

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Departamento de Biología Animal y Ecología**



**SELECCIÓN PARENTAL Y DIETA COMO  
ESTRATEGIAS DE ATENUACIÓN DEL  
ESTRÉS CRÓNICO EN LA TRUCHA  
*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)**

**Cristina Trenzado Romero**

**TESIS DOCTORAL**

**Granada, 2004**



**SELECCIÓN PARENTAL Y DIETA COMO ESTRATEGIAS  
DE ATENUACIÓN DEL ESTRÉS CRÓNICO EN LA  
TRUCHA *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792)**

Memoria para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas presentada por la licenciada:

*D<sup>a</sup> Cristina Trenzado Romero*

**DIRECTORES DEL TRABAJO:**

*Prof. Dr. D. Manuel de la Higuera González*

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

**LA ASPIRANTE:**

*Lda. D<sup>a</sup>. Cristina Trenzado Romero*

Los trabajos de investigación que se recogen en la presente memoria se han llevado a cabo gracias al apoyo económico del proyecto de investigación titulado: “*Selective Breeding for stress Tolerance in Aquacultured Fish*” FAIR-CT95-0152, financiado por la Comisión Europea.

Los trabajos de investigación que se exponen en esta memoria han sido realizados en la Unidad de Fisiología Animal del Departamento de Biología Animal y Ecología de la Universidad de Granada.

Asimismo, algunos de los resultados recogidos en esta memoria han sido presentados en:

- VIII Internacional Symposium of Nutrition and Feeding of Fish. Las Palmas de Gran Canaria, Spain, 1998.
- IX Congreso Nacional de Acuicultura, Cádiz, 2003.

Cuando se inicia un trabajo, sea cual sea, lo importante es contar con unos buenos cimientos y que el material utilizado sea de la mayor calidad posible; cada pieza, por pequeña que sea, cumple una función imprescindible para obtener un buen resultado. En este caso, me puedo considerar afortunada de que este proyecto haya contado con esos “ingredientes” a los que debo mi agradecimiento:

Me gustaría agradecer a los Dres. Manuel de la Higuera González y Amalia E. Morales Hernández que me brindaran la posibilidad de realizar este trabajo bajo su dirección y sobre todo, su disponibilidad y paciencia a lo largo de todo este tiempo.

A Pablo y Manuel Medina, de Piscifactorías Andaluzas (Loja, Granada) por haber facilitado, de manera desinteresada, los animales utilizados en los ensayos.

A D. José Linares, de la casa Koipe, por haber aportado información necesaria en la búsqueda de fuentes lipídicas adecuadas para la elaboración de las dietas.

A los Dres. Ramón Carmona y M<sup>a</sup> del Valle Ostos, por su inestimable ayuda y colaboración en toda la parte de histología de este trabajo.

Al Dr. José M. Palma por haber querido compartir sus amplios conocimientos en el “metabolismo de especies de oxígeno reactivo” de una manera tan desinteresada y por ser tan infinitamente paciente en todo lo que se refiere a las electroforesis.

Al Dr. Juan B. Barroso, por su colaboración con los análisis de la iNOS y poner a nuestra disposición información sobre el tema.

Al Dr. Manuel García Gallego, mi tutor de doctorado, orientador en mis inicios como alumna interna, profesor de fisiología animal, consejero en temas de ácidos grasos, distribuidor de programas informáticos (y algún que otro ordenador y monitor...), “solucionador” de problemas en general....y sobre todo una buenísima persona.

A la Dra. Ana Sanz Rus, por su disponibilidad en todo momento para solucionar cualquier cosa, científica o del alma. Por ser todo espíritu y empatía.

A la Dra. Mary Carmen Hidalgo, por todo su apoyo mostrado resolviendo mis innumerables dudas en toda la parte experimental de la tesis, ya se que soy muy preguntona...pero es que no lo puedo evitar.

A los Dres. Gabriel Cardenete, Laura García, Félix Hidalgo y Eugenio Martín, por su amistad, siempre ha habido un momento en que vuestra presencia ha sido esencial.

A José Antonio y Manolo (viernes), siempre dispuestos a prestar material, poner un sello, hacer una fotocopia o dar un abrazo. Los más nombrados en todas las tesis...por algo será. Sois una pareja insustituible.

Al Dr. Tom Pottinger y a Toby Carrick, por haberme dado la posibilidad de conocer otra forma de investigar, gracias por tener plena confianza en mí desde el primer momento y por vuestra paciencia con mi "perfecto" inglés.

A la gente del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, mi segundo departamento, por poner a mi disposición tantísimas cosas que me han hecho falta en un momento dado (hielo picado, congelador de -80 °C, centrifuga, etc.). Al Dr. José A. Lupiáñez (siempre con una sonrisa amable), Mónica (por su eficiencia en los comienzos de nuestro experimento compartiendo animales), también a María y Loli.

