipenser naccarii* y en la trucha *Onchorynchus mykiss* nos indican que:

1.- En términos generales, el esturión muestra una menor actividad específica de la mayoría de las enzimas del metabolismo intermediario evaluadas en la presente tesis, en comparación con la trucha.

2.- En el esturión, hígado y músculo blanco poseen la misma capacidad de síntesis de glucosa, siendo el glicerol un precursor gluconeogénico importante en el músculo blanco de esta especie, mientras que en la trucha, la gluconeogénesis tiene lugar principalmente en el hígado.

3.- A diferencia de los teleósteos, el hígado es el principal órgano de almacén de lípidos en el esturión. A su vez, posee una mayor capacidad para sintetizar cuerpos cetónicos que el de la trucha, que serán utilizados con fines energéticos en otros órganos del esturión, supliendo, en parte, la menor cantidad de lípidos plasmáticos de procedencia hepática. No obstante, se ha constatado la capacidad del esturión para oxidar ácidos grasos en tejidos extrahepáticos.

4.- La comparación en las actividades de las enzimas PK y HOAD hepáticas en el esturión y en la trucha indicaría una mayor capacidad relativa de utilización a nivel metabólico de los hidratos de carbono y los lípidos en el esturión con respecto a la trucha.

5.- En las primeras etapas del ayuno, tanto en esturión como en trucha, incrementa la actividad de enzimas glucolíticas hepáticas, provocando un descenso de los niveles de glucosa plasmática y de las reservas de glucógeno. En etapas posteriores, los niveles de glucosa plasmática y glucógeno hepático se mantienen tras el descenso inicial, incrementando la gluconeogénesis a partir de lactato y aminoácidos en mayor medida en la trucha y disminuyendo la glucolisis en ambas especies.

6.- La utilización de ácidos grasos hepáticos con fines energéticos ocurre durante todo el periodo de ayuno, siendo más evidente en el esturión, puesto que en esta especie el hígado es el principal órgano de reserva lipídica.

7.- Durante el ayuno, la síntesis de cuerpos cetónicos es mayor en la trucha que en el esturión, debido probablemente al exceso de acetilCoA incapaz de ser ingresado en el ciclo de Krebs por falta de intermediarios.

8.- La realimentación se restablecieron la practica totalidad de los parámetros que sufrieron alteraciones como consecuencia del ayuno.

**IV-3. ESTUDIO COMPARADO DE PARÁMETROS
INDICADORES DEL ESTADO DE ESTRÉS
OXIDATIVO EN EL ESTURIÓN *Acipenser naccarii* Y
EN LA TRUCHA *Oncorhynchus mykiss*.**

IV-3.1. ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES Y NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN EL ESTURIÓN *Acipenser naccarii* Y EN LA TRUCHA *Oncorhynchus mykiss*. ESTUDIO COMPARADO.

Resumen

Se determinaron las actividades de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, glutathion peroxidasa, glutathion reductasa) y la peroxidación lipídica en diferentes tejidos (branquias, corazón, tracto digestivo, hígado, músculo blanco, piel, glóbulos rojos y vejiga natatoria) en la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) y en el esturión (*Acipenser naccarii*). La actividad antioxidante total en los diferentes tejidos fue, de manera general, excepto para la catalasa, mayor en trucha que en esturión, con una tendencia inversa en el hígado. En ambas especies, la peroxidación lipídica en el tracto digestivo fue mayor que en el resto de tejidos. El esturión, comparado con la trucha, presenta un mayor contenido de lípidos como reserva energética en el hígado y músculo, por lo que parecen tener una protección más efectiva frente a la oxidación, constatado por la baja peroxidación lipídica.

Introducción

Como todos los organismos aeróbicos, los peces son susceptibles de ser dañados por especies de oxígeno reactivas y, lo que ha hecho que desarrollen un sistema de defensa antioxidante, que los proteja de las mismas. Existen varias circunstancias que promueven la respuesta de las defensas antioxidantes en peces. Factores intrínsecos al propio pez, tales como la edad, posición filogenética y hábitos alimenticios, así como factores ambientales tales como el tipo de dieta suministrada, los cambios diarios y estacionales en la temperatura, el oxígeno disuelto, las toxinas presentes en el agua, patologías o parásitos pueden fortalecer o atenuar las defensas antioxidantes (Felton, 1995; Martínez-Álvarez et al., 2005). La mayoría de las investigaciones sobre el estrés oxidativo en peces están focalizadas sobre aspectos toxicológicos, como el efecto de diferentes xenobióticos sobre la actividad de enzimas antioxidantes, la inducción de

procesos de biotransformación en la peroxidación lipídica y otros biomarcadores de daño oxidativo (Di Giulio et al., 1989; Winston y Di Giulio, 1991). A pesar de que estos parámetros han sido usados como biomarcadores para contaminantes, no existe un consenso en la bibliografía, puesto que la respuesta de los peces depende de varias variables tales como la especie, el tejido, los parámetros antioxidantes, tiempo de exposición y concentración de contaminantes, junto a otros cambios fisiológicos y ambientales mencionados anteriormente.

Estudios sobre el estrés oxidativo en peces han abierto un gran número de líneas de investigación sobre la fisiología de peces en los últimos años (Rudneva, 1997, 1999; George et al., 2000a,b; Ross et al., 2001; Martínez-Álvarez et al., 2002; Morales et al., 2004). Estudios adicionales podrían proporcionar información más precisa concerniente a la respuesta de las defensas antioxidantes bajo diferentes circunstancias así como sobre los mecanismos reguladores de estas respuestas, lo que sin duda sería beneficioso para la producción piscícola.

Las principales enzimas conocidas con actividad antioxidante son la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión reductasa (GR). El estrés oxidativo en un organismo viene producido por un desequilibrio entre los procesos oxidativos y los sistemas de defensa antioxidantes, originándose daños tisulares, que en el caso de los lípidos, pueden ser cuantificados por la formación de peróxidos (Halliwell y Gutteridge, 2000).

La trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) fue uno de los primeros peces cultivados y por tanto su fisiología se conoce bastante bien. Actualmente, en algunos países europeos, como Italia y España, se está introduciendo el cultivo del esturión *Acipenser naccarii*. Esta especie anádroma, migra estacionalmente desde los ríos Po, Ticino y Adigge al mar Adriático (Clementi et al., 1999). Estudios recientes (Garrido-Ramos et al., 1997; Hernando et al., 1999; De la Herrán et al., 2004) han puesto de manifiesto que la distribución histórica de esta especie incluía ciertos ríos españoles. Esto abre la posibilidad de investigar diferentes aspectos de un grupo de peces primitivos que datan del Triásico con el objetivo de dilucidar aspectos sobre su metabolismo oxidativo y defensas antioxidantes y ayudar con ello a su cultivo (Martínez-Álvarez et al., 2002).

En este trabajo se realizó un estudio comparado de las actividades enzimáticas antioxidantes SOD, CAT, GPX, GR y de los niveles de peroxidación lipídica en branquias, corazón, tracto digestivo, hígado, músculo blanco, piel, glóbulos rojos y vejiga natatoria del esturión *A. naccarii* y la trucha *O. mykiss* mantenidas bajo condiciones de piscifactoría.

Material y métodos

Animales de experimentación

Como animales de experimentación se utilizaron 10 esturiones (*Acipenser naccarii*) de edad 1+ y 656.15 ± 15.00 g de peso medio y 10 truchas (*Oncorhynchus mykiss*) de edad 1+ y 289.5 ± 5.0 g de peso medio. Ambas especies procedían de la piscifactoría Sierra Nevada S.L. (Riofrío, Granada). Las condiciones de mantenimiento y alimentación fueron propias del régimen de piscifactoría. Ambos animales, en el periodo de alimentación, se alimentaron con la misma dieta artificial (Le Gouessant, Francia), con una composición química aproximada de 48% de proteína, 14% de lípidos, 11,4% de cenizas y 15% de carbohidratos.

Toma de muestras

Previo sacrificio de los animales se tomaron muestras de sangre de la vena caudal usando jeringas heparinizadas. Las muestras se mantuvieron en hielo hasta su centrifugación. Posteriormente, se extrajo el hígado, el corazón y una porción de músculo blanco de la región dorsal. Las muestras fueron introducidas rápidamente en nitrógeno líquido. La conservación se realizó a -80°C hasta posterior tratamiento y análisis.

Tratamiento de las muestras

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 650 g durante 10 minutos para separar los glóbulos rojos del plasma, el sobrenadante de la hemólisis de los glóbulos rojos se obtuvo de acuerdo con el método de Marcon y Filho (1999). El método consiste en

lavar brevemente los glóbulos rojos con solución salina al 9 % en proporción 1:3 (v/v), la mezcla fue centrifugada a 650 g durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió dos veces. Posteriormente, a los glóbulos rojos se les adicionó una solución tampón (Tris-HCl 20 mM pH 7.8, glicerol 10 % (v/v) y triton X-100 0.1 % (v/v)) en relación 1:9 (v/v) y se congeló durante 12 horas a -20°C para la lisis celular. Tras este periodo de tiempo, las células se centrifugaron 10 minutos a 5000 g y 4 °C. El sobrenadante fue congelado a -80°C hasta su análisis.

Las muestras de tejidos tomadas de todos los animales fueron homogeneizadas. Para ello se usó un tampón Tris-HCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, tritón X-100 0.1 %, pH 7.8 en una proporción 1 g de tejido en 9 ml de tampón.

Los homogeneizados fueron sometidos a una centrifugación de 30000 g durante 30 minutos a 4°C en una centrifuga “Kontron” mod. Centrikon H-401. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante que fue congelado a -80°C hasta su posterior análisis.

Métodos analíticos

Todas las determinaciones enzimáticas se llevaron a cabo a $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ usando un espectrofotómetro microplaca PowerWave_x. Las reacciones enzimáticas se iniciaron con la adición del extracto de tejido, excepto para la SOD donde se usó la xantina oxidasa.

La actividad catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) se determinó midiendo la disminución de la concentración de H₂O₂ a 240 nm siguiendo el método de Aebi (1984). La mezcla de reacción contenía tampón fosfato potásico 50 mM pH 7 y solución extemporánea de H₂O₂ 10.6 mM.

La actividad superóxido dismutasa (SOD; EC.1.15.1.1) se determinó espectrofotométricamente usando el método de reducción del ferricitocromo c por radicales libres superóxido generados por el sistema xantina/xantina oxidasa. La mezcla de reacción consistió en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8, EDTA 0.1 mM, citocromo c 0.013 mM y xantina oxidasa 0.024 U·ml⁻¹. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir una

inhibición del 50% de la reducción del ferricitocromo c medido a 550 nm (McCord y Fridovich, 1969).

La actividad glutathion peroxidasa (GPX; EC 1.11.1.9) fue determinada usando el método de Flohé y Günzler (1984). Para evitar la interferencia de la hemoglobina las muestras de sangre fueron tratadas con KCN (reactivo Drabking; Sigma Chemical Co.). La mezcla de reacción contenía tampón fosfato potásico 50 mM pH 7, EDTA 0,5 mM, azida sódica 1 mM, NADPH 0.15 mM, H₂O₂ 0.15 mM. A todo lo anterior se le añadió una solución recientemente preparada de glutathion reductasa 2.4 U·ml⁻¹ en tampón fosfato potásico 0.1 M pH 7. Tras la adición de glutathion reducido 1 mM se midió el consumo de NADPH a 340 nm.

La determinación de la actividad glutathion reductasa (GR; EC.1.6.4.2) se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Calberg y Mannervik (1975), con algunas modificaciones, basado en la medida de la oxidación del NADPH a 340 nm. La mezcla de reacción contenía tampón fosfato sódico 0.1 M a pH 7.5, EDTA 1 mM, NADPH 0.63 mM y glutathion oxidado 0.15 mM.

Una unidad de actividad enzimática CAT, GPX y GR se definió como la cantidad de enzima requerida para transformar 1 μmol de sustrato por minuto bajo las condiciones del ensayo.

Los niveles de peroxidación lipídica fueron determinados cuantificando la concentración de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) expresados como nmol·g tejido⁻¹ siguiendo el método descrito por Buege y Aust (1978).

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como medias ± error estándar. Las diferencias entre especies en un tejido para cada actividad enzimática se determinaron usando el test t-Student ($P < 0.05$). Para el análisis de la dependencia entre dos variables, se estimó el coeficiente de correlación de Pearson y los datos fueron ajustados a una regresión lineal. Todo el análisis estadístico se realizó usando el paquete estadístico SPSS 13.0 para Windows.

Resultados

Los valores más altos para la actividad SOD se determinaron en el hígado de ambas especies, seguidos de corazón, tracto digestivo y vejiga natatoria, mientras que la menor actividad estuvo presente en glóbulos rojos, valores ligeramente superados por los de piel, músculo y branquias, donde los valores fueron muy similares (Tabla 1).

La actividad CAT, como en el caso de la SOD, fue superior en el hígado de ambas especies. En el esturión, la mayor actividad CAT hepática fue seguida de la actividad en tracto digestivo, glóbulos rojos, branquias, corazón y vejiga natatoria. En la trucha, los valores para la actividad CAT en hígado fueron seguidos en orden decreciente por glóbulos rojos, músculo blanco, tracto digestivo, branquias, corazón, vejiga natatoria y piel.

La actividad catalasa en músculo blanco de trucha fue significativamente mayor que en esturión, mientras que en branquias, corazón y vejiga natatoria la actividad fue muy similar en ambas especies. En el resto de los tejidos (hígado, tracto digestivo, piel y glóbulos rojos) fue significativamente superior en el esturión con respecto a la trucha.

En ambas especies, la actividad GPX más alta fue encontrada en el tracto digestivo, con valores intermedios en el músculo blanco, piel, branquias, y vejiga natatoria, mientras que los valores más bajos se determinaron en hígado, corazón y glóbulos rojos. Las actividades para corazón, branquias y vejiga natatoria fueron similares en ambas especies, mientras que en hígado, músculo y piel, el esturión presentó valores superiores. La trucha mostró mayores actividades sólo en el tracto digestivo y en glóbulos rojos.

Tabla 1. Actividades superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión reductasa (GR) en diferentes tejidos de trucha y esturión.

	Branquias		Corazón		Digestivo		Hígado	
	Esturión	Trucha	Esturión	Trucha	Esturión	Trucha	Esturión	Trucha
SOD (U·mg proteína ⁻¹)	28.20 ± 4.98	46.79 ± 7.55	612.06 ± 45.01	655.81 ± 41.81	240.33 ± 17.95*	707.94 ± 34.38	967.63 ± 48.69*	834.69 ± 28.15
CAT (U·mg proteína ⁻¹)	39.43 ± 5.19	29.98 ± 2.71	4.10 ± 0.34	5.76 ± 1.02	114.65 ± 8.36*	31.64 ± 9.57	159.09 ± 10.33*	116.74 ± 11.36
GPX (mU·mg proteína ⁻¹)	137.83 ± 14.96	159.19 ± 15.14	104.36 ± 7.87	112.10 ± 9.05	333.80 ± 40.99*	667.29 ± 47.14	105.27 ± 8.58*	66.79 ± 8.30
GR (mU·mg proteína ⁻¹)	7.47 ± 0.53*	28.30 ± 3.94	4.62 ± 0.65*	9.78 ± 1.42*	174.25 ± 21.36*	330.80 ± 55.93	46.21 ± 9.45*	27.21 ± 3.43

	Músculo blanco		Piel		Glóbulos Rojos		Vejiga natatoria	
	Esturión	Trucha	Esturión	Trucha	Esturión	Trucha	Esturión	Trucha
SOD (U·mg proteína ⁻¹)	26.84 ± 2.81	29.57 ± 2.00	9.45 ± 2.12*	23.05 ± 1.71	2.20 ± 0.14*	12.92 ± 1.40	262.47 ± 26.72*	495.75 ± 79.42
CAT (U·mg proteína ⁻¹)	4.27 ± 0.59*	46.21 ± 6.87	0.97 ± 0.09*	0.38 ± 0.05	79.43 ± 4.30*	64.17 ± 3.88	4.97 ± 0.92	5.52 ± 0.67
GPX (mU·mg proteína ⁻¹)	155.22 ± 0.12*	100.18 ± 4.14	216.06 ± 17.33*	126.29 ± 6.78	63.24 ± 6.73*	100.27 ± 6.00	282.38 ± 39.18	215.08 ± 37.09
SOD (U·mg proteína ⁻¹)	698.76 ± 85.09	817.94 ± 64.81	1.72 ± 0.37	2.56 ± 0.22	2.55 ± 0.36*	1.17 ± 0.10	2.85 ± 0.57*	66.76 ± 8.17

Los valores son media ± error estándar. (n=10) * Diferencias significativas entre especies para una misma actividad enzimática ($P < 0.05$).