No quiero olvidar a Rafa y Juan de mantenimiento, muchísimas gracias por acudir a solucionar los problemas del "sótano". Habéis sido imprescindibles. En serio.

A Alí, nuestro flamante doctor. Muchísimas gracias por tu dedicación y ayuda con algunas técnicas de estrés oxidativo, y por abrir de vez en cuando "el cofre de los tesoros" para prestar algún material que he necesitado.

A Fernando, Ferni, Fernandito.....ponga lo que ponga sigue siendo igual de buena persona. Gracias por esas magníficas disecciones ("ver Imagen IV. 1") y por tu infinita paciencia con mis dudas y cuestiones metafísicas, espero no haberte causado una úlcera de estómago.

A Rosa, el hecho de estar en el mismo departamento ha sido la excusa perfecta para encontrar a una amiga como tu, tantas horas de dietas y análisis compartidas y desinteresadas, tantos buenos y menos buenos momentos...muchísimas gracias Rous, por ser simplemente tú.

A Ana “la portuguesa”, muchísimas gracias por ser mi otra mitad en el segundo ensayo, desde el mantenimiento de animales (tan esclavo!) hasta la parte analítica. No lo olvido.

A Andrea (del Perú), Beta, Carmen, Manolo Peula, Paco, Pelayo, siempre dispuestos a ayudar haciendo dietas, análisis de composición, las fotos de los peces...lo que fuera... También a María, José Ignacio, Miriam y Ana Belén, por su ayuda en la última etapa de los análisis.

No quiero olvidar a Amalia, por ayudarme tantísimo con los últimos análisis de estrés oxidativo, por todo lo que se refiere a cuestiones informáticas, creo que estas líneas no son suficientes para agradecerte todo lo que me has ayudado.

A Laura, pieza clave en los análisis de ácidos grasos, gracias por estar a mi lado mientras “descubríamos” la técnica de extracción de lípidos. No olvido tu ayuda en los últimos análisis de los aceites de las dietas.

A mis amigas de biológicas, a Marisa (por tener siempre la cámara de fotos preparada), a Estefanía por estar siempre ahí (como las estrellas).

A mis hermanos Ali y Ché y a mis primos y tíos. A Jose, por valorar tanto el trabajo que he hecho, por haberte quitado tantas horas... Gracias por tu apoyo en los momentos más difíciles. A Nelly, mi madre, por haberme dado el privilegio de vivir 30 años al lado de alguien tan especial como ella...aprendiendo de tí. A mi padre, ya sabes toda la ayuda que me has prestado y la paciencia que has tenido conmigo. Gracias por estar a mi lado.

Después de estos años de trabajo uno se da cuenta del valor de estar rodeado de buena gente.





*A Nelly y Manolo, mis padres*

*A Jose*

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- Aa:** Aminoácido.
- AAT:** Alanina aminotransferasa.
- ACTH:** Hormona adenocorticotropina.
- ADN:** Ácido desoxiribonucleico.
- ADP:** Adenosín difosfato.
- AGE:** Ácidos grasos esenciales.
- AMP:** Adenosín monofosfato.
- ANF:** Factor atrial natriurético
- ANOVA:** Análisis de la varianza.
- ARN:** Ácido ribonucleico.
- ATP:** Adenosín trifosfato.
- AVT:** Arginina vasotocina.
- BHT:** 2,6-Di-tert-butil-4-metilfenol.
- C:** Grupo de truchas control.
- CAT:** Catalasa.
- CEC:** Coeficiente de eficacia en el crecimiento.
- Cit. C:** Citocromo C.
- CCMH:** Concentración corpuscular media de hemoglobina.
- CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono.
- CoQ:** Coenzima Q.
- CRH:** Hormona liberadora de corticotropina.
- CS:** Citrato sintasa.
- CT:** Colesterol total.
- CTE:** Cadena de transporte electrónico.
- CV:** Coeficiente de variación.
- DHA:** Ácido docosahexanoico.
- DHAP:** Dihidroxiacetona fosfato.
- DTNB:** 5,5'-Ditio-bis-2-acido nitrobenzoico.
- DTT:** Ditioneitol.
- EA:** Eficacia alimentaria.
- EDTA:** Ácido Etilen diamino tetracético.
- eNOS:** Óxido nítrico sintasa endotelial.
- EPA:** Ácido eicosapentanoico.
- FAD:** Flavín adenín dinucleótido.
- FBPasa:** Fructosa bisfosfatasa.
- FC:** Factor de condición.