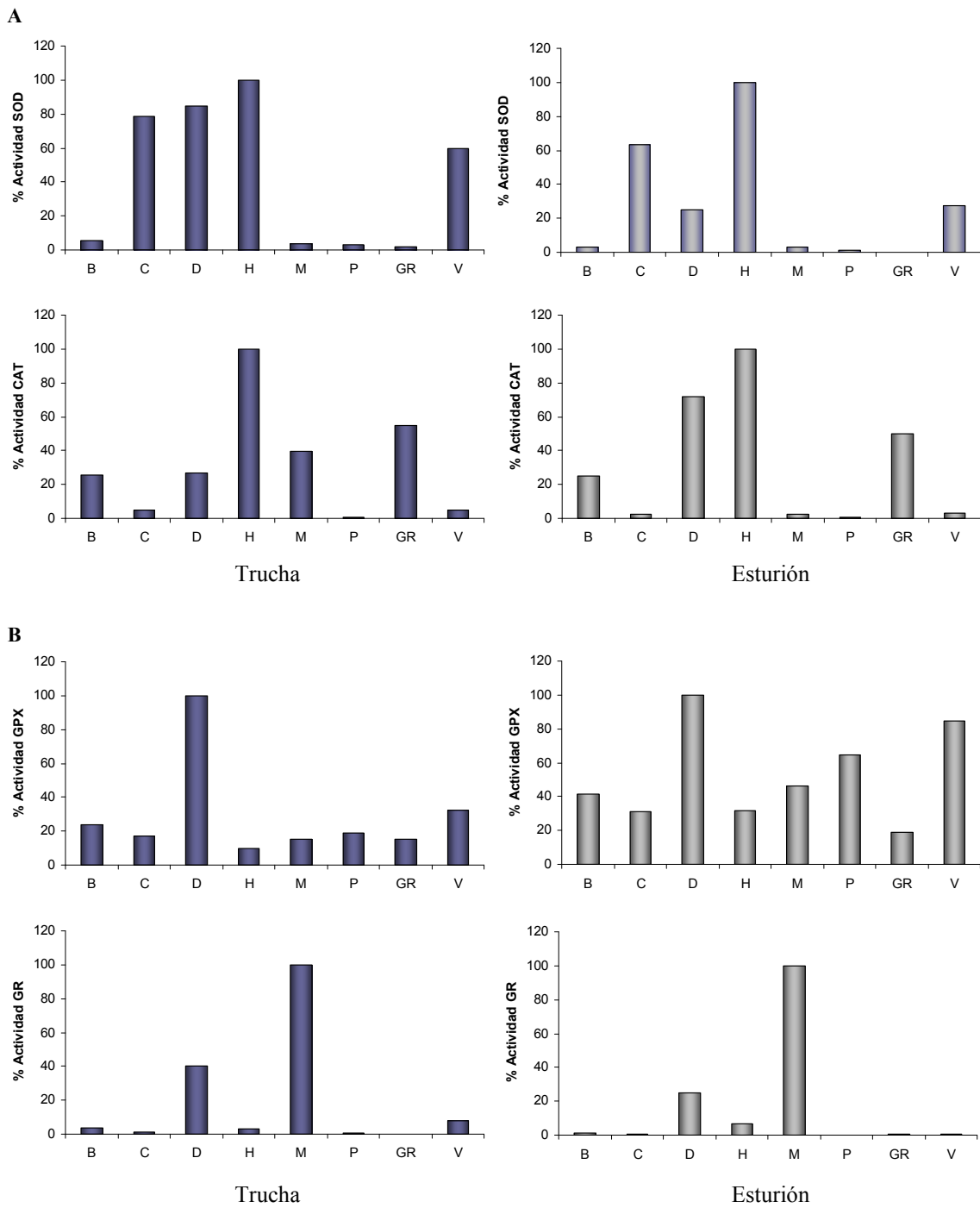


Figura 1. (A) Actividad SOD y CAT en diferentes tejidos de trucha y esturión. (B) Actividad GR y GPX en diferentes tejidos de trucha y esturión. En cada gráfica, el valor medio más alto de actividad específica se consideró como el 100%

B, branquias; C, corazón; D, digestivo; H, hígado; M, músculo blanco; P, piel; GR, glóbulos rojos; V, vejiga natatoria.

Los valores para la actividad GR encontrados en los diferentes tejidos de ambas especies muestran un patrón similar, donde la mayor actividad se encontró en músculo blanco, seguido del tracto digestivo y piel, mostrando los glóbulos rojos los valores mas bajos. Se determinaron actividades ligeramente superiores en corazón, vejiga y branquias. Excepto para el hígado y glóbulos rojos, la trucha mostró valores más altos que el esturión. Es digno de atención las diferencias encontradas en el músculo blanco de ambas especies, donde la actividad de esta enzima fue mucho mas alta que en otros tejidos.

En relación a la peroxidación lipídica (Figura 4), los valores en el tracto digestivo fueron de 10 a 20 veces superiores que en otros tejidos. En hígado, la peroxidación en esturión fue significativamente mas alta que en trucha. Por el contrario, la peroxidación lipídica de músculo blanco y piel en trucha fue superior a la de esturión. En trucha, los niveles encontrados en branquias y piel, aunque son más bajos que los del tracto digestivo, fueron más altos que en los otros tejidos, donde los valores fueron más bajos y muy similares en ambas especies.

Discusión

La SOD es la primera enzima que responde ante los radicales de oxígeno (McCord y Fridovich, 1969) y es la que presenta mayor respuesta a las situaciones prooxidantes (Winston y Di Giulio 1991). Cualquier situación que aumente el consumo de oxígeno por la mitocondria aumentará proporcionalmente la generación de O_2^- (Camougrand y Rigoulet, 2001). Experimentos realizados en animales ponen de manifiesto una correlación entre la SOD y la tolerancia a la toxicidad del oxígeno (Pérez-Campo et al., 1993).

La Tabla 1 muestra que en ambas especies la actividad SOD es más elevada en hígado. Este hecho también se ve reflejado en la Figura 1A y 1B, la cuál muestra para cada enzima el porcentaje relativo entre tejidos en cada especie, tomando el valor de 100 el tejido que presenta la mayor actividad. Es conocido que el hígado de vertebrados tiene un alto metabolismo y consumo de oxígeno, y por tanto, es el que mejor representa el estatus de defensas antioxidantes en el organismo (Chance et al., 1979; Davies, 1991;

Wilhelm-Filho et al., 1993). Así pues nuestros resultados encontrados en la trucha como ejemplo de teleosteo y en el esturión como acipensérido (condrósteo) están de acuerdo con los existentes en bibliografía (Wdzieczak et al. 1982; Cassini y Albergoni, 1993; Wilhelm Filho y Boveris, 1993; Wilhelm-Filho et al., 1993; Avci et al. 2005), tanto en elasmobranquios como en teleosteos.

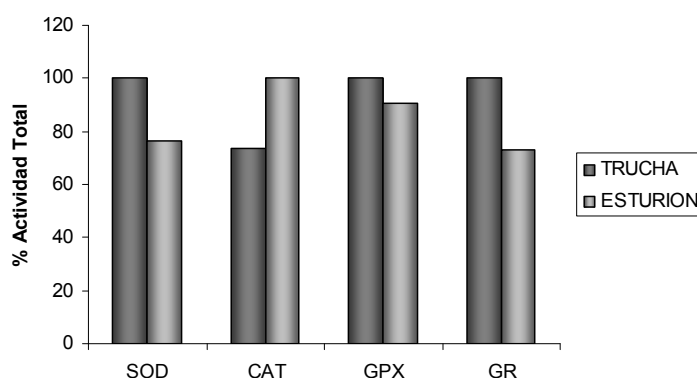


Figura 2. Actividad tisular total en trucha y esturión. Valores para cada enzima expresados como porcentaje en el cual el valor máximo de actividad para una enzima en una especie asume el valor 100%.

Por otra parte, en todos los tejidos menos en el hígado, la actividad de la enzima SOD en la trucha es mayor a la del esturión (Tabla 1). Esto se ve reflejado en el porcentaje de actividad en la totalidad de los tejidos (Figura 2) y en el hígado (Figura 3), donde para cada enzima el valor 100 corresponde a la especie que tiene la actividad enzimática mayor. El esturión es un animal bentónico y menos activo que la trucha, Kieffer et al. (2001) encontraron que el consumo de oxígeno en reposo para los esturiones *Acipenser naccarii* y *Acipenser oxyrinchus* fue del 10-20% menor que para la trucha. Además, se ha encontrado que la actividad SOD en sangre en jureles (*Trachurus mediterraneus*) y caramel (*Spicara smaris*), especies pelágicas nadadoras, fue significativamente mayor que en especies de fondo (Rudneva, 1997). El bajo consumo de oxígeno por los esturiones podría explicar la baja actividad de enzimas antioxidantes. Otra posible explicación, de acuerdo con algunos autores, es que las enzimas antioxidantes parecen estar correlacionadas con la posición filogenética, donde las especies más ancestrales exhibirían menor actividad (Rabie et al., 1972; Smith, 1976; Tappel et al., 1982). Además, Rudneva (1997) describió que los altos niveles de urea, glutatión y vitamina K encontrados en *Squalus acanthias* (elasmobranquio) podría compensar el sistema antioxidante limitado, asumiendo que los antioxidantes de bajo peso molecular

aparecieron primero en el proceso evolutivo que las enzimas, jugando un papel clave en la defensa antioxidante en animales primitivos. En este sentido, el esturión, como los elasmobranchios, puede elevar su contenido de urea en sangre como mecanismo osmorregulador (Martínez-Álvarez et al, 2002) y, además, puede sintetizar vitamina C (Moreau et al., 1999).

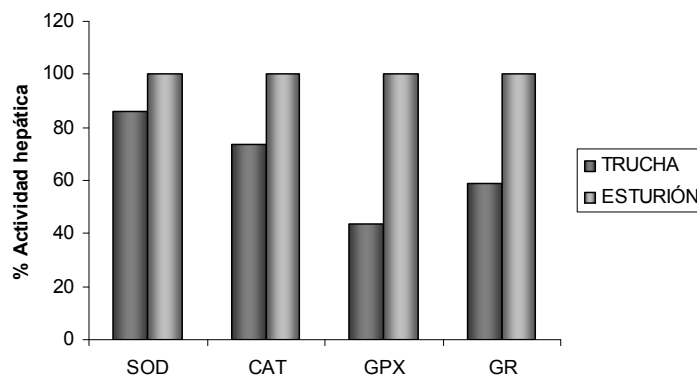


Figura 3. Actividad hepática total en trucha y esturión. Valores para cada enzima expresados como porcentajes en el cual el valor máximo de actividad para una enzima en una especie asume el valor 100%

Las circunstancias anteriormente comentadas podrían ayudar a explicar el que la actividad SOD en la trucha sea superior a la del esturión en los distintos tejidos; pero no ocurre así en el hígado. Ello podría deberse entre otras circunstancias a que el hígado del esturión es el principal lugar de almacenamiento de lípidos, que puede llegar a unos valores de hasta el 80% en materia seca (Sanz et al., 1997). A su vez los lípidos almacenados presentan un gran porcentaje en ácido linolénico, DHA y EPA (García-Gallego et al., 1997). Son, por tanto, ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) con una gran tendencia a la oxidación (Kok et al. 1994; Fang et al. 2003). Es lógico, como se ha comentado antes, que ante un mayor riesgo de generación de ROS en un tejido, exista un mayor nivel de moléculas antioxidantes (Lopez-Torres et al., 1993).

La enzima CAT se encuentra principalmente en peroxisomas, asociadas con elevadas concentraciones de H_2O_2 . Encontramos una mayor actividad en hígado (Figura 1) y eritrocitos (Tabla 1) en ambas especies, en concordancia con otras especies (Matkovic et al., 1977; Wdzieczak et al., 1982; Gabryelak et al., 1983; Wilhelm-Filho et al., 1993).

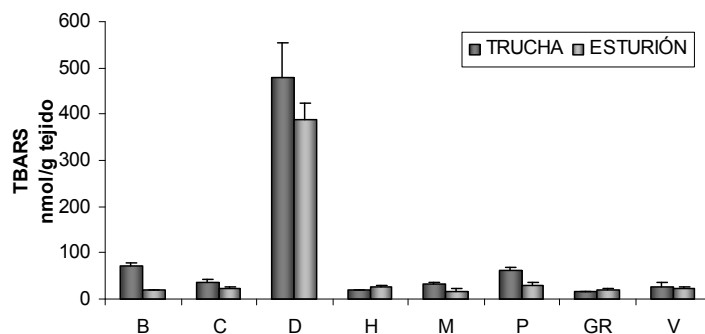


Figura 4. Niveles de TBARS en diferentes tejidos en trucha y esturión. B, branquias; C, corazón; D, digestivo; H, hígado; M, músculo blanco; P, piel; GR, glóbulos rojos; V, vejiga natatoria. Los datos son medias \pm error estándar (n=10). Las diferencias significativas entre especies para el mismo tejido se marcan con asterisco ($P < 0.05$)

Además, también encontramos alta actividad CAT en el digestivo, siendo mínima en músculo, sobre todo en esturión, corazón, piel y vejiga natatoria. En branquias encontramos valores intermedios. Hay que destacar que, si consideramos el conjunto de tejidos, existe una actividad CAT más marcada en el esturión que en la trucha (Tabla 1, Figura 2). En el hígado de ambas especies se encontró una relación positiva entre la SOD y CAT, como ha sido constatado para otros peces (Wilhelm-Filho et al., 1993; Marcon, 1996). En el resto de los tejidos no se encontró esta relación. En glóbulos rojos para ambas especies, bajos valores de actividad SOD se asociaron con una alta actividad CAT. Es posible que la función de la enzima SOD, necesaria para la formación del H_2O_2 , sobre la cual actúa la CAT, sea también realizada por otras enzimas, como la glicolato oxidasa o la urato oxidasa (Nagai et al., 1999)

La GPX cataliza la reducción tanto del peróxido de hidrógeno procedente del metabolismo, como también de los peróxidos de los lípidos. Es considerada como la más eficiente enzima contra la peroxidación lipídica (Winston y Di Giulio, 1991). Su actividad se considera complementaria a la actividad CAT, siendo especialmente efectiva en la detoxificación de hidroperóxidos a bajas concentraciones de sustrato (Pérez-Campo et al., 1993; Halliwell y Gutteridge, 2000). En ambas especies es en el digestivo donde aparecen los mayores niveles y en el hígado, corazón y sangre donde menos, ocupando el músculo, la piel, branquias y vejiga valores intermedios (Tabla 1, Figura 1B). En ambas especies, en tejidos como branquias, digestivo, glóbulos rojos y vejiga natatoria, se encontró que cuando aumenta la actividad CAT, disminuye la

actividad GPX y viceversa. La actividad CAT fue menor en branquias de trucha que en esturión, mientras que la actividad GPX no mostró diferencias significativas entre especies. Lo mismo ocurrió en digestivo y glóbulos rojos, donde las diferencias entre especies fueron significativas (Tabla 1). Por el contrario, en músculo blanco y vejiga natatoria, la actividad CAT fue superior en trucha comparada con el esturión, mientras que la actividad GPX fue menor. A nivel celular, las enzimas se encuentran compartimentadas, estando la catalasa asociada a los peroxisomas, mientras que la GPX actúa en el citoplasma, mitocondrias y retículo endoplásmico. Existen estudios con eritrocitos de mamíferos, en los que la ausencia de orgánulos podría explicar una actividad GPX destinada a hacer frente a niveles bajos de H_2O_2 , mientras que la CAT cobraría importancia en casos de un aumento de H_2O_2 intracelular (Davies, 2000; Halliwell y Gutteridge, 2000). La actividad CAT en el esturión fue más alta que en la trucha, mientras que la actividad GPX fue menor. Además, en el tracto digestivo de la trucha, los niveles de GPX fueron el doble que los de esturión. En la trucha, al contrario que en esturión, la reserva de grasa es perivisceral. Este hecho, está probablemente relacionado con los altos niveles de GPX encontrados en el tracto digestivo de la trucha, protegiendo el tubo digestivo de la peroxidación de esta reserva lipídica.

El papel de la enzima GR es fundamental para la actuación de la enzima GPX, manteniendo la concentración citosólica de glutatión reducido (Tian et al., 1999; Leopold y Loscalzo, 2000), y necesita de NADPH para realizar su función. Los niveles de esta enzima en los distintos tejidos de ambas especies siguen un patrón parecido en cuanto a que es en músculo, seguido por digestivo donde existe mayor actividad, siendo en piel y sangre los valores mínimos, seguido de corazón, vejiga natatoria y branquias. Los valores, excepto para glóbulos rojos son mayores en trucha que en esturión lo que podría indicar que bien el esturión tiene mas glutatión reducido disponible y no necesita tanta inducción de la enzima GR o bien que el estrés oxidativo en la trucha sea mayor y, por consiguiente, mayor la velocidad de formación de glutatión oxidado. En relación a la alta actividad de GR en músculo blanco de ambas especies, y la correlación negativa con la actividad GPX, su alta actividad podría ser explicada parcialmente por la menor disponibilidad de reservas de glutatión reducido en este tejido en ambas especies con respecto al resto de tejidos. La menor actividad GPX encontrada en el músculo blanco de trucha y esturión estaría de acuerdo con estudios realizados en el músculo rojo de mamíferos (Halliwell y Gutteridge, 2000). Además, Nagai et al. (1999) no encontraron

actividad GPX en el músculo blanco de tres especies de peces. Sin embargo, en tracto digestivo, otro tejido con una elevada actividad GR, también presente una alta actividad GPX. Estudios futuros que determinen la disponibilidad de glutatión en los diferentes tejidos en esturión y trucha podrían ayudar a dilucidar estas discrepancias.

Si consideramos la actividad de las diferentes enzimas antioxidantes desde una perspectiva global en los diferentes tejidos estudiados, podemos decir que el hígado es el órgano con mayor potencial enzimático antioxidante en cuanto a la actividad de la SOD y CAT, ambas enzimas parecen tener un papel muy importante para hacer frente, de forma secuenciada, a los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) procedentes de la intensa actividad metabólica propia de este tejido. Además, una mayor actividad antioxidante sería necesaria para evitar la oxidación de la grasa acumulada en el hígado del esturión.

El corazón, otro tejido de crucial importancia y de intensa actividad metabólica, parece que se defiende de los aniones superóxido, fundamentalmente, mediante una fuerte actividad de la SOD y en la reducción de los H_2O_2 participan la GPX, CAT, GR, pero ninguna de forma predominante, como ocurre en el hígado o glóbulos rojos donde la CAT se distingue de forma importante.

En tejido digestivo también encontramos un alto potencial enzimático antioxidante, en este caso hay que distinguir, además de la contribución de SOD, CAT y GR, una GPX más elevada que en el resto de tejidos, fundamentalmente en la trucha. Pese a la actividad enzimática antioxidante, encontramos unos niveles de peroxidación lipídica que se encuentran aumentados sobre el resto de los tejidos de 10-20 veces, sobre todo en trucha (Figura 4). Aunque la GPX es de las principales enzimas encargadas de evitar la peroxidación, de hecho encontramos una correlación positiva entre los niveles de TBARS y GPX ($P < 0.05$), parece no ser suficiente en el tejido digestivo, sobre todo en el de trucha.

La vejiga natatoria también es un tejido que destaca sobre el resto en cuanto a su actividad enzimática antioxidante, con una GPX relativamente elevada y motivando una mínima peroxidación. Estos resultados explicarían la necesidad de protección antioxidante de un tejido que está sometido a altas tensiones de oxígeno. Esto es

especialmente cierto en trucha, un pez fisoclisto, opuesto al esturión, fisóstomo, que llena su vejiga natatoria mediante la ingesta de aire. Esta circunstancia podría explicar por qué la actividad enzimática antioxidante en la vejiga natatoria de la trucha fue mayor que en la del esturión (Tabla 1). Dicha protección antioxidante también ha sido puesta de manifiesto por otros autores, así en *Opsanus tau* la actividad SOD en vejiga fue superior a la de otros tejidos corporales (Halliwell y Gutteridge, 2000).

En el músculo las enzimas antioxidantes no se encuentran demasiado elevadas, destacando una actividad de la GR por encima de los demás tejidos. De cualquier forma, las actividades enzimáticas contribuyen a que los niveles de peroxidación lipídica sean mínimos (Figura 4). Destacando el músculo del esturión, con los menores valores de peroxidación lipídica a pesar de su porcentaje en grasa superior al de la trucha y que puede llegar hasta el 36% (Sanz et al., 1997) y grasa rica en PUFA n3 al igual que el tejido hepático (García Gallego et al., 1997).

En glóbulos rojos se están generando de una manera continua radicales libres de oxígeno debido a su función como transportadores de oxígeno (Saltman, 1989; Nagababu y Rifkind, 2000), y en el caso de peces con glóbulos rojos con núcleo también por la presencia de mitocondrias (Falcioni et al., 1987; Tiano et al., 2000). Los resultados muestran unos bajos niveles de actividad para todas las enzimas antioxidantes, destacando una relativamente alta actividad CAT, indicando que, aparentemente, esta actividad podría ser suficiente para cubrir las necesidades antioxidantes en glóbulos rojos, como se ve reflejado por los bajos niveles de peroxidación lipídica (Figura 4). Por otro lado, la relativamente alta actividad CAT podría indicar que esta enzima juega un papel más importante que la GPX en la reducción del H₂O₂ en glóbulos rojos.

Las branquias y la piel son los tejidos que, globalmente, se pueden considerar con menor actividad enzimática antioxidante de todos los determinados (Tabla 1, Figura 1A y 1B). La peroxidación lipídica en piel y branquias es casi el doble a la del resto de tejidos, excluido el digestivo, sobre todo en trucha (Figura 4). Las branquias parecen ser susceptibles a la oxidación, motivado, en parte, por su actividad fagocítica con fines defensivos (Parihar y Dubey, 1995) y por presentar menores recursos antioxidantes en comparación con otros tejidos como el hígado (Fátima et al, 2000).

Más estudios sobre todo a nivel comparado y en distintas situaciones fisiológicas arrojarán cada vez más luz acerca de la complejidad del funcionamiento del esturión y sus aplicaciones a la optimización de su cultivo.

IV-3.2. EFECTO DEL AYUNO Y LA REALIMENTACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES Y LOS NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN EL ESTURIÓN (*Acipenser naccarii*) y EN LA TRUCHA (*Oncorhynchus mykiss*)

Resumen

La disponibilidad de alimento puede influir sobre las defensas antioxidantes en peces. El ayuno provocó un incremento en los niveles de peroxidación lipídica en hígado y sangre, acompañadas por un descenso en las actividades enzimáticas antioxidantes (CAT, GPX, GR y SOD) en ambas especies. A nivel hepático, la realimentación provocó una recuperación de la actividad SOD en ambas especies, mientras que la actividad CAT sólo se recuperó en la trucha. Por otro lado, en corazón y músculo no se apreciaron signos de daño oxidativo durante el ayuno. En músculo, los niveles de TBARS disminuyeron, coincidiendo con un incremento de la CAT, GPX y GR en ambas especies. El periodo de realimentación en este tejido provocó un aumento de la peroxidación lipídica (TBARS), y las actividades enzimáticas alcanzaron valores semejantes al primer punto de ayuno. En corazón, las actividades CAT y SOD incrementaron durante el ayuno sólo en trucha. En esturión no hubo cambios en las actividades enzimáticas. Tras el periodo de realimentación, sólo la actividad CAT alcanzó los valores iniciales en trucha.

Introducción

El estrés oxidativo es una consecuencia del desequilibrio entre las defensas antioxidantes y los procesos oxidativos. La elevada tasa de generación de especies de oxígeno reactivo (ROS) en situaciones prooxidantes puede provocar daño tisular, afectando a las biomoléculas, lo que en el caso de los lípidos puede cuantificarse por la formación de peróxidos (Halliwell y Gutteridge, 2000). Las principales enzimas antioxidantes son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutathion peroxidasa (GPX) y la glutathion reductasa (GR).

Las defensas antioxidantes en peces son susceptibles de verse afectadas tanto por factores intrínsecos como la edad, la posición filogenética y los hábitos alimentarios del pez, como por factores extrínsecos tales como la presencia de toxinas en el agua, cambios de temperatura y de oxígeno disuelto, así como por patologías o parásitos (Felton, 1995; Martínez-Álvarez et al., 2005).

Los peces pueden experimentar periodos de ayuno durante su ciclo natural y también en la dinámica de funcionamiento en condiciones de cultivo. La no disponibilidad de alimento puede afectar a las defensas antioxidantes, aunque, a diferencia de mamíferos, no existen muchos estudios sobre las consecuencias del ayuno sobre los mecanismos antioxidantes en peces. En mamíferos, el ayuno conduce a un agotamiento de las reservas de moléculas antioxidantes y a un incremento en la generación de ROS, particularmente en el hígado (Godin, 1988; Domenicalli, 2000).

En peces, los estudios realizados son unánimes en cuanto a que el ayuno provoca un aumento de la peroxidación lipídica (Hidalgo et al., 2002; Pascual et al., 2002; Morales et al., 2004). Sin embargo, con respecto a la actividad de las enzimas antioxidantes, hay disparidad de resultados en los diferentes estudios y también dependiendo del tejido donde se determinen. Así, en truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) sometidas a un periodo de ayuno de tres semanas, se observó un descenso aproximado del 35% en la actividad glutatión reductasa hepática, manteniéndose esta disminución tras siete semanas de restricción alimentaria (Blom et al., 2000). Estudios realizados con bacalao del Atlántico (*Gadus morua*), mostraron un incremento en la actividad de algunas enzimas antioxidantes en hígado, mientras que en músculo estas mismas enzimas no sufrieron variaciones tras un periodo de ayuno de 12 semanas. (Guderley et al., 2003). Pascual et al. (2003) determinaron parámetros de estrés oxidativo en hígado de doradas (*Sparus aurata*) sometidas a un periodo de restricción de alimento y de ayuno. Los autores observaron un incremento a la tercera semana en los niveles de glutatión oxidado y de peroxidación lipídica en ambas condiciones. La actividad CAT disminuyó durante el periodo de ayuno, mientras que las actividades SOD, GR y GPX incrementaron con la restricción alimenticia. Así mismo, fueron detectadas nuevas isoformas de la enzima SOD en ayuno y en condiciones de restricción alimentaria.

En dentones (*Dentex dentex*), sometidos a un periodo de 5 semanas de ayuno se observó un incremento de las enzimas SOD, CAT y GPX hepáticas, mientras que se registró un decremento en la actividad GR. No se detectó ningún cambio cualitativo en el patrón isoenzimático de la SOD (Morales et al., 2004).

El esturión (*Acipenser naccarii*) es una especie cuyo cultivo se está extendiendo por algunos países europeos como Italia y España. Esta especie migra estacionalmente desde los ríos Po, Ticino y Adigge al mar Adriático (Clementi et al., 1999). Estudios recientes han puesto de manifiesto que la distribución histórica de esta especie abarcaba también algunos ríos españoles (Garrido-Ramos et al., 1997; Hernando et al., 1999; De la Herrán et al., 2004).

El objetivo principal de este trabajo es determinar cómo se ven afectadas las actividades de enzimas antioxidantes en diferentes tejidos del esturión *A. naccarii* y de la trucha *O. mykiss* en situación de ayuno y posterior realimentación, así como determinar los posibles daños oxidativos derivados de dicha situación mediante la determinación de los niveles de peroxidación lipídica. El estudio comparado en ambas especies ayudará a conocer mejor la fisiología de las mismas y en especial la de esta nueva especie introducida en la acuicultura.

Material y métodos

Animales de experimentación

Como animales de experimentación 30 esturiones de la especie *Acipenser naccarii* de edad 1+ y 552.12 ± 22.03 g de peso medio y 30 truchas de la especie *Oncorhynchus mykiss* de edad 1+ y 299.74 ± 26.67 g de peso medio. Ambas especies procedían de la piscifactoría Sierra Nevada S.L. (Riofrío, Granada). Las condiciones de mantenimiento y alimentación fueron propias del régimen de piscifactoría. Ambos animales, en el periodo de realimentación, se alimentaron con la misma dieta artificial (Le Gouessant, Francia), con una composición química aproximada de 48% de proteína, 14% de lípidos, 11,4% de cenizas y 15% de carbohidratos.

Los animales se mantuvieron en ayuno durante un periodo total de 72 días. Se tomaron muestras para su posterior análisis a los 5, 10, 40 y 72 días de ayuno. Tras el periodo de ayuno los animales fueron realimentados durante un periodo total de 2 meses, muestreando animales a los 10 y 60 días de realimentación.

Toma de muestras

Previo sacrificio de los animales se tomaron muestras de sangre de la vena caudal usando jeringas heparinizadas. Las muestras se mantuvieron en hielo hasta su centrifugación. Posteriormente se extrajo el hígado, el corazón y una porción de músculo blanco de la región dorsal. Las muestras fueron introducidas rápidamente en nitrógeno líquido. La conservación se realizó a -80°C hasta posterior tratamiento y análisis.

Tratamiento de las muestras

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 650 g durante 10 minutos para separar los glóbulos rojos del plasma, el sobrenadante de la hemolisis de los glóbulos rojos se obtuvo de acuerdo con el método de Marcon y Filho (1999). El método consiste en lavar brevemente los glóbulos rojos con solución salina al 9 ‰ en proporción 1:3 (v/v), la mezcla fue centrifugada a 650 g durante 5 minutos y se extrajo el sobrenadante. Este procedimiento se repitió dos veces. Posteriormente a los glóbulos rojos se les adicionó una solución tampón (Tris-HCl 20 mM pH 7.8, glicerol 10 % (v/v) y triton X-100 0.1 % (v/v)) en reafición 1:9 (v/v) y se congeló durante 12 horas a -20°C para la lisis celular. Tras este periodo de tiempo, las células se centrifugaron 10 minutos a 5000 g y 4°C . Es sobrenadante fue congelado a -80°C hasta su análisis.