**FE:** Energía perdida en heces.

**GAS:** Síndrome de adaptación general.

**GDH:** Glutamato deshidrogenasa.

**GDP:** Guanosín difosfato.

**GE:** Energía bruta del alimento ingerido.

**GH:** Hormona del crecimiento.

**GK:** Glicerol quinasa.

**GOT:** Glutamato/oxalacetato transaminasa.

**GTP:** Guanosín trifosfato.

**G6Pasa:** Glucosa 6-fosfatasa.

**GPasa:** Glucógeno fosforilasa.

**GSasa:** Glucógeno sintetasa.

**G3PDH:** Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa.

**G6PDH:** Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

**GPX:** Glutation peroxidasa.

**GPO:** Glicerol fosfato oxidasa.

**GR:** Glutation reductasa.

**GSH:** Glutation reducido.

**GSSG:** Glutation en su forma oxidada.

**Hb:** Hemoglobina

**HCM:** Hemoglobina corpuscular media.

**HDL:** Lipoproteínas de alta densidad.

**HHI:** Eje hipotálmo-hipófisis-tejido interrenal.

**HK:** Hexoquinasa.

**HO<sub>2</sub><sup>•</sup>:** Radical hidropéroxilo.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno.

**HOAD:** Hidroxiacil Coenzima A deshidrogenasa.

**HOCl:** Ácido hipocloroso.

**HR:** Truchas con alta respuesta de estrés.

**HSP:** Proteínas de choque térmico.

**HUFAs:** Ácidos grasos altamente insaturados.

**ICA:** Índice de conversión del alimento.

**IDH:** Isocitrato deshidrogenasa.

**IGF-1:** Factor de crecimiento insulínico tipo 1.

**IgM:** Inmunoglobulina M.

**IHS:** Índice hepatosomático.

**iNOS:** Óxido nítrico sintasa inducible.

**K<sub>m</sub>:** Constante de Michaelis de una enzima.

**$\alpha$ KG**:  $\alpha$ -cetoglutarato.  
**LDH**: Lactato deshidrogenasa.  
**LDL**: Lipoproteínas de baja densidad.  
**LPL**: Lipoprotein lipasa.  
**LR**: Grupo de truchas con baja respuesta de estrés.  
**MCH**: Hormona concentradora de melanina.  
**MDA**: Malondialdehído.  
**MDH**: Malato deshidrogenasa.  
**ME**: Energía metabolizable.  
**MELN**: Material extractivo libre de nitrógeno.  
**ME<sub>m</sub>**: Energía metabolizable para el mantenimiento.  
**ME<sub>p</sub>**: Energía metabolizable para síntesis.  
**MSH**: Hormona melanotrofina.  
**MUFAs**: Ácidos grasos monoinsaturados.  
**NAD**: Nicotín adenín dinucleótido.  
**NADP**: Nicotín adenín dinucleótido fosfato.  
**NH<sub>3</sub>**: Amoníaco.  
**NO<sup>•</sup>**: Óxido nítrico.  
**NO<sub>2</sub><sup>•-</sup>**: Dióxido de nitrógeno.  
**NOS**: Óxido nítrico sintasa.  
**nNOS**: Óxido nítrico sintasa neuronal.  
**NBT**: Nitro blue tetrazolium.  
**O<sub>2</sub>**: Oxígeno molecular.  
**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>**: Radical superóxido.  
**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>**: Oxígeno singlete.  
**O<sub>3</sub>**: Ozono.  
**OC<sup>-</sup>**: Ión hipoclorito.  
**<sup>•</sup>OH**: Radical hidroxilo.  
**11 $\beta$ -OHA**: 11beta-hidroxyandostenediona.  
**ONOO<sup>•-</sup>**: Peroxinitrito.  
**OAA**: Oxalacetato.  
**PAGE**: Electroforesis en gel de poliacrilamida.  
**PC**: Piruvato carboxilasa.  
**PDH**: Piruvato deshidrogenasa.  
**PEP**: Fosfoenolpiruvato.  
**PEPCK**: Fosfoenol piruvato carboxiquinasa.  
**PFK**: Fosfofructo quinasa.  
**6PG**: 6-Fosfogluconato.

**6PGDH:** 6-Fosfogluconato deshidrogenasa.  
**PGI:** Fosfoglucosa isomerasa.  
**PGM:** Fosfoglucomutasa.  
**PI:** Fosfatidil inositol.  
**PK:** Piruvato quinasa.  
**PO<sub>2</sub>:** Presión de oxígeno.  
**POD:** Peroxidasa.  
**PPV:** Valor productivo de la proteína.  
**PUFAs:** Ácidos grasos poliinsaturados.  
**PVDF:** Polivinil difluoruro.  
**RO<sup>•</sup>:** Radical alcoxilo.  
**RO<sub>2</sub><sup>•</sup>:** Radical peroxilo.  
**ROS:** Especies de oxígeno reactivo.  
**RNS:** Especies de nitrógeno reactivo.  
**SAFAs:** Ácidos grasos saturados.  
**SDS:** Dodecil sulfato sodico.  
**sf / ss:** Sustancia fresca / sustancia seca  
**SOD:** Superóxido dismutasa.  
**T3:** Triyodotironina.  
**T4:** Tiroxina.  
**TAT:** Tirosina aminotransferasa.  
**TBA:** Ácido tiobarbitúrico  
**TCA:** Ácido Tricloroacético.  
**TCI:** Tasa de crecimiento instantáneo.  
**TEMED:** Teramilen-etilen-diamina.  
**TG:** Triglicéridos.  
**TPI:** Triosa fosfato isomerasa.  
**Tris:** Tris(hidroximetil aminometano).  
**UDP:** Uridín difosfato.  
**UE:** Energía perdida en orina.  
**UQ:** Ubiquinona / Coenzima Q.  
**UQH<sub>2</sub>:** Ubiquinol / Coenzima Q reducido.  
**UTP:** Uridín trifosfato.  
**VCM:** Volumen corpuscular medio.  
**VíaPP:** Vía de las pentosas fosfato.  
**VLDL:** Lipoproteínas de muy baja densidad.  
**V<sub>ss</sub> / V<sub>max</sub>:** Velocidad subsaturante / velocidad máxima.  
**XOD:** Xantina oxidasa.