Las muestras de tejidos tomadas de todos los animales fueron homogeneizadas. Para ello se usó un tampón Tris-HCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, tritón X-100 0.1 %, pH 7.8 en una proporción 1 g de tejido en 9 ml de tampón.

Los homogeneizados fueron sometidos a una centrifugación de 30000 g durante 30 minutos a 4°C en una centrifuga “Kontron” mod. Centrikon H-401. Tras la

centrifugación se recogió el sobrenadante que fue congelado a -80°C hasta su posterior análisis.

Métodos analíticos

Todas las determinaciones enzimáticas se llevaron a cabo a $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ usando un espectrofotómetro microplaca PowerWave_x. Las reacciones enzimáticas se iniciaron con la adición del extracto de tejido, excepto para la SOD donde se usó la xantina oxidasa.

La actividad catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) se determinó midiendo la disminución de la concentración de H_2O_2 a 240 nm siguiendo el método de Aebi (1984). La mezcla de reacción contenía tampón fosfato potásico 50 mM pH 7 y solución extemporánea de H_2O_2 10.6 mM.

La actividad superóxido dismutasa (SOD; EC.1.15.1.1) se determinó espectrofotométricamente usando el método de reducción del ferricitocromo c por radicales libres superóxido generados por el sistema xantina/xantina oxidasa. La mezcla de reacción consistió en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8, EDTA 0.1 mM, citocromo c 0.013 mM y xantina oxidasa 0.024 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir una inhibición del 50% de la reducción del ferricitocromo c medido a 550 nm (McCord y Fridovich, 1969).

La actividad glutatión peroxidasa (GPX; EC 1.11.1.9) fue determinada usando el método de Flohé y Günzler (1984). Para evitar la interferencia de la hemoglobina las muestras de sangre fueron tratadas con KCN (reactivo Drabking; Sigma Chemical Co.). La mezcla de reacción contenía tampón fosfato potásico 50 mM pH 7, ECTA 0,5 mM, azida sódica 1 mM, NADPH 0.15 mM, H_2O_2 0.15 mM. A todo lo anterior se le añadió una solución recientemente preparada de glutatión reductasa 2.4 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ en tampón fosfato potásico pH 7 0.1 M. Tras la adición de glutatión reducido 1 mM se midió el consumo de NADPH a 340 nm.

La determinación de la actividad glutatión reductasa (GR; EC.1.6.4.2) se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Calberg y Mannervik (1975), con algunas

modificaciones, basado en la medida de la oxidación del NADPH a 340 nm. La mezcla de reacción contenía tampón fosfato sódico 0.1 M a pH 7.5, EDTA 1 mM, NADPH 0.63 mM y glutathion oxidado 0.15 mM.

Una unidad de actividad enzimática CAT, GPX y GR se definió como la cantidad de enzima requerida para transformar 1 μ mol de sustrato por minuto bajo las condiciones del ensayo.

Los niveles de peroxidación lipídica fueron determinados cuantificando la concentración de sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) expresados como nmol·g tejido⁻¹ siguiendo el método descrito por Buege y Aust (1978).

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como medias \pm error estándar. Los datos se analizaron por el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) usando el paquete estadístico SPSS 13.0 para Windows. Las diferencias significativas dentro de la misma especie en los distintos puntos de muestreo ($P < 0.05$) se determinó por el test de Duncan (Duncan, 1955).

Resultados

La situación de ayuno provocó un aumento de los niveles de peroxidación lipídica en hígado y sangre de ambas especies (Tabla 1), aunque sólo de manera significativa en sangre, a los 40 días en el esturión y a los 72 días en trucha. Estas variaciones estuvieron acompañadas por una disminución en las actividades enzimáticas CAT, SOD, GPX y GR (Figura 1 y 2).

En hígado, las actividades CAT y GPX disminuyeron significativamente en ambas especies a los 10 días de ayuno. En el esturión, las actividades SOD y GR disminuyen significativamente a los 40 días, mientras que la disminución de las actividades de estas enzimas en trucha no es estadísticamente significativa. La disminución es estadísticamente significativa y muy temprana (10 días de ayuno) para la actividad de la SOD en ambas especies y para la actividad de la CAT sólo en esturión. Para el resto

de las enzimas la tendencia al decremento durante el ayuno no es estadísticamente significativa.

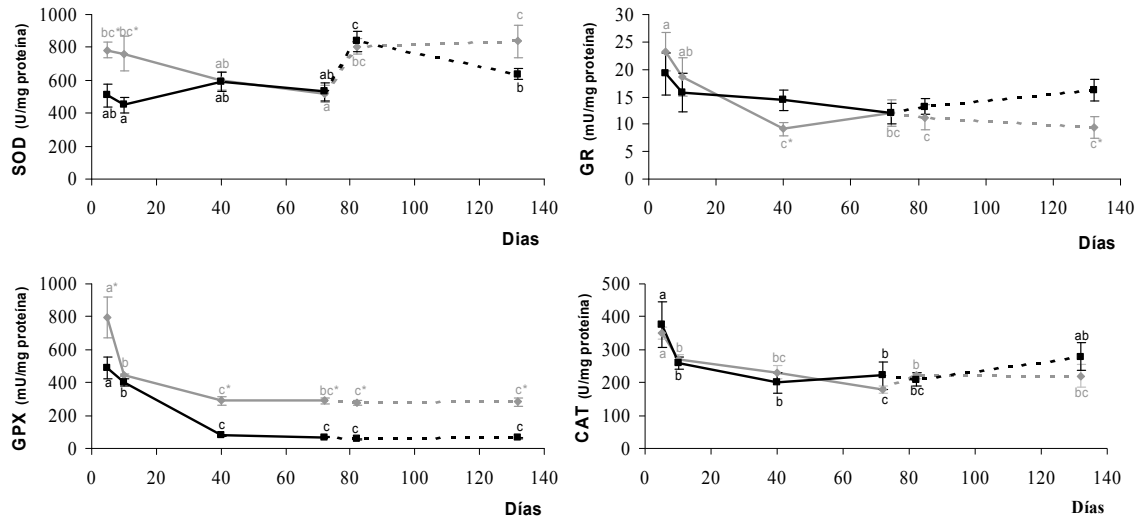


Figura 1. Evolución de la actividad catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPX) y superóxido dismutasa (SOD) en hígado durante el ayuno (línea continua) y la realimentación (línea discontinua) en el esturión *A. naccarii* (línea gris) y la trucha *O. mykiss* (línea negra). Diferencias significativas dentro de cada especie entre los distintos días de experimento se indican con letras diferentes. El asterisco indica diferencias significativas entre especies en un mismo punto de muestreo ($P < 0.05$).

En el hígado y la sangre de las dos especies estudiadas, los niveles de peroxidación lipídica permanecieron altos tras dos meses de realimentación. A nivel hepático sólo existe recuperación en ambas especies de la actividad SOD tras 10 días de realimentación y de la actividad CAT en trucha, al final del periodo de realimentación (Figura 1). En la sangre (Figura 2), solo existe una tendencia a la recuperación en la actividad GPX y GR en ambas especies.

Por otro lado, en corazón y músculo no se apreciaron daños oxidativos durante el ayuno, llegando incluso a disminuir los niveles de peroxidación lipídica de forma significativa a nivel muscular. En este tejido, la realimentación provocó un incremento de los niveles de TBARS, mientras que el corazón no sufrió cambios en su estado oxidativo (Tabla 1)

Tabla 1. Niveles de TBARS en diferentes tejidos de *A. naccarii* y *O. mykiss* durante el periodo de ayuno (A) y realimentación (R).

Días	Corazón		Hígado		Músculo blanco		Glóbulos rojos	
	Esturión	Trucha	Esturión	Trucha	Esturión	Trucha	Esturión	Trucha
5A	19.24 ± 1.58*	27.72 ± 2.44	42.20 ± 4.91 ^{abc}	51.95 ± 4.70	27.96 ± 3.72 ^{a*}	75.55 ± 10.20 ^d	9.80 ± 0.00 ^a	11.77 ± 1.53 ^a
10A	21.64 ± 4.05	20.08 ± 2.31	36.02 ± 5.20 ^{ab}	44.61 ± 7.02	20.32 ± 2.81 ^{a*}	37.51 ± 3.47 ^b	15.37 ± 0.00 ^{ab}	12.79 ± 1.25 ^a
40A	25.13 ± 2.76	23.93 ± 3.08	32.53 ± 2.63 ^{a*}	54.21 ± 3.25	24.66 ± 4.19 ^a	18.83 ± 3.71 ^a	20.28 ± 3.18 ^{bc*}	12.83 ± 0.85 ^a
72A	24.87 ± 3.12	18.03 ± 2.51	45.21 ± 4.65 ^{abc}	54.20 ± 9.92	24.71 ± 4.36 ^a	27.94 ± 2.01 ^{ab}	20.82 ± 2.53 ^{bc}	17.12 ± 1.28 ^b
10R	19.47 ± 2.37	21.59 ± 2.76	53.57 ± 5.80 ^{bc}	50.97 ± 8.08	69.35 ± 7.75 ^b	58.62 ± 6.69 ^c	25.83 ± 3.23 ^{cd*}	13.45 ± 0.81 ^a
60R	20.54 ± 1.91	16.79 ± 3.40	48.54 ± 5.72 ^c	43.70 ± 5.26	79.58 ± 9.66 ^b	116.72 ± 6.85 ^e	34.00 ± 1.21 ^{d*}	15.13 ± 1.48 ^{ab}

Los valores son media ± error estándar. (n=5; número de peces por punto de muestreo) y se expresaron como mmol g tejido⁻¹.

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre puntos de muestreo para cada especie.

Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre especies en cada punto de muestreo.

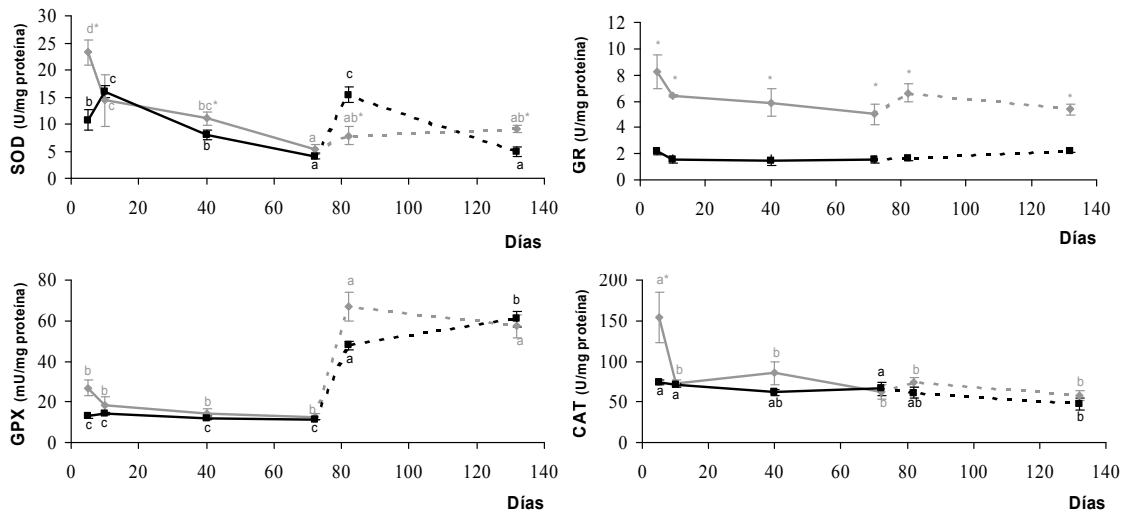


Figura 2. Evolución de la actividad catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPX) y superóxido dismutasa (SOD) en hemolisado durante el ayuno (línea continua) y la realimentación (línea discontinua) en el esturión *A. naccarii* (línea gris) y la trucha *O. mykiss* (línea negra). Diferencias significativas dentro de cada especie entre los distintos días de experimento se indican con letras diferentes. El asterisco indica diferencias significativas entre especies en un mismo punto de muestreo ($P < 0.05$).

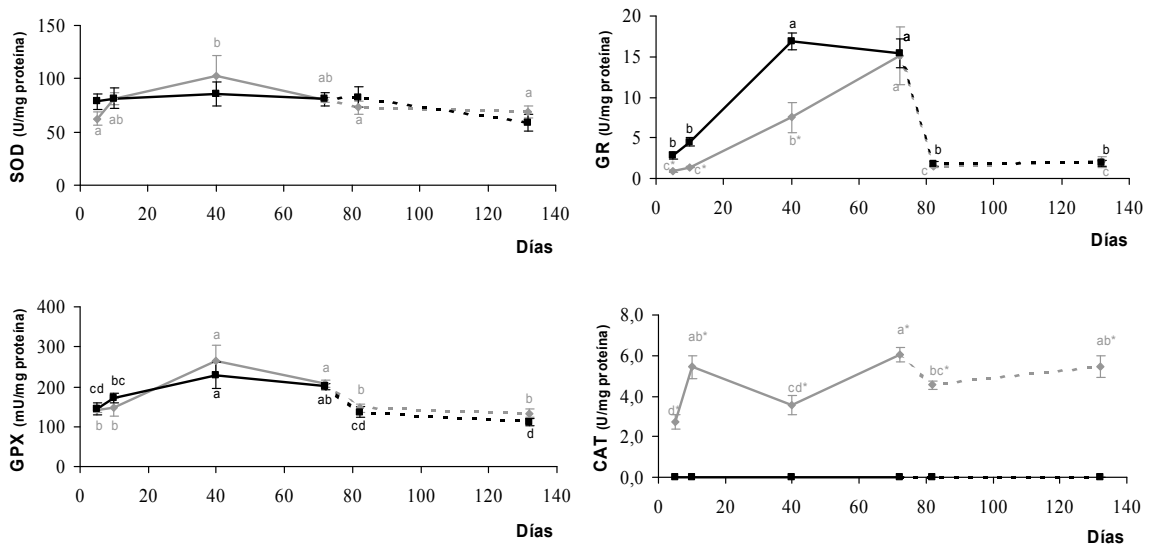


Figura 3. Evolución de la actividad catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPX) y superóxido dismutasa (SOD) en músculo blanco durante el ayuno (línea continua) y la realimentación (línea discontinua) en el esturión *A. naccarii* (línea gris) y la trucha *O. mykiss* (línea negra). Diferencias significativas dentro de cada especie entre los distintos días de experimento se indican con letras diferentes. El asterisco indica diferencias significativas entre especies en un mismo punto de muestreo ($P < 0.05$).

A nivel muscular (Figura 3), el descenso en los niveles de peroxidación con el ayuno coincide con un incremento de las actividades CAT, GPX y GR, mientras que la actividad SOD no sufrió cambios. Tras 10 días de realimentación, dichas actividades alcanzaron los valores del primer punto de ayuno.

En corazón, fueron las actividades CAT y SOD las que incrementaron en condiciones de ayuno, pero sólo en la trucha. En el esturión, no hubo cambios significativos en la actividad de las diferentes enzimas antioxidantes determinadas. Tras la realimentación, los niveles de SOD permanecieron elevados en la trucha, mientras que la actividad CAT volvió a los valores iniciales (Figura 4).