# ÍNDICE

---

|   |    |
|---|----|
| I. OBJETO .....   | 1  |
| II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....                                    | 7  |
| 1. INTRODUCCIÓN .....   | 9  |
| 2. AGENTES ESTRESANTES ASOCIADOS AL CULTIVO INTENSIVO .....         | 11 |
| 2.1. Densidad de peces .....  | 12 |
| 3. ETAPAS DE LA RESPUESTA DE ESTRÉS .....                           | 15 |
| 3.1. Respuesta primaria .....                                       | 18 |
| 3.1.1. <i>Papel de las catecolaminas</i> .....                      | 18 |
| 3.1.2. <i>Papel de los corticoides</i> .....                        | 21 |
| 3.1.3. <i>Interacción entre cortisol y catecolaminas</i> .....      | 30 |
| 3.1.4. <i>Otras respuestas endocrinas asociadas al estrés</i> ..... | 31 |
| 3.2. Respuesta secundaria .....                                     | 32 |
| 3.2.1. <i>Alteraciones fisiológicas y hematológicas</i> .....       | 32 |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 3.2.2.   | <i>Alteraciones metabólicas</i> .....  | 35 |
| 3.2.2.1. | <i>Activación de la glucogenolisis</i> .....   | 35 |
| 3.2.2.2. | <i>Activación del metabolismo central</i> .....  | 37 |
| 3.2.3.   | <i>Factores que pueden modificar la respuesta secundaria de estrés</i> .....                       | 46 |
| 3.3.     | Respuesta terciaria .....  | 49 |
| 3.3.1.   | <i>Crecimiento</i> .....   | 50 |
| 3.3.1.1. | <i>Efecto de la respuesta de estrés sobre las hormonas que controlan el crecimiento</i> .....      | 51 |
| 3.3.1.2. | <i>Efecto de la respuesta de estrés sobre algunos índices nutricionales y de crecimiento</i> ..... | 55 |
| 3.3.1.3. | <i>Establecimiento de jerarquías entre individuos y efectos sobre el crecimiento</i> .....         | 60 |
| 3.3.2.   | <i>Respuesta inmune</i> .....  | 62 |
| 3.3.3.   | <i>Reproducción</i> .....  | 63 |
| 4.       | PAPEL DE LOS HUFAS COMO ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES EN LOS PECES .....                                | 64 |
| 4.1.     | Síntesis y necesidades de HUFAS .....  | 65 |
| 4.2.     | Influencia de la dieta en la composición corporal de ácidos grasos .....                           | 67 |
| 4.3.     | ¿A qué se debe la importancia de los HUFAS? .....  | 69 |
| 4.4.     | Susceptibilidad a la oxidación en los HUFAS .....  | 71 |
| 4.5.     | Patologías y síndromes asociados a la carencia de HUFAS .....                                      | 71 |
| 5.       | IMPORTANCIA DE LAS VITAMINAS E Y C EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LOS PECES .....               | 73 |
| 5.1.     | Vitamina E .....   | 73 |
| 5.2.     | Vitamina C .....   | 75 |
| 6.       | EL ESTRÉS OXIDATIVO .....  | 76 |
| 6.1.     | Aspectos generales .....   | 77 |
| 6.1.1.   | <i>Radicales libres</i> .....  | 77 |
| 6.1.2.   | <i>Metales de transición</i> .....   | 79 |
| 6.1.3.   | <i>Origen de los radicales libres</i> .....  | 80 |
| 6.1.4.   | <i>Defensas antioxidantes</i> .....  | 83 |
| 6.1.4.1. | <i>Moléculas antioxidantes</i> .....   | 83 |
| 6.1.4.2. | <i>Enzimas antioxidantes</i> .....   | 86 |
| 6.1.5.   | <i>Peroxidación lipídica</i> .....   | 91 |
| 6.1.6.   | <i>Daños causados a biomoléculas</i> .....   | 94 |

---

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| 6.1.7. | <i>Sistemas reparadores</i> .....  | 95  |
| 6.2.   | Factores que afectan a la respuesta antioxidante en peces .....  | 95  |
| 6.2.1. | <i>Tasa metabólica y consumo de O<sub>2</sub></i> .....  | 95  |
| 6.2.2. | <i>Influencia de agentes contaminantes</i> .....   | 97  |
| 6.2.3. | <i>Influencia de la composición de la dieta</i> .....  | 99  |
| 7.     | ESTRATEGIAS QUE TIENDEN A PALIAR LOS EFECTOS DE LOS AGENTES ESTRESANTES EN EL CULTIVO INTENSIVO .....                                      | 103 |
| 7.1.   | Selección de razas con una respuesta de estrés atenuada .....  | 103 |
| 7.2.   | Elaboración de dietas suplementadas con HUFAS y vitaminas E y C .....  | 107 |
| III.   | <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....  | 111 |
| 1.     | DISEÑO EXPERIMENTAL .....  | 113 |
| 1.1.   | ENSAYO 1: Efecto de la densidad de peces en truchas arco iris con diferente grado de respuesta de estrés .....                             | 113 |
| 1.2.   | ENSAYO 2: Efecto de la densidad de peces en truchas arco iris con diferente disponibilidad de HUFAs y de vitaminas E y C en la dieta ..... | 114 |
| 2.     | ANIMALES Y MANTENIMIENTO .....   | 117 |
| 2.1.   | Acuario experimental .....   | 118 |
| 3.     | ALIMENTACIÓN .....   | 119 |
| 3.1.   | Dietas experimentales .....  | 119 |
| 4.     | PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....   | 125 |
| 4.1.   | Control de peso e ingesta .....  | 125 |
| 4.2.   | Toma de muestras .....   | 126 |
| 4.2.1. | <i>Análisis de composición</i> .....   | 126 |
| 4.2.2. | <i>Preparaciones histológicas</i> .....  | 126 |
| 4.2.3. | <i>Toma de muestras de sangre</i> .....  | 127 |
| 4.2.4. | <i>Toma de muestras de tejidos</i> .....   | 128 |
| 5.     | MÉTODOS ANALÍTICOS .....   | 129 |
| 5.1.   | Composición .....  | 129 |
| 5.1.1. | <i>Humedad</i> .....   | 129 |
| 5.1.2. | <i>Cenizas</i> .....   | 129 |



|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 5.1.3.  | <i>Lípidos</i>  | 129 |
| 5.1.4.  | <i>Proteína</i>   | 130 |
| 5.1.5.  | <i>MELN</i>   | 130 |
| 5.2.    | Tratamiento histológico de las muestras   | 130 |
| 5.3.    | Determinación de la composición de ácidos grasos  | 131 |
| 5.4.    | Parámetros hematológicos  | 132 |
| 5.4.1.  | <i>Hematocrito</i>  | 132 |
| 5.4.2.  | <i>Hemoglobina</i>  | 132 |
| 5.4.3.  | <i>Recuento de glóbulos rojos</i>   | 133 |
| 5.4.4.  | <i>Índices hematológicos</i>  | 133 |
| 5.5.    | Determinación de los niveles cortisol plasmático  | 134 |
| 5.6.    | Determinación de la glucosa plasmática  | 134 |
| 5.7.    | Determinación del glucógeno tisular   | 135 |
| 5.8.    | Cuantificación de proteínas solubles  | 136 |
| 5.9.    | Determinación de lípidos plasmáticos  | 138 |
| 5.9.1.  | <i>Lípidos totales</i>  | 138 |
| 5.9.2.  | <i>Triglicéridos</i>  | 138 |
| 5.9.3.  | <i>Colesterol total</i>   | 139 |
| 5.9.4.  | <i>Colesterol HDL y LDL</i>   | 139 |
| 5.10.   | Determinación de la actividad de enzimas pertenecientes al Metabolismo intermediario                          | 140 |
| 5.10.1. | <i>Fosfofructoquinasa (PFK)</i>   | 140 |
| 5.10.2. | <i>Piruvato quinasa (PK)</i>  | 142 |
| 5.10.3. | <i>Fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa)</i>   | 143 |
| 5.10.4. | <i>Alanina aminotransferasa (AAT)</i>   | 145 |
| 5.10.5. | <i>Glucosa 6-P deshidrogenasa (G6PDH)</i>   | 147 |
| 5.10.6. | <i>Cálculo de actividades enzimáticas</i>   | 148 |
| 5.11.   | Determinación de la actividad de enzimas asociadas al Metabolismo de especies de oxígeno y nitrógeno reactivo | 149 |
| 5.11.1. | <i>Catalasa (CAT)</i>   | 149 |
| 5.11.2. | <i>Glutation peroxidasa (GPX)</i>   | 150 |
| 5.11.3. | <i>Glutation reductasa (GR)</i>   | 152 |
| 5.11.4. | <i>Superóxido dismutasa (SOD)</i>   | 153 |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 5.11.5     | <i>Niveles de peroxidación lipídica</i>   | 158        |
| 5.11.6     | <i>Detección inmunoelectroforética de proteínas asociadas a la enzima Óxido nítrico sintasa (NOS)</i> | 160        |
| 5.12.      | Índices biológicos  | 161        |
| 5.12.1.    | <i>Crecimiento y eficacia alimentaria</i>   | 161        |
| 5.12.2.    | <i>Utilización de la proteína</i>   | 161        |
| 5.12.3.    | <i>Índices biométricos</i>  | 163        |
| 5.13.      | Tratamiento estadístico   | 163        |
| <b>IV.</b> | <b>RESULTADOS</b>   | <b>165</b> |
| 1.         | ENSAYO 1  | 167        |
| 1.1.       | Crecimiento, ingesta e índices nutricionales  | 167        |
| 1.2.       | Longitud e índices biométricos  | 170        |
| 1.3.       | Composición corporal  | 172        |
| 1.4.       | Parámetros hematológicos  | 174        |
| 1.5.       | Glucosa plasmática y glucógeno hepático   | 175        |
| 1.6.       | Metabolismo intermediario   | 176        |
| 2.         | ENSAYO 2  | 178        |
| 2.1.       | Crecimiento, ingesta, índices nutricionales y mortalidad  | 178        |
| 2.2.       | Longitud e índices biométricos  | 181        |
| 2.3.       | Dispersión de peso  | 183        |
| 2.4.       | Composición corporal  | 186        |
| 2.5.       | Porcentaje de lípidos y ácidos grasos en hígado y músculo   | 188        |
| 2.6.       | Alteraciones y lesiones macroscópicas   | 197        |
| 2.7.       | Estudio histológico de hígado y branquias   | 199        |
|            | 2.7.1. <i>Hígado</i>  | 199        |
|            | 2.7.2. <i>Branquias</i>   | 203        |
| 2.8.       | Parámetros hematológicos  | 205        |
| 2.9.       | Parámetros plasmáticos y glucógeno tisular  | 210        |
| 2.10.      | Lípidos plasmáticos   | 215        |