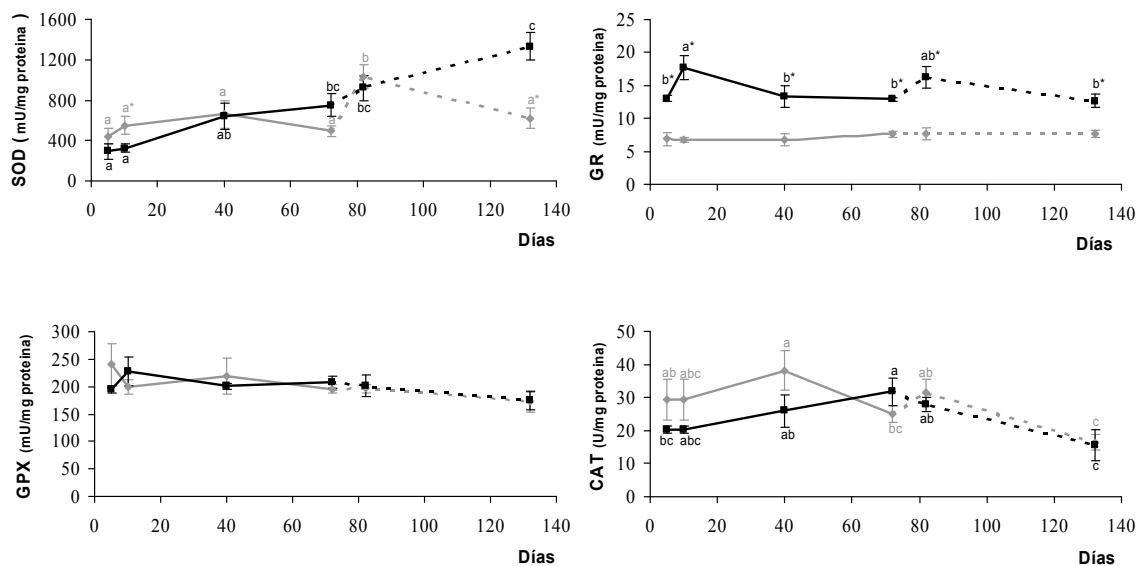


Figura 4. Evolución de la actividad catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPX) y superóxido dismutasa (SOD) en corazón durante el ayuno (línea continua) y la realimentación (línea discontinua) en el esturión *A. naccarii* (línea gris) y la trucha *O. mykiss* (línea negra). Diferencias significativas dentro de cada especie entre los distintos días de experimento se indican con letras diferentes. El asterisco indica diferencias significativas entre especies en un mismo punto de muestreo ($P < 0.05$).

El contenido de lípidos del músculo blanco (como porcentaje en sustancia seca, se expresan en la Figura 5, apreciándose una disminución significativa a los 40 días en el esturión y a los 72 días en la trucha. Trás la realimentación, los lípidos en músculo aumentaron de forma significativa en el esturión.

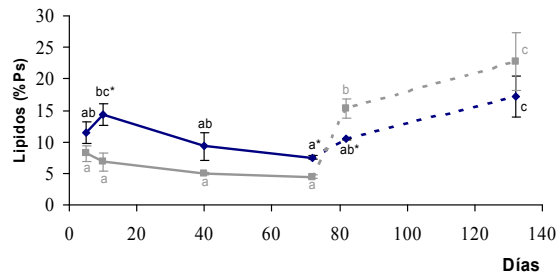


Figura 5. Contenido lipídico (% Peso seco) durante el ayuno (línea continua) y la realimentación (línea discontinua) en el esturión *A. naccarii* (línea gris) y la trucha *O. mykiss* (línea negra). Diferencias significativas dentro de cada especie entre los distintos días de experimento se indican con letras diferentes. El asterisco indica diferencias significativas entre especies en un mismo punto de muestreo ($P < 0.05$).

Discusión

Los resultados obtenidos al determinar la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPX y GR en hígado, sangre, músculo blanco y corazón, de la trucha y del esturión al comienzo del ayuno, corroboran lo ya puesto de manifiesto en un trabajo anterior (Trenzado et al., 2006), donde en general, se constata una mayor actividad de las enzimas antioxidantes en el hígado de esturión con respecto al de la trucha., potencial antioxidante necesario, al menos, para salvaguardar de la peroxidación lipídica el alto contenido de grasa en el tejido hepático. En el resto de los tejidos, la actividad de dichas enzimas, excepto para la actividad CAT, era superior en la trucha. A lo largo del ayuno estas diferencias desaparecen, siendo el comportamiento en ambas especies muy parecido en los parámetros determinados en hígado, sangre y músculo.

En primer lugar, ante un ayuno de 72 días, los niveles de peroxidación lipídica en el tejido hepático y en la sangre incrementaron en ambas especies, siendo significativo sólo en sangre a partir del día 40. Nuestros resultados están de acuerdo con los existentes en bibliografía. Así, en mamíferos se ha demostrado que la inanición produce un incremento en la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS), en sangre y en hígado, dando lugar a proteínas carboniladas (Domenicali et al., 2001) y, fundamentalmente, peroxidación lipídica (Domenicalli et al., 2001; Godin y Wohaiieb, 1988). En peces, la generación de estrés oxidativo, determinada como incremento en los niveles de peroxidación lipídica, ante condiciones de limitación alimentaria también ha sido constatada por otros autores en hígado de trucha arco iris (*O. mykiss*) (Hidalgo et

al., 2003), doradas (*Spaurus aurata*) (Pascual et al., 2003) y dentones (*Dentex dentex*) (Morales et al., 2004).

Por lo que respecta a la actividad de las enzimas antioxidantes en hígado y sangre, se produjo un descenso temprano (a los 10 días en algunas de ellas) (Figura 2 y 4) durante el periodo de ayuno en ambas especies. Posiblemente, este descenso, que estaría motivado por la restricción de sustratos de síntesis enzimática, sea el responsable del incremento en los niveles de peroxidación lipídica encontrados. Nuestros resultados estarían de acuerdo con lo expuesto para mamíferos (Godiwohaieb, 1988). En peces, los datos existentes en bibliografía son controvertidos. Se ha descrito un decremento en la actividad GR hepática bajo condiciones de ayuno en estudios realizados con truchas arcoiris (Blom et al., 2000) y con dentones (Morales et al., 2004). Pascual et al. (2003) en doradas sometidas a restricción alimentaria, observaron un aumento en los niveles de SOD y GR, mientras que las actividades CAT y GPX mostraron un descenso bajo estas condiciones. Morales et al. (2004) encontraron un incremento en las actividades GPX, CAT y SOD en condiciones de ayuno. Guderley et al. (2003), en experimentos realizados con bacalao del Atlántico ayunados, determinaron un incremento en la actividad CAT y un descenso en la actividad GPX.

El hígado de vertebrados exhibe un alto metabolismo y consumo de oxígeno y es, probablemente, el que mejor refleja el estatus de defensas antioxidantes en los organismos (Cahnce et al., 1979; Davies, 1991; Wilhelm-Filho et al., 1993). Las enzimas SOD, CAT, GPX y GR constituyen el principal mecanismo enzimático de defensa antioxidante. El aumento de los niveles de peroxidación lipídica junto con un descenso en la actividad de las principales enzimas antioxidantes parece indicar la incapacidad hepática de hacer frente a la situación de ayuno de 72 días, conduciendo, en última instancia a la oxidación de las biomoléculas.

El estrés oxidativo que aparece en hígado y sangre en respuesta al ayuno no desaparece tras un periodo de 60 días de realimentación, existiendo recuperación sólo de la actividad SOD en hígado en ambas especies y de la actividad CAT sólo en hígado de la trucha; mientras que en sangre la recuperación fue observada para las actividades GPX y GR.

En contraposición a los anteriores tejidos, en músculo blanco y en corazón los niveles de peroxidación lipídica indican que estos tejidos no experimentaron estrés oxidativo durante el periodo de ayuno de 72 días. Posiblemente este hecho sea debido, en parte, al incremento experimentado en la mayoría de las actividades de las enzimas antioxidantes. Este diferente comportamiento ante el ayuno, dependiendo del tejido considerado, ya ha sido puesto de manifiesto por otros autores en estudios realizados en mamíferos (Laemmi-Keefe, 1980).

Concretamente en músculo blanco, fueron las actividades CAT, GPX y GR las que se vieron incrementadas para evitar el posible daño oxidativo derivado de la situación de ayuno. El mantenimiento de la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y GPX en músculo blanco durante el ayuno ya fue constatado por Guderley et al. (2003) en el bacalao del Atlántico. Nuestros resultados estarían de acuerdo con lo expuesto por estos autores acerca de que al ser el músculo blanco un tejido de reserva energética, la movilización de dichas reservas durante el ayuno es un hecho frecuente. Así, el estado de ayuno supone una movilización de las reservas energéticas a nivel muscular y, ante esta posibilidad, dicho tejido conserva e incluso incrementa su capacidad para hacer frente a esa situación prooxidante.

A nivel del tejido cardíaco, los parámetros que determinan estrés oxidativo no sufren cambios en el corazón del esturión y en el de la trucha solo un incremento de las actividades CAT y SOD. Posiblemente la mayor actividad metabólica del tejido cardíaco de la trucha, constatada en estudios sobre el metabolismo intermediario (Capítulo VI-2.1 de la presente tesis) podría explicar estas diferencias en ambas especies. De cualquier forma, parece ser que el corazón, al ser un órgano de crucial importancia para la vida, es insensible ante ciertas perturbaciones en el medio interno y que de alguna forma está protegido ante distintas circunstancias estresantes, entre las que se incluiría el ayuno. La facultad del corazón para la utilización de los cuerpos cetónicos como fuente de energía durante el ayuno (Carvajal y Moreno-Sánchez, 2003), podría explicar en parte este hecho. Resultados parecidos encontramos previamente en un estudio que realizamos para ver la respuestas de las defensas antioxidantes ante un estrés osmótico producido durante la aclimatación del esturión *A. naccarii* al agua salada (Martínez Álvarez et al., 2003). Donde se comprobó un aumento de las enzimas

antioxidantes en el tejido hepático y sobre todo en sangre, mientras que en el tejido cardiaco los parámetros de estrés oxidativo no variaban durante el proceso.

En el músculo la realimentación paradójicamente mostró un descenso de defensas antioxidantes con respecto al ayuno y un incremento de los niveles de peroxidación lipídica. Una explicación para este hecho podría estar en que durante el ayuno la peroxidación lipídica se mantiene baja, no solo por el incremento de las defensas antioxidantes sino también porque el contenido de grasa en el músculo disminuye. Ante una nueva entrada de energía, como consecuencia de la realimentación, la avidez por ser almacenada aumenta como una respuesta metabólica compensatoria al periodo de ayuno (Heide et al., 2006). Esta circunstancia viene confirmada cuando expresamos la evolución del contenido de lípidos en el músculo durante el ayuno y la realimentación (Figura 5). El contenido de grasa muscular en el esturión en el periodo de realimentación es muy superior al existente al comienzo del ayuno. Este mayor contenido en lípidos motivaría que los resultados obtenidos al determinar la peroxidación lipídica muestren valores por encima a los existentes al final del ayuno donde el contenido de lípidos es mínimo y, de hecho, en este periodo el nivel de peroxidación lipídica es inferior a las condiciones de partida.

Por otra parte, la realimentación provoca que el corazón de la trucha que ha sufrido ligeros cambios durante el ayuno, vuelva a los valores normales en todas las actividades excepto para la actividad SOD. El corazón del esturión continúa manifestando los parámetros de estrés oxidativo estudiados dentro de unos valores normales.

En resumen, encontramos que el ayuno de 72 días origina un estado de estrés oxidativo en el tejido hepático y en la sangre y que tras 60 días de realimentación no hay una recuperación de dicho estado, ni en la trucha (*O. mykiss*) ni en el esturión (*A. naccarii*). El tejido cardiaco no sufre estrés oxidativo ante el ayuno, especialmente en el esturión. La respuesta del músculo blanco es más compleja en cuanto a que aumenta el grado de peroxidación lipídica, no durante el ayuno sino tras la realimentación quizás motivado por un aumento “apresurado” o repentino de las reservas lipídicas. Por ello sería aconsejable que cuando el funcionamiento del cultivo requiera someter a los animales a un periodo de ayuno, la reintroducción del alimento se realice de forma gradual.

Por último nuestros estudios confirman que los diferentes tejidos difieren en su respuesta al estrés oxidativo, incluso cuando esta condición haya sido inducida por la misma circunstancia.

La profundización y ampliación de estudios de este tipo, considerando los diferentes factores que interactúan sobre los animales en cultivo, contribuirán no solo a un mejor conocimiento de la fisiología de los peces, sino también a una optimización del mismo.

IV-3.3. CONCLUSIONES.

Los estudios sobre las defensas antioxidantes en el esturión *Acipenser naccarii* y en la trucha *Oncorhynchus mykiss*, muestran que:

1.- En ambas especies, las actividades de las enzimas antioxidantes varían dependiendo de la enzima y del tejido. Es el hígado el que presenta mayor actividad antioxidante en general, mientras que las branquias y la piel son los tejidos que, globalmente, se pueden considerar con menor actividad enzimática antioxidante de todos los determinados. La capacidad antioxidante se encuentra relacionada de forma inversa con los niveles de peroxidación lipídica en todos los tejidos excepto en el tracto digestivo.

2.- A pesar del elevado contenido lipídico del músculo y, especialmente, del hígado del esturión, los niveles de peroxidación lipídica se mantienen muy bajos gracias a la elevada capacidad antioxidante de estos tejidos. Este hecho confiere tanto a músculo como a hígado de esturión unas óptimas calidades nutritivas desde el punto de vista del consumo humano.

3.- En el tracto digestivo, a pesar de poseer una relativamente alta capacidad antioxidante, los niveles de peroxidación lipídica se encuentran aumentados respecto al resto de los tejidos. Esto sucede especialmente en la trucha, cuya principal reserva lipídica se acumula a nivel perivisceral.

4.- Las condiciones de ayuno de 72 días de duración provocan un estado de estrés oxidativo en sangre e hígado de ambos animales, debido a una disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes que da lugar a un aumento de la peroxidación lipídica. Esta situación ocasionada por el ayuno permanece a los 10 días después de la realimentación, desapareciendo a los 60 días, excepto en la sangre del esturión donde los niveles de peroxidación lipídica permanecieron aumentados.

5.- La respuesta ante el ayuno del músculo blanco es contraria a la del hígado y sangre. Este tejido no experimenta estrés oxidativo durante el ayuno, pero sí con la

reintroducción del alimento, de tal forma que a los 60 días de realimentación la peroxidación lipídica en el tejido muscular presenta valores incrementados.

6.- Las condiciones de ayuno no repercuten en el estado oxidativo del tejido cardiaco.