|             |  |            |
|-------------|--|------------|
| 2.11.       | Metabolismo de especies de oxígeno reactivo (ROS) .....  | 220        |
| 2.11.1.     | <i>Actividad de enzimas antioxidantes y niveles de MDA</i> .....   | 220        |
| 2.11.2.     | <i>Formas isoenzimáticas de la SOD en geles de poliacrilamida</i> .....  | 237        |
| 2.12.       | Metabolismo de especies de nitrógeno reactivo (RNS) .....  | 241        |
| <b>V.</b>   | <b>DISCUSIÓN</b> .....   | <b>243</b> |
| 1.          | ENSAYO 1 .....   | 245        |
| 1.1.        | Efecto sobre el crecimiento y la utilización nutritiva de la dieta .....   | 245        |
| 1.2.        | Efecto sobre determinados parámetros hematológicos y el metabolismo intermediario .....                                    | 250        |
| 2.          | ENSAYO 2 .....   | 257        |
| 2.1.        | Efecto sobre el crecimiento y la utilización nutritiva de la dieta.....  | 257        |
| 2.2.        | Estudio histológico sobre el efecto de las diferentes dietas experimentales en hígado y branquias de trucha arco iris..... | 269        |
| 2.3.        | Efecto sobre parámetros e índices hematológicos.....   | 273        |
| 2.4.        | Efecto sobre determinados parámetros plasmáticos y glucógeno tisular.....  | 281        |
| 2.5.        | Efecto sobre el metabolismo de especies de oxígeno reactivo.....   | 289        |
| 2.6.        | Influencia sobre la actividad iNOS en hígado.....  | 308        |
| <b>VI.</b>  | <b>CONCLUSIONES</b> .....  | <b>313</b> |
| <b>VII.</b> | <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | <b>317</b> |

**I.- OBJETO**



Existe un interés creciente por el bienestar de los animales de granja. Grupos de presión a favor del bienestar de los animales han sugerido que muchas de las prácticas actuales comprometen dicho bienestar. Anticipándose al creciente interés público por el tema, el Consejo Europeo viene dando recomendaciones específicas para la protección de los peces cultivados, reconociendo la importancia de la producción ética, entre otras razones, para que el consumidor perciba un producto de calidad. En un reciente informe elevado al Consejo Europeo se subraya la densidad de las poblaciones cultivadas como un asunto prioritario y se recomienda una legislación adecuada que las limite para asegurar un adecuado bienestar de los animales.

El concepto de bienestar es de difícil definición pero, en términos generales, se refiere a la calidad de vida, el estado físico y mental del animal con relación a su ambiente. Una legislación adecuada debería evitar el sufrimiento y la mala adaptación a las condiciones de producción. Es un hecho admitido que los peces pueden experimentar una respuesta de estrés y que, independientemente de que lleguen o no a un estado de sufrimiento, el estado de bienestar puede ser detectado por alteraciones más o menos sensibles del funcionamiento normal del organismo. La dificultad está en establecer la escala entre un estado de bienestar pobre y óptimo, entre aceptable e inaceptable, y obrar en consecuencia.