V. CONCLUSIONES

El esturión *A. naccarii* con 1 año de edad:

- 1.- Puede ser considerado como un pez con hábitos alimentarios cercanos a la omnivoría, puesto que se revela con una mayor capacidad de utilización digestiva y metabólica de los hidratos de carbono que un pez carnívoro estricto.
- 2.- Su comportamiento motor lento queda reflejado en una baja actividad de las enzimas del metabolismo intermediario y de las enzimas antioxidantes extrahepáticas.
- 3.- Posee la misma capacidad de síntesis de glucosa tanto a nivel hepático como muscular.
- 4.- Presenta una elevada capacidad de síntesis de cuerpos cetónicos a nivel hepático, que serán utilizados con fines energéticos en otros órganos, supliendo en parte la relativamente baja cantidad de lípidos plasmáticos de procedencia hepática. No obstante, también se ha constatado en el esturión la capacidad de oxidar ácidos grasos en tejidos extrahepáticos.
- 5.- A pesar del elevado contenido lipídico del músculo y, especialmente, del hígado de esturión, los niveles de peroxidación lipídica se mantienen muy bajos gracias a la elevada capacidad antioxidante de estos tejidos. Este hecho confiere tanto a músculo como a hígado de esturión unas óptimas calidades nutritivas desde el punto de vista del consumo humano.
- 6.- El ayuno prolongado provoca en el esturion una alteración en la maquinaria digestiva afectando en mayor medida a la utilización de hidratos de carbono.
- 7.- La respuesta metabólica del esturión ante una situación de ayuno prolongado es, en general, similar a la observada en teleósteos, aunque la gran cantidad de lípidos almacenados en el hígado del esturión parecen asumir un importante papel como combustible para esta especie.

8.- La no disponibilidad de alimento provoca una situación de estrés oxidativo en el hígado y la sangre, a diferencia de lo ocurrido en músculo blanco y en corazón, donde el ayuno no produce elevación de los niveles de peroxidación lipídica. Tras dos meses de realimentación, el estrés oxidativo se mantiene en sangre y, aparece en músculo blanco.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H., 1984. Catalase "in vitro". *Methods Enzymol.* 105, 121-127.
- Agradi, E., Abrami, G., Serrini, G., McKenzie, D., Bolis, C., Bronzi, P., 1993. The role of dietary n-3 fatty acid and vitamin E supplements in growth of sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Comp. Biochem. Physiol.* 105A, 187-195.
- Alliot, E., Febvre, A., Metailler, R., 1974. Les proteases digestives chez un téléostéen carnivore, *Dicentrarchus labrax*. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys* 14, 229-237.
- Arnason, U., Gullberg, A., Janke, A., 2001. Molecular phylogenetics of gnathostomous (jawed) fishes: old bones, new cartilage. *Zoologica Scripta* 30, 249-255.
- Artiyukin, E.N., 1988. The nature and origin of summer spawning in sturgeons. *J. Ichthyol.* 5, 116-123.
- Avcı, A., Kaçmaz, M., Durak, I., 2005. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 101-105.
- Ballantyne, J.S., 1997. Jaws, the inside story. The metabolism of elasmobranch fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 118B, 703-742.
- Beaulieu, M.A. Guderley, H., 1998. Changes in qualitative composition of white muscle with nutritional status of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Comp. Biochem. Physiol.* 121A, 135-141.
- Beckman, K.B., Ames, B.N., 1998. The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiol. Rew.* 75, 547-581.
- Bélangier, F., Blier, P.U., Dutil, J.-D., 2002. Digestive capacity compensatory growth in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish Physiol. Biochem.* 26, 121-128.
- Bemis, W. E., Findeis, E.K., Grande, L., 1997. An overview of Acipenseriformes. *Env. Biol. Fish.* 48, 25-71.
- Benton, M., 2004. *Vertebrate Palaeontology* (3ª Edición). University of Bristol.
- Bergot, F., Breque, J., 1983. Digestibility of starch by rainbow trout: effects of the physical state of starch and the intake level. *Aquaculture* 34, 203-212.
- Bier, M., 1955. Lipases. *Methods in enzymology* 1, 627-642.
- Black, D., 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.
- Blasco, J., Fernández, J., Gutiérrez, J., 1992. Variations in tissue reserves, plasma metabolites and pancreatic hormones during fasting an immature carp (*Cyprinus Carpio*). *Comp. Biochem. Physiol.* 103A, 357-363.
- Blom, S., Andersson, T.B., Förlin, L., 2000. Effects of food deprivation and handling stress on head kidney 17 α -hydroxyprogesterone 21-hydroxylase activity, plasma cortisol and the activities of liver detoxification enzymes in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 48, 265-274.

- Böhm, R., Hanke, W., Segner, H., 1994. The sequential restoration of plasma metabolite levels, liver composition and liver structure in refed carp, *Cyprinus carpio*. J. Comp. Physiol. 164B, 32-41.
- Bond, C.E., 1996. Nervous and endocrine systems. En: Biology of fishes. Bond, C.E. (Ed), Saunders College Publishing, FortWorth, pp 241-258.
- Borevis, A., Chance, B., 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem. J. 134, 707-716.
- Borlongan, J.G., 1990. Studies on the digestive lipases of milkfish, *Chanos Chanos*. Aquaculture 89, 315-325.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal. Biochem. 72, 248.
- Brauge, C., Medale, F., Corraze, G., 1994. Effect of dietary carbohydrate levels on growth, body composition and glycemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in seawater. Aquaculture 123, 109-120.
- Bronzi, P., Vecsei, P., Arlati, G., 2005. Threatened fishes of the world: *Acipenser naccarii* Bonaparte, 1836 (Acipenseridae). Environ. Biol. Fish. 72, 66.
- Bruno, A., Maugeri, S., 1995. Peces de agua dulce de Europa. Ediciones omega, Barcelona.
- Buccolo, G., David, H., 1973. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. Clin. Chem. 19, 476-482.
- Buddington, R.K., Doroshov, S.L., 1986. Development of digestive secretions in white sturgeon juveniles (*Acipenser transmontanus*). Comp. Biochem. Physiol. 83A, 233-238.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 52, 302-310.
- Burel, C., Boujard, T., Tulli, F., Kaushik, S.J., 2000. Digestibility of extruded peas, extruded lupin, and rapessed meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*). Aquaculture 112A, 167-177.
- Cadenas, E., 1995. Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. En: Oxidative stress and antioxidant defenses in biology. Ahmad, S. Chapman & Hall (Eds). New York, pp. 1-46.
- Calberg, L., Mannervik, B., 1975. Purification and characterization of the flavo enzyme glutathione reductase from rat liver. J. Biol. Chem. 250, 5475-5480.
- Camougrand, N., Rigoulet, M., 2001. Aging and oxidative stress: studies of some genes involved both in aging and in response to oxidative stress. Respir. Physiol. 15, 393-401.
- Carmona, R., García Gallego, M., Sanz, A., Domezain, A., Ostos-Garrido, M.V., 2004. Chloride cells and pavement cells in gill epithelia of *Acipenser naccarii*: ultrastructural modifications in seawater-acclimated specimens. J. Fish Biol. 64, 553-556.
- Carr, S.H., Tatman, F., Chapman, F.A., 1996. Observation the natural history of the Gulf of Mexico sturgeon (*Acipenser oxyrinchus* de sotoi Vladykov 1955) in the Suwannee Tiver, Southerastern United Stated. Ecol, Freshwat. Fish 5, 169-174.

- Carvajal, K. and Moreno-Sánchez, R., 2003. Metabolic disturbances in cardiovascular diseases. *Archives of Medical Research* 34, 89-99.
- Cassini, M.F., Albergoni, V., 1993. Comparative studies of antioxidant enzymes in red-blooded and white-blooded Antarctic teleost fish, *Pagothenia bernacchii* and *Chionodraco hamatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 106C, 333-336.
- Cataldi, E., Ciccotti, E., Di Marco, P., Di Santo, O., Bronzi P., Cataudella, S., 1995. Acclimation trials of juvenile Italian sturgeon to different salinities: morpho-physiological descriptors. *J. Fish Biol.* 47, 609-618.
- Cataldi, E., Barzaghi, C., Di Marco, P., Boglione, C., Dini, L., McKenzie, D.J., Bronzi, P., Cataudella, S., 1999. Some aspects of osmotic and ionic regulation in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii*. I: Ontogenesis of salinity tolerance. *J. Appl. Ichthyol.* 15, 57-60.
- Cataldi, E., Albano, C., Boglione, C., Dini, L., Monaco, G., Bronzi, P., Cataudella, S., 2002. *Acipenser naccarii*: fine structure of the alimentary canal with references to its ontogenesis. *J. Appl. Ichthyol.* 18, 329-337.
- Chakrabarti, P., Ganguly, S., Mandal, D.K., 1994. Histochemical studies of the digestive system of freshwater cichlid fish, *Oreochromis mossambicus* (Peters). *J. Freshwater Biol.* 6, 63-69.
- Chakrabarti, I., Gani, Md. A., Chaki, K.K., Sur, R., Misra, K.K., 1995. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 112, 167-177
- Clark, J., McDonald, N.L., Stark, J.R., 1985. Metabolism in marine flatfish: II. Protein digestion in dover sole (*Solea solea* L.). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 81, 217-222.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A., (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59, 527-605.
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *British medical Bulletin* 49, 481-493.
- Chiu, S.T., Pan, B.S., 2002. Digestive protease activities of juvenile and adult eel (*Anguilla japonica*). *Aquaculture* 205, 141-156.
- Cho, C.Y., 1987. La energía en la nutrición de los peces. En: *Nutrición en Acuicultura*, vol. II. Espinosa de los Monteros, J., Labarta, U. (Eds.). CAICYT, Madrid, pp. 197-244.
- Chong, A.S.C., Hashim, R., Lee, C.Y., Ali, A.B., 2002. Partial characterization and activities of proteases from digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquaculture* 203, 321-333.
- Clementi, M., Cataldi, E., Capo, C., Petruzzelli, R., Tellone, E., Giardina, B., (1999). Purification and characterization of the haemoglobin components from Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) blood. *J. Appl. Ichthyol.* 15, 78-80.
- Clark, J., McDonald, N.L., Stark, J.R., 1985. Metabolism in marine flatfish: II. Protein digestion in dover sole (*Solea solea* L.). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 81, 217-222.

- Cohen, T., Gertler, A., Birk, Y., 1981. Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*): I. Purification and physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase. *Comp. Biochem. Physiol.* 69B, 639-646.
- Cottet, J., 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., 1986. The role of nutritional factors in the prevention of peroxidative damage to tissues. *Fish Physiol. Biochem.* 2, 171-178.
- Danulat, E. 1987. Digestibility of chitin in cod, *Gadus morhua*, in vivo. *Helgol. Meeresunters.* 41, 425-436.
- Dave, G., Johansson-Sjöbeck, M.L., Larsson, A., Lewander, K., Lidman, U., 1979. Effects of cortisol on the fatty acid composition of the total blood plasma lipids in the European eel, *Anguilla anguilla* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 64A, 37-40.
- Davies, K.J.A., 1991. *Oxidative Damage and Repair: Chemical, Biological and Medical Aspects.* Pergamo Press, Oxford.
- Davies, K.J.A., 2000. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 61, 1-31.
- De la Herrán, R., Robles, F., Martínez-Espín, E., Lorente, J.A., Ruiz Rejón, C., Garrido-Ramos, M.A., Ruiz Rejón, M., 2004. Genetic identification of western Mediterranean sturgeons and its implications for conservation. *Conserv. Genet.* 5, 545-551.
- Dettlaff, T.A., Ginsburg, A.S., Schmalhausen, O.I., 1993. *Sturgeon fishes: developmental biology.* Springer Velag., Berlin.
- Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., Winston, G.W., Jewell, C.S., 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 1103-1123.
- Di Marco, P., McKenzie, D.J., Mandich, A., Bronzi, P., Cataldi, E., Cataudella, S., 1999. Influence of sampling conditions on blood chemistry values of Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* (Bonaparte, 1836) *J. Appl. Ichthyol.* 15, 73-77.
- Divakaran, S., Kim, B.G., Ostrowski, A.C., 1999. Digestive enzymes present in Pacific threadfin *Polydactylus sexfilis* (Bloch and Schneider 1801) and bluefin trevally *Caranx melampygus* (Cuvier 1833). *Aquacult. Res.* 30, 781-787.
- Dobson, G.P., Parkhouse, W.S., Hochachka, P.W., 1987. Regulation of anaerobic ATP-generating pathways in trout fast-twitch skeletal muscle. *Reg. Integr. Comp. Physiol.* 22, 182-194.
- Domenicali, M., Caraceni, P., Vendemiale, G., Grattagliano, L., 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.
- Domezain Fau, A., 2003. La acuicultura como herramienta para la recuperación de especies. El esturión autóctono de la Península Ibérica *Acipenser naccarii* B. 1836. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

- Doraswamy Reddy, V., Bhaskar, M., Govindappa, S., 1988. Influence of starvation and refeeding on hepatic tissue glycogen metabolism of freshwater fish, *Sarotherodon mossambicus* (Trevawas). J. Environ. Biol. 9(1), 15-20.
- Duncan, D. B., 1955. Multiple range and multiple F test. Biometrics 11, 1-42.
- Eshel, A., Lindner, P., Smirnoff, P., Newton, S., Harpaz, S., 1993. Comparative study of proteolytic enzymes in the digestive tracts of the European sea bass and hybrid striped bass reared in freshwater. Comp. Biochem. Physiol. 106A 627-634.
- Fagbenro, O.A., 1990. Food composition and digestive enzymes in the gut of pond-cultured *Clarias isheriensis* (Sydenham 1980), (Siluriformes: Clariidae). J. Appl. Ichthyol. 6, 91-98.
- Falcioni, G., Cincola, G., Brunori, M., 1987. Glutathione peroxidasa and oxidative hemolysis in trout red blood cells. FEBS Lett. 221, 355-358.
- Fang, X., Watanabe, Y., Adachi, S., Matsumura, Y., Mori, T., Maeda, H., Nakamura, A., Matsuno, R., 2003. Microencapsulation of linoleic acid with low- and high-molecular-weight components of soluble soybean polysaccharide and its oxidation process. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67, 1864-1869.
- Fange, R., Grove, D., 1979. Digestion. En: Fish Physiology, Bioenergetics and Growth 8. Hoar, W.S., Randall, D.J., Brett, J.T. (Eds). Academic Press, New York, pp. 161-260.
- Fátima, M., Ahmad, Y., Sayeed, Y., Athar, M., Raisuddin, S., 2000. Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues. Aquat. Toxicol. 49, 243-250.
- Felton, G.W., 1995. Oxidative stress of vertebrates and invertebrates. En: Oxidative stress and antioxidant defenses in biology. Ahmad, S. (Ed.). Chapman and Hall, New York, pp. 356-434.
- Ferguson, R.A., Storey, K.B., 1991. Glycolytic and associated enzymes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red cells: in vitro and in vivo studies. J. Exp. Biol. 155, 469-485
- Figueiredo-Garutti, M.L., Navarro, I., Capilla, E., Souza, R., Moraes, G., Gutiérrez, J., Vicentini-Paulinoe, M.L.M, 2002. Metabolic changes in Brycoon cephalus (Teleostei, Characidae) during post-feeding and fasting. Comp. Biochem. Physiol. 132A, 467-476.
- Flohé, L., Günzler, W.A., 1984. Assay of glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 105, 115-121.
- Foster, G.D., Moon, T.W., 1991. Hypometabolism with fasting in the yellow perch (*Perca fluvescens*): a study of enzymes, hepatocyte metabolism, and tissue size. Physiol. Zool. 64, 259-275.
- French, C.J., Mommsen, T.P., Hochachka, T.P., 1981. Amino acid utilization in isolated hepatocytes from rainbow trout. Eur. J. Biochem. 113, 311-317.
- French, C.J., Hochachka, T.P., Mommsen, T.P., 1983. Metabolic organization of liver during spawning migration of sockeye salmon. Am. J. Physiol. 245, 827-830.
- Fridovich, I., 1976. Free radicals in biology. Prior (Ed). Academic Press. New Cork, pp. 239.