El estrés es un componente ambiental inevitable en la producción piscícola. Esto es así, fundamentalmente, porque las prácticas habituales de piscifactoría están, de necesidad, en compromiso con las exigencias económicas de la producción a gran escala. En las actividades de cultivo los peces están repetidamente expuestos a situaciones de estrés agudo (manejo, transporte, tratamientos profilácticos, etc.) y, en muchos casos, a un estrés crónico o continuado que es fruto de las altas densidades de producción. Esta situación, habitual en las piscifactorías, por exigencias de tipo económico, da lugar a toda una serie de situaciones interrelacionadas que agudizan y mantienen las condiciones estresantes. Entre ellas, se podrían citar la disminución de la calidad del agua y disponibilidad de oxígeno (solucionada en muchos casos por el suministro externo), la competencia por el alimento, el establecimiento de jerarquías de dominancia y sumisión, la mayor incidencia y posibilidad de transmisión de patologías,

etc. Las condiciones de un cultivo son especialmente inadecuadas para peces que son territoriales o solitarios en condiciones naturales, como algunos salmónidos, en los que las interacciones agonísticas pueden ser particularmente estresantes.

La respuesta fisiológica de los peces a un estímulo de estrés es adaptativa e inespecífica, básicamente neuroendocrina, que pondrá en marcha una cascada de acontecimientos fisiológicos y metabólicos necesarios para hacer frente a la situación adversa. Cuando los peces están expuestos a un desafío crónicamente repetido, la respuesta de estrés deja de ser adaptativa para transformarse en maladaptativa. En tales circunstancias extremas, los mecanismos de respuesta, forzados al límite, se traducen en efectos negativos sobre el crecimiento, reproducción, respuesta inmune, calidad del músculo como producto final de consumo, etc. En términos generales, se podría decir que la domesticación entendida, de acuerdo con Price (1984), como “ *el proceso por el cual una población de animales se adapta a la cautividad impuesta por los humanos, gracias a la combinación de la selección de cambios genéticos a lo largo de generaciones y el desarrollo de adaptaciones inducidas por el ambiente que se repiten en cada generación*”, no ha avanzado tanto con los peces cultivados como con otras especies ganaderas.

Como indicador de una situación de estrés agudo se emplea habitualmente el nivel plasmático de cortisol; sin embargo, en condiciones de estrés crónico, como las que puedan darse en determinadas circunstancias de cultivo, puede llegar a producirse una adaptación al estrés en la que el número de receptores para la hormona, y no las concentraciones plasmáticas de cortisol, sea el mecanismo íntimo que subyace en la respuesta de estrés. En este sentido, pruebas realizadas por la doctoranda en el Centre for Ecology and Hydrology del Reino Unido parecen indicar que, a largo plazo, la modificación del número de receptores, más que los niveles de cortisol, forma parte de la respuesta adaptativa de la trucha al estrés crónico, al menos cuando los individuos parentales han sido seleccionados por su alta o baja respuesta al estrés agudo en función de los niveles plasmáticos de cortisol.

De entre los aspectos que, en último término, pueden verse más afectados por una situación crónica de estrés, el crecimiento es el más relevante, al menos desde el punto de vista práctico. El estrés inhibe el crecimiento al ejercer efectos metabólicos concretos (aumento del consumo de oxígeno para obtención de energía, aumento de la glucemia por movilización del glucógeno y activación de la gluconeogénesis, aumento de las disponibilidades de aminoácidos libres por inhibición de la síntesis de proteínas y/o activación de su catabolismo, aumento de la actividad transaminásica, etc.) y afectar los mecanismos endocrinos que regulan el crecimiento. El mayor consumo de oxígeno tiende a generar mayor cantidad de especies derivadas del oxígeno, muy reactivas, que desembocan en una situación de estrés oxidativo que se sumaría a los efectos generales de la respuesta de estrés.

Ya que el estrés es un componente ambiental inevitable en los cultivos a gran escala con alta densidad de peces, se planteó un proyecto coordinado, del que formamos parte con otros grupos europeos (FAIR nº CT95-0152), con el objetivo de investigar la posibilidad de que la capacidad de respuesta a situaciones estresantes de carácter crónico tenga un componente genético seleccionable. En este sentido, parte de este trabajo tiene por objeto investigar esta posibilidad. La obtención de líneas parentales con diferente respuesta al estrés podría dar lugar a generaciones en las que la mayor tolerancia de los peces, por disminución de los efectos indeseables del estrés crónico, supondría una ventaja respecto a los de menor tolerancia que daría lugar, en último término, a una mejora cualitativa de resultados en las explotaciones acuícolas.