- Furné, M., Hidalgo, M.C., López, A., García-Gallego, M., Morales, A.E., Domezain, A., Domezain, J., Sanz, A., 2005. Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture* 250, 391-398.
- Furné, M., García-Gallego, M., Hidalgo, M.C., Morales, A.E., Domezain, A., Domezain, J., Sanz, A., 2008. Effect of starvation and refeeding on digestive enzyme in sturgeon (*Acipenser naccarii*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* 149A, 420-425.
- Fynn-Aikins, K., Hung, S.S.O., Liu, W., Li, H., 1992. Growth, lipogenesis and liver composition of juvenile white sturgeon fed different levels of D-glucose. *Aquaculture* 105, 61-72.
- Gabryelak, T., Piatkowska, P., Leyko, W., Pérès, G., 1983. Seasonal variations in the activities of peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* 75C, 383-385.
- Gaertner, H.F., Brachet, P., Puigserver, A.J., 1989. En: Absorption and utilization of amino acids. Friedman, M. (Ed). CRC Press, Boca Raton.
- García-Gallego, M., Bazoco, J., Suárez, M.D., Sanz, A., 1995. Utilization of dietary carbohydrates by fish: a comparative study in eel and trout. *Anim. Sci.* 61, 427-436.
- García-Gallego, M., Sanz, A., Domezain, A., de la Higuera, M., 1999. Age-size influences on tissue-lipid quality of the sturgeon *Acipenser naccarii* from intensive culture. *J. Appl. Ichthyol.* 15, 261-264.
- Gardiner, B.J., 1984. The relationships of the paleoniscid fishes: a review base on new specimens of *Mimia* and *Moythomasia* from the upper Devonian of Western Australia. *Bull. Brit. Mus. Nat. Histo., Geol. Serv.* 37, 173-248.
- Garrido-Ramos, M.A., Soriguer, M.C., de la Herrán, R., Jamilena, M., Ruiz Rejón, C., Domezain, A., Hernando, J.A., Ruiz Rejón, M., 1997. Morphogenetic and genetic analysis as proof. for the existence of two sturgeon species in the Guadalquivir river. *Mar. Biol.* 129, 33-39.
- Gas, N., Noaillic-Depeyre, J., 1976. Studies on intestinal epithelium involution during prolonged fasting. *J. Ultrastruct. Res.* 56, 137-151.
- George, S., Rilcy, C., McEvoy, J., Wright, J., 2000a. Development of a fish in vitro cell culture model to investigate oxidative stress and its modulation by dietary vitamin E. *Mar. Environ. Res.* 50, 541-544.
- George, S., Wright, J., Bell, G., Geffen, A., Taylor, S., 2000b. Dietary effects on xenobiotic-induced oxidative damage in "O" group plaice. *Mar. Environ. Res.* 50, 80-81.
- Gildberg, A., 1988. Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 91B, 425-435.
- Gildberg, A., 2004. Digestive enzyme activities in starved pre-slaughter farmed and wild-captured, Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 238, 343-353.

- Gisbert, E., Sarasquete, M.C., Williot, P., Castello-Orvay, F., 1999. Histochemistry of the development of the digestive system of Siberian sturgeon during early ontogeny. *J Fish Biol* 55, 596-616.
- Glass, H.J., McDonald, N.L., Moran, R.M., Stark, J.R., 1989. Digestion of protein in different marine species. *Comp. Biochem. Physiol.* 94B, 607-611.
- Godin, D. V. and Wohaiieb, S. A., 1988. Nutritional deficiency, starvation, and tissue antioxidant status. *Free Radical Biology and Medicine* 5, 165-176.
- 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.
- Guerriero, G., Di Finizio, A., García, G., 2002. Stress-induced changes of plasma antioxidants in aquacultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Comp. Biochem. Physiol.* 132A, 205-211.
- Gutiérrez, J., Pérez, J., Navarro, I., Zanuy, S., Carrillo, M., 1991. Changes in plasma glucagon and insulin associated with fasting in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish Physiol. Biochem.* 9, 107-112.
- Grandi, G., Chicca, M., 2004. Early development of the pituitary gland in *Acipenser naccarii* (Chondrostei, Acipenseriformes): an immunocytochemical study. *Anat. Embryol.* 208, 311-321.
- Haard, N.F., Dimes, L.E., Amdt, R.E., Dong, F.M., 1996. Estimation of protein digestibility IV. Digestive proteinases from the pyloric caeca of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) fed diets containing soybean meal. *Comp. Biochem. Physiol.* 115B, 533-540.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Cross, C.E., 1992. Free radical, antioxidants, and human disease: where are we now?. *J. Labo. Clin. Med.* 119, 598-620.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2000. *Free radicals in biology and medicine*, 3^a ed. Oxford University Press, Oxford.
- Hamre, K., Waagbo, R., Berge, R.K., Lie, O., 1997. Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *Free Rad. Biol. Med.* 22, 137-149.
- Harmon, J.S., Sheridan, M.A., 1992. Previous nutritional states and glucose modulate glucagon-mediated hepatic lipolysis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Zool. Sci.* 9, 275-281.
- Heide, A., Foss, A., Stefansson, S. O., Mayer, I., Norberg, B., Roth, B., Jenssen, M. D. and Nortvedt, R., 2006. Compensatory growth and fillet crude composition in juvenile Atlantic halibut: Effects of short term starvation periods and subsequent feeding. *Aquaculture* 261, 109-117.
- Hernando, J.A., Vasiléva, E.D., Arlati, G., Vasiléva, Y.P., Santiago, J.A., Belysheva-Polyakova, L., domezain, A., Soriguer, M.C., 1999. New evidence for a wider historical area of two species of European sturgeons: *Acipenser naccarii* and *Huso huso*. *J. Ichthyol.* 39, 803-806.
- Herold, M.A., Hung, H., 1995. Apparent digestibility coefficients of carbohydrates for white sturgeon. *Prog. Fish-Cult.* 57, 137-140.

- Hidalgo, M.C., Sanz, A., García-Gallego, M., Suárez, M.D., 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., 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., 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.
- Higgs, D.M., Dong, E.M., 2000. En: *The encyclopedia of Aquaculture*. Stickney, R.R. (Ed). John Wiley & Sons, New York.
- Hofer, R., Köck, G., 1989. Method for quantitative determination of digestive enzymes in fish larvae. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 36, 439-441.
- Hsu, Y.L., Wu, J.L., 1979. The relationship between feeding habits and digestive proteases of some freshwater fishes. *Bull. Inst. Zool. Acad. Sin.* 18, 45-53.
- Hung, S.S.O., Liu, W., Li, H., Storebakken, T., Cui, Y., 1997. Effect of starvation on some morphological and biochemical parameters in white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Aquaculture*, 151, 357-363.
- Icardo, J.M., Guerrero, A., Durán, A.C., Domezain, A., Colvee, E., Sans-Coma, V., 2004. The development of the sturgeon heart. *Anat. Embryol.* 208, 439-449.
- Ito, T., Murata, H., Tsuda, T., Yanauchi, K., Ukawa, M., Yamguchi, T., Yoshida, T., Sakai, T., 1999. Effects of α -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. *Fish. Sci.* 65, 679-683.
- Jürss, K., Bittorf, T., Vökler, 1986. Influence of salinity and food deprivation on growth, RNA/DNA ratio and certain enzyme activities in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Comp. Biochem. Physiol.* 83B, 425-433.
- Kaushik, S.J., Breque, J., Blanc, D., 1993. Apparent amino acid availability and plasma-free amino acid levels in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 107A, 433-438.
- Kieffer, J.D., Wakefield, A.M., Litvak, K., 2001. Juvenile sturgeon exhibit reduced physiological responses to exercise. *J. Exp. Biol.* 204, 4281-4289.
- Kim, J.D., 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.
- Kirchner, S., Seixas, P., Kaushik, S., 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.
- Kirschke, H., Barret, A.J., 1987. Chemistry of lysosomal proteases. En: Glaumann, H., Ballard, F.J. (Eds.). *Lysosomes: their role in protein breakdown*. Academic Press, London, pp. 193-218.

- Kok, T.M., ten Vaarwerk, F., Zwingman, I., van Maanen, J.M., Kleinjans, J.C., 1994. Peroxidation of linoleic, arachidonic and oleic acid in relation to the induction of oxidative DNA damage and cytogenetic effects. *Carcinogenesis* 15, 1399–1404.
- Kolkovski, S., 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles -implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200, 181-201.
- Krogdahl, A., Bakke-McKellep, A.M., 2005. Fasting and refeeding cause rapid changes in intestinal tissue mass and digestive enzyme capacities of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 141A, 450-460.
- Kunitz, M., 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor: II. General properties. *J. Gen. Physiol.* 30, 291-310.
- Kurata, M., Suzuki, M., Haruta, K., Takeda, K., 1994. Relationship between erythrocyte deformability and glutathione under oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 107, 7-12.
- Kuzmina, V.V., 1986. Obshchie zakonomnosti membrannogo pishchevareniya u ryb i yego adaptivnyye perestroyki (General principles of membrane digestion in fish and its adaptive evolution). Tesis doctoral. Ciencias Biológicas, 03.00.13. Leningrad.
- Lammi-Keefe, C. J., Hegarty, P. V. J. and Swan, P. B., 1980. Effect of age on catalase and superoxide dismutase (SOD) in rat skeletal and cardiac muscles after starvation and refeeding. *Fed. Proc.* 39, 1122 abstr.
- Larsson, A., Lewander, K., 1973. Metabolic effects of starvation in the eel, *Anguilla anguilla* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 44A, 367-374.
- Leger, C., Ducruet, V., Flanzy, J., 1979. Lipase et colipase de la truite arc-en-ciel. Vuelques résultats récents. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 19, 825-832.
- 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, 2477-2485.
- Lie, O., Lambertsen, G., 1985. Digestive lipolytic enzymes in cod (*Gadus morhua*): fatty acid specificity. *Comp. Biochem. Physiol.* 80B, 447-450.
- Liebler, D.C., Reed, D.J., 1997. Free-radical defense and repair mechanisms. En: *Free Rad. Toxicol. Cap. 8*. Wallace, K.B. Taylor & Francis (Eds) U.S.A. pp. 141-171.
- Lim, A.L.L., Ip, Y.K., 1989. Effect of fasting on glycogen metabolism and activities of glycolytic and gluconeogenic enzymes in the mudskipper *Boleophthalmus boddarti*. *J. Fish Biol.* 34, 349-367.
- Lin, H., Romsos, D.R., Tack, P.I., Leville, G., 1977. Influence of dietary lipid on lipogenic enzyme activities in coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum). *J. Nutr.* 107, 846-854.
- Llorente, J. I., Hidalgo, M. C., García-Gallego, M., Furné, M., Morales, A. E., Carmona, R., Ostos, M. V., Domezain, A., Domezain, J., Sanz, A., 2005. enzimas digestivas durante el desarrollo ontogénico del esturión, *Acipenser naccarii*, Bonaparte 1836. X Congreso Nacional de Acuicultura, Valencia.

- López-Torres, M., Pérez-Campo, R., Cadenas, S., Rojas, C., Barja, G., 1993. A comparative study of free radicals in vertebrates-II. Non-enzymatic antioxidants and oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 105, 757-763.
- Lowery, M.S., Somero, G.N., 1990. Starvation effects on protein synthesis in red and white muscle of the barred sand bass, *Paralabrax rebulifer*. *Physiol. Zool.* 63, 630-648.
- Machado, C.R., Garofalo M.A.R., Roselino J.E.S., Kettelhut I.C., 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(3), 429-437.
- Mann, T., Keilin, D., 1938. Haemocuprein and hepatocuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals. *Proc. Roy. Soc. London* 126B, 303.
- Marcon, J.L., 1996. Estresse oxidativo em duas espécies de teleósteos amazônicos, *Astronotus ocellatus* e *Colussoma macropomum*, expostos a diferentes tensões de oxigênio: uma abordagem comparativa. Ph. D. Thesis. INPA / FUA, Manaus.
- Marcon, J.L., Filho, D.W., 1999. Antioxidant processes of wild tambaqui, *Colossoma macripomum* (Osteichthyes Serrasalminidae) from the Amazon. *Comp. Biochem. Physiol.* 123C, 257-263.
- Martínez-Álvarez, R. M., Hidalgo, M. C., Domezain, J., Morales, A. E., García-Gallego, M., Sanz, A., 2002. Physiological changes of sturgeon (*Acipenser naccarii*) caused by increasing environmental salinity. *J. Exp. Biol.* 105, 3699-3706.
- Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A., 2005. Antioxidant defences in fish: Biotic and abiotic factors. *Rev. Fish Biol. Fish.* 15, 75-88.
- Matkovics, B., Novak, R., Hahn, H.D., Szabó, L., Varga, S.I., Zalesna, G., 1977. A comparative study of some more important experimental animal peroxide metabolism enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 56B, 31-34.
- McKenzie, D.J., Cataldi, E., Di Marco, P., Mandlich, A., Romano, P., Ansferri, S., Bronzi, P., Cataudella, S., 1999. Some aspects of osmotic and ionic regulation in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii*. II: Morpho-physiological adjustments to hyperosmotic environments. *J. Appl. Ichthyol.* 15, 61-66.
- McKenzie, D.J., Cataldi, E., Romano, P., Owen, S.F., Taylor, E.W., Bronzi, P., 2001a. Effects of acclimation to brackish water on the growth, respiratory metabolism, and swimming performance of young-of-the-year Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58, 1104-1112.
- McKenzie, D.J., Cataldi, E., Romano, P., Taylor, E.W., Cataudella, S., Bronzi, P., 2001b. Effects of acclimation to brackish water on tolerance of salinity challenge by young-of-the-year Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58, 1113-1121.
- McLeese, J.M., Moon, T.W., 1989. Seasonal changes in the intestinal mucosa for winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum), from Passamaquoddy Bay, New Brunswick. *J. Fish Biol.* 35, 381-393.
- McCord, J.M., Fridovich, J., 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.

- McCord, J.M., 1979. En: Reviews in Biochemical Toxicology. Hodgson, E., Berd, J.R., Philpot, R.M (Eds). Elsevier, New York, pp.109.
- Medale, F., Blanc, D., Kaushik, S.J., 1991. Studies on the nutrition of Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*. II. Utilization of dietary non-protein energy by sturgeon. *Aquaculture* 93, 143-154.
- Meiattini, F., Prencipe, L., Bardelli, F., Giannini, G., 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., Wieser, W., 1993. Metabolic responses to food deprivation and refeeding in juveniles of *Rutilus rutilus* (Teleostei: Cyprinidae). *Environ. Biol. Fishes* 36, 73-81.
- Metón, I., Fernández, F., Baanante, I.V., 2003. Short- and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glicólisis-gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 225, 99-107.
- Moe, C.M., y Place, A.M., 1999. En: Fish feeding ecology and digestion: Gutshop '98.
- Mommsen, T.P., Plisetskaya, E.M., 1991. Insulin in fishes and agnathans: History, structure and metabolic regulation. *Rev. Aquat. Sci.* 4, 225-259.
- Mommsen, T.P., French, C.J., Hochachka, P.W., 1980. Sites and patterns of protein and amino acid utilization during the spawning migration of salmon. *Can. J. Zool.* 58, 1785-1799.
- Mommsen, T.P., Osachoff, H.L., Elliott, M.E., 2003. Metabolic zonation in teleost gastrointestinal tract. *J. Comp. Physiol.* 173B, 409–413.
- Moon, T.W., Mommsen, T.P., 1987. Enzymes of intermediary metabolism in tissues of the little skate, *Raja erinacea*. *J. Exp. Zool.* 244, 9-15.
- Morales, A.E., García-Rejón, L., De la Higuera, M., 1990. Influence of handling and/or anesthesia on stress response in rainbow trout. Effects on liver primary metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 95A, 87-93.
- Morales, A.E., Cardenete, G., De la Higuera, M., Sanz, A., 1994. Effects of dietary protein source on growth, feed conversion and energy utilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 124, 117-126.
- Morales, A.E., Pérez-Jiménez, A., Hidalgo, M.C., Abellán, E., Cardenete, G., 2004. Oxidative stress and antioxidant defences alter prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comp. Biochem. Physiol.* 139C, 153-161.
- Moreau, R., Dabrowski, K., Czesny, S., 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.
- Moreau, Y., Desseaux, V., Koukikolo, R., Marchis-Mouren, G., Santimone, M., 2001. Starch digestion in tropical fishes: isolation, structural studies and inhibition kinetics of alpha – amylases from two tilapias *Oreochromis niloticus* and *Sarotherodon melanotheron*. *Comp. Biochem. Physiol.* 128B, 543-552.
- Moyes, C.D., Buck, L.T., Hochachka, P.W., Suárez, R.K., 1989. Oxidative properties of carp red and white muscle. *J. Exp. Biol.* 143, 321-332.