Otra vía alternativa de actuación, dirigida a reducir las consecuencias negativas de una situación de estrés crónico, surge de la existencia de pruebas experimentales que sustentan la posibilidad de que algunos nutrientes actúen mejorando la respuesta de los peces a determinados agentes estresantes habituales en acuicultura. Este es el caso de los HUFA n-3 y de las vitaminas C y E que aumentan la resistencia a determinadas enfermedades y mejoran la tolerancia a determinadas situaciones de estrés como la hipoxia. Por otra parte, la vitamina E es el principal antioxidante liposoluble de las membranas celulares, protegiendo de la oxidación a los lípidos de membrana. Los tejidos de los peces tienen altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados que



## ***I.- Objeto***

---

son vulnerables a la peroxidación lipídica, como mecanismo antioxidante la vitamina E parece interaccionar sinérgicamente con la vitamina C.

La selección de un carácter heredable de baja respuesta al estrés y la potenciación de la capacidad antioxidante de la dieta, como líneas de actuación para aliviar las consecuencias del estrés crónico por alta densidad de peces, han sido los objetivos fundamentales que justifican la realización de este trabajo.

## II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



## **1. INTRODUCCIÓN**

Uno de los principales objetivos de los estudios de crecimiento y desarrollo en cultivo de peces es la búsqueda de aquellas situaciones que favorezcan una mejora en las condiciones de cría, encaminadas a la obtención de una producción óptima y una mejor calidad del producto.

Actualmente, podemos considerar que existen dos tipos de cultivo:

### **Cultivo extensivo**

En él, las condiciones de mantenimiento de los animales son similares a las naturales. El agua es el medio que les provee de organismos que les sirven de alimento, es el espacio físico en donde viven, y es la fuente de oxígeno atmosférico disuelto. Además, es donde se van a diluir o absorber los residuos tóxicos. El hecho de que todas estas funciones estén atribuidas a un mismo medio hace que se limite el número de individuos que pueden permanecer en esas condiciones.

### **Cultivo intensivo**

La necesidad de obtener una mayor producción, en un espacio y tiempo limitados, da lugar a este tipo de cultivo, que se caracteriza por un aumento de la densidad de peces en el medio. Esto supone un aporte de nutrientes adicional, en forma de dieta, así como una aireación suplementaria y una mayor absorción y acumulación de tóxicos en el agua. Así, por ejemplo, en el caso de la carpa (*Cyprinus carpio*), se ha conseguido pasar de cultivos extensivos de 200 Kg/Ha a  $2 \times 10^6$  Kg/ Ha.

Este tipo de cultivo trae consigo una serie de **ventajas**: el agua sólo actúa como espacio de vida, el aporte de comida es controlable e incluso se puede automatizar, se establece un flujo de renovación de agua que aporta oxígeno y elimina residuos, el espacio

físico requerido se reduce y, en general, existe un mayor control sobre el cultivo y sus condiciones.

Por otro lado, existen una serie de **inconvenientes**: un incremento en los costes de mantenimiento, una influencia más acusada de las condiciones de cultivo sobre los resultados finales en cuanto a producción y calidad, una mayor incidencia y propagación de enfermedades y una necesidad de evitar o minimizar todas aquellas alteraciones fisiológicas asociadas a altas densidades de cultivo.

Es bien sabido (García-Rejón y Morales, 1989b; Pickering, 1992; Wendelaar-Bonga, 1997) que, en la práctica de la acuicultura existen una serie de factores relacionados con las condiciones de mantenimiento que pueden afectar negativamente a la producción. Los peces, al igual que el resto de los seres vivos, poseen mecanismos para hacer frente a condiciones adversas, produciéndose respuestas encaminadas a contrarrestar los efectos negativos derivados de aquellas. Por tanto, podríamos definir como **agente estresante** a todo aquel que genera una respuesta en el pez, encaminada a mantener la homeostasis frente a un estímulo externo que causa una alteración en su equilibrio interno. En algunos casos este propósito se consigue, pero otras veces, las condiciones adversas superan la capacidad de respuesta del pez, lo que puede repercutir en el desarrollo del animal. Por tanto, los límites que determinan si un animal se encuentra en estado de estrés son algo amplios, ya que debemos considerar que una cosa es la respuesta dirigida al restablecimiento del equilibrio y otra son los efectos negativos ocasionados en el pez cuando el equilibrio no se alcanza. En ambos casos hay una respuesta, pero las consecuencias son muy diferentes.

La gravedad de los efectos de la respuesta de estrés va a depender de la intensidad con que actúe el agente estresante, así como del tiempo de actuación y permanencia de éste. Esto último es lo que nos permite hacer una distinción entre **estrés agudo y crónico**, pudiendo desembocar este último en una adaptación del organismo, pero con el inconveniente de tener que destinar, de manera prolongada, parte de los recursos energéticos a hacer frente a una determinada situación adversa.

Por último, el impacto del agente estresante no sólo va a depender de su intensidad y duración sino también del estado (nutricional, de desarrollo, etc.) en que se encuentre el animal