- Moyes, C. D., Schulte, P. M., Hochachka, P. W., 1992. Recovery metabolism in fish white muscle: the role of the mitochondria. *Am. J. Physiol.* 262, 295-304.
- Munilla-Morán, R., Stark, J.R., 1989. Protein digestion in early turbot larvae, *Scophthalmus maximus* (L.). *Aquaculture* 81, 315-327.
- Munilla-Morán, R., Saborido-Rey, R., 1996. Digestive enzymes in marine species. II. Amylase activities in gut from seabream (*Sparus aurata*), turbot (*Scophthalmus maximus*) and redfish (*Sebastes mentella*). *Comp. Biochem. Physiol.* 113B, 827-834.
- Naito, H., 1989. High-density lipoprotein (HDL) cholesterol. En: *J. Clinical chemistry. Theory, analysis and correlation*. 2^a Ed. Kaplan, L.A. (Ed). Moshy Co, St. Louis, pp. 983-990.
- Nagababu, E., Rifkind, J.M., 2000. Heme degradation during autoxidation of oxyhemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 839-845.
- Nagai, T., Inada, J., Hamada, M., Kai, N., Tanoue, Y., Kaminishi, Y., Nakagawa, H., Fujiki, K., Nakao, M., Yano, T., 1999. Distribution of glutathione peroxidase activity in fish. *Fish. Sci.* 65, 665-666.
- Nakano, T., Miura, Y., Wazawa, M., Sato, M., Takeuchi, M., 1999. Red yeast *Phaffia rhodozyma* reduces susceptibility of liver homogenate to lipid peroxidation in rainbow trout. *Fish. Sci.* 65, 961-962.
- Navarro, I., Gutiérrez, J., 1995. Fasting and starvation. En *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Metabolic Biochemistry*, vol. 4. Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 393- 434.
- Nelson, J.A., Wubah, D.A., Whitmer, M.E., Johnson, E.A., Stewart, D.J., 1999. Wood-eating catfishes of the genus *Panaque*: gut microflora and cellulolytic enzyme activities. *J. Fish Biol.* 54, 1069-1082.
- Noaillac-Depeyre, J., Gas, N., 1978. Absorption of protein macromolecules by the enterocytes of the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Z Zellforsch* 146, 525-541.
- Okada, M., Matsui, H., Ito, Y., Fujiwara, A., Inano, K., 1998. Low-density lipoprotein cholesterol can be chemically measured: A new superior method. *J. Lab. Clin. Med.* 132, 195-201.
- Olivereau, M., Olivereau, J.M., 1997. Long-term starvation in the European eel: general effects and responses of pituitary growth hormone-(GH) and somatostatin-(SL) secreting cells. *Fish Physiol. Biochem.* 17, 261- 269.
- Opuszynski, K., Shireman, J.V., 1995. Digestive mechanisms. En: *Herbivorous fishes: culture and use for weed management*. Opuszynski, K., Shireman, J.V. (Eds.). CRC Press, Boca Raton, FL., pp. 21-31.
- Parihar, M.S., Dubey, A.K., 1995. Lipid peroxidation and ascorbic acid status in respiratory organs of male and female freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to temperature increase. *Comp. Biochem. Physiol.* 112C, 309-313.
- 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.

- Peña de la A., P. 1997. Radicales libres y mecanismos antioxidantes. Generalidades y aplicaciones en la práctica clínica. *Rev. Clin. Espa.* 197, 434-446.
- Pérez-Campo, R., López-Torres, M., Rojas, C., Cadenas, S., Barja, G., 1993. A comparative study of free radicals in vertebrates—I. Antioxidant enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 105B, 745-749.
- Pérez-Jiménez, A., Guedes, M.J., Morales, A.E., Oliva-Teles, A., 2007. Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. *Aquaculture* 265, 325-335.
- Phan, T., Bach, A., Metais, P., 1974. Effects fasting on intermediate hepatic metabolism of rat. *Arch. Int. Physiol. Biochem.* 24, 31-39.
- Rabie, F., Magid, A.M.A., Guma'a, K.A., Karrar, O., 1972. Evolution of catalase in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 43A, 1053-1055.
- Rasmussen, L.E., 1980. Comparative distribution of nitrogenous compounds in *Acipenser transmontanus* and *Hidrolagus colliet*: enzyme kinetics and isozyme ratios alterations. *Comp. Biochem. Physiol.* 67B, 665-677.
- Refstie, S., Korsoren, O.J., Storebakken, T., Baeverfjord, G., Lein, I., Roen, A.J., 2000. Differing nutritional responses to dietary soybean meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 190, 49-63.
- 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.
- Robit, J.F., Whelan, W.J., 1968. The β -amylases. En: *Starch and its Derivates*. Radley, J.A. (Ed.), Academic Press, London, pp. 477-497.
- Robles, F., De la Herrán, R., Ludwig, A., Ruiz Rejón, C., Ruiz Rejón, M., Garrido-Ramos, M.A., 2004. Evolution of ancient satellite DNAs in sturgeon genomes. *Gene* 228, 133-142.
- Roehring, K.L., Allred, J.B., 1974. Direct enzymatic procedure for the determination of liver glycogen. *Anal. Biochem.* 58, 414-421.
- Romero Alvira, C., González Martínez, F., 1992. Estrés oxidativo y su relación con la patología pediátrica. *An. Esp. Pediatr.* 36, 85-97.
- Ross, S.W., Dalton, D.A., Kramer, S., Christensen, B.L., 2001. Physiological (antioxidant) responses of estuarine fishes to variability in dissolved oxygen. *Comp. Biochem. Physiol.* 130C, 289-303.
- Rudneva, I.I., 1997. Blood antioxidant system of Black Sea elasmobranches and teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.* 118C, 255-260.
- Rudneva, I.I., 1999. Antioxidant system of Black Sea animals in early development. *Comp. Biochem. Physiol.* 122C, 265-271.
- Sabapathy, U., Teo, L.H., 1993. A quantitative study of some digestive enzymes in the rabbitfish, *Siganus canaliculatus* and the sea bass (*Lates calcarifer*). *J. Fish Biol.* 42, 595-602.
- Saltman, P., 1989. Oxidative stress: a radical view. *Semin. Hematol.* 26, 249-256.

- Sanz, A., Suárez, M.D., Hidalgo, M.C., García-Gallego, M., 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.
- Sanz, A., Morales, A.E., De la Higuera, M., Cardenete, G., 1994. Sunflower meal compared with soybean meal as partial substitutes for fish meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets: protein and energy utilization. *Aquaculture* 128, 287-300.
- Sanz, A., Domezain, A., Trenzado, C., García-Gallego, M., 1997. Primera aproximación al conocimiento de la utilización digestiva de los macronutrientes por el esturión *Acipenser naccarii*. *Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura*. 9-11 Julio 1997, Cartagena, Spain, pp. 653-659.
- Sarwar, G., Paquet, A., 1989. En: Absorption and utilization of amino acids. Friedman, M. (Ed.) CRC Press, Boca Raton.
- Schulte, P.M., Moyes, C.D., Hochachka, P.W., 1992. Integrating metabolic pathways in post-exercise recovery of white muscle. *J. Exp. Biol.* 166, 181-195.
- Sephton, D.H., MacPhee, W.L., Driedzic, W.R., 1991. Metabolic enzyme activities, oxygen consumption and glucose utilization in sea raven (*Hemitripterus americanus*) erythrocytes. *J. Exp. Biol.* 159, 417-418.
- Shimeno, S., Kheyyali, D., 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 ration *Oreochromis niloticus*. *Nippon Suisan Gakk.* 59, 827-833.
- Sies, H., Kaiser, S., Di Mascio, P., Murphy, M.E., 1993. Scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. En: . Vitamin E in health and disease. Packer, L., Cadenas, E., (Eds.) Marcel Dekker, New York, pp. 141-152.
- Singh, R.P., Nose, T., 1967. Digestibility of carbohydrates in young rainbow trout. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lap. (Japan)* 17, 21-25.
- Singer, T.D., Ballantyne, J.S., 1989. Absence of extrahepatic lipid oxidation in a freshwater elasmobranch, the dwarf stingray *Potamotrygon magdalenae*: evidence from enzyme activities. *J. Exp. Zool.* 251, 355-360.
- 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.
- Smith, A.C., 1976. Catalase in fish red blood cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 54B, 331-332.
- Smith, L.S., 1980. Digestion in teleost fish. FAO/UNDP Training Course in fish Feed Technology, held at the college of fisheries. University of Washington, Seattle, Washington, U.S.A.
- Smith, L.S., 1989. En: Fish nutrition. Halver, H. (Ed.). Academic Press, San Diego, CA.

- 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.
- Somogy, M., 1951. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 19-23.
- Soriguer, M.C., Domezain, J., Domezain, A., Bernal, M., Esteban, C., Pumar, J.C., Hernando, J.A., 1999. An approximation of the feeding habits of *Acipenser naccarii* (Bonaparte 1836) in an artificial river. *J. Appl. Ichthyol.* 15, 348-349.
- Soriguer, M.C., Domezain, A., Aragonés, J., Domezain, J., Hernando, J.A., 2002. Feeding preference in juveniles of *Acipenser naccarii* Bonaparte 1836. *J. Appl. Ichthyol.* 18, 4-6.
- Spannhof, L., Plantikow, H., 1983. Studies on carbohydrate digestion in rainbow trout. *Aquaculture* 30, 95-108.
- Speers-Roesch, B., Ip, Y.K., Ballantyne, J.S., 2006. Metabolic organization of freshwater, euryhaline, and marine elasmobranchs: implications for the evolution of energy metabolism in sharks and rays. *J. Exp. Biol.* 209, 2495-2508.
- Stickney, R.R., Shumway, S.E., 1974. Occurrence of cellulose activity in the stomachs of fishes. *J. Fish Biol.* 6, 779-790.
- Stirling, H.P., 1976. Effects of experimental feeding and starvation on the proximate composition of the European bass, *Dicentrarchus labrax*. *Mar. Biol.* 34, 85-91.
- Storebakken, T., Shearer, K.D., Refstie, S., Logocki, S., 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* 47, 11-26.
- Stroband, H.W.J. y Van der Veen, F.H., 1981. The localization of protein absorption during transport of food in the intestine of the grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *J. Exp. Zool.* 218, 149-156.
- Suárez, R.K., Mommsen, T.P., 1987. Gluconeogenesis in teleost fish. *Can. J. Zool.* 65, 1869-1882.
- Tappel, M.E., Chaudiere, J., Tappel, A.L., 1982. Glutathione peroxidase activities of animal tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B, 945-949.
- Tengjaroenkul, B., Smith, B.J., Caceci, T., Smith, S.A., 2000. Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 182, 317-327.
- Thibault, M., Blier, P.U., Guderley, H., 1997. Seasonal variation of muscle metabolic organization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* 16, 139-155.
- Thurman, H.V., Webber, H.H., 1984. *Marine Biology*. Charles E. Cerril Publishing C.A. Bell and Howell (Eds).. Columbus, Ohio.
- Tian, W.N., Braunstein, L.D., Apse, K., Pang, J., Rose, M., Tian, X., Stanton, R.C., 1999. Importance of glucose-6-phosphatase dehydrogenase activity in cell death. *Am. J. Physiol.* 276, 1121-1131.

- Tiano, L., Ballarini, P., Santoni, G., Wozniak, M., Falcioni, G., 2000. Morphological and functional changes of mitochondria from density separated trout erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1457, 118-128.
- Tocher, D.R., Mourente, G., Van der Eecken, A., Evjemo, J.O., Díaz, E., Wille, M., Bell, J.G., Olsen, Y., 2003. Comparative study of antioxidant defence mechanisms in marine fish fed variable levels of oxidised oil and vitamin E. *Aquac. Int.* 11, 195-216.
- Trenzado, C., Hidalgo M.C., García-Gallego, M., Morales, A.E., Furné, M., Domezain, A., Domezain, J., Sanz, A., 2006. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture* 254, 758-767.
- Trinder, P., 1969. Determination of glucose blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* 6, 24-27.
- Twining, S.S., Alexander, P.A., Huibregste, K., Glick, D.M., 1983. A pepsinogen from rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 75B, 109-112.
- Ugolev, A.M., Yegorova, V.V., Kuzmina, V.V., Gruzdkov, A.A., 1983. Comparative molecular characterization of membrane digestion in fish and mammals. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 76, 627-635.
- Uys, W., Hecht, T., 1987. Assays on the digestive enzymes of sharptooth catfish, *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae). *Aquaculture* 63, 301-313.
- Vázquez, M., Rodríguez, F., Domezain, A., Salas, C., 2002. Development of the brain of the sturgeon *Acipenser naccarii*. *J. Appl. Ichthyol.* 18, 275-279.
- Vijayan, M.M., Ballantine, J.S., Leatherland, J.F., 1990. High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture* 88, 371-381.
- Walter, H.E., 1984. Proteinases: methods with haemoglobin, casein and azocoll as substrates. En: *Methods of enzymatic analysis*. Bergmeyer, H.U. (Ed.). Verlag Chemie, Weinheim, pp. 270-277.
- Walter, H.E., 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol.V. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 270-277.
- Wdzieczak, J., Zalesna, G., Wujec, E., Peres, G., 1982. Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B, 361-365.
- Wendelaar-Bonga, S.E., 1993. En: *The physiology of fishes*. Evans, D.H. (Ed.). CRC Press, Boca Rantón, FL.
- West, T.G., Schulte, P.M., Hochachka, P.W., 1994. Implications of hyperglycemia for post-exercise resynthesis of glycogen in trout skeletal muscle. *J. Exp. Biol.* 189, 69-84.
- Wilhelm-Filho, D.W., Boveris, A., 1993. Antioxidant defenses in marine fish-II. Elasmobranchs. *Comp. Biochem. Physiol.* 106C, 415-418.
- Wilhelm-Filho, D.W., Giulivi, C., Boveris, A., 1993. Antioxidant defenses in marine fish-I. Teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.* 106C, 409-413.

- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137–161.
- Woodward, B., 1994. Dietary vitamin requirements of cultured young fish, with emphasis on quantitative estimates for salmonids. *Aquaculture* 124, 133-168.
- Yamada J., Kusakari M. 1991. Staging and the time course of embryonic development in kurosoi, *Sebastes schlegeli*. *Environ. Biol. Fish.* 30, 103–110.
- Yetty, N., Roshada, H., Ahyaudin, A., Chong, A., 2004. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). *Aquaculture* 233, 305-320.
- Zammit, V.A., 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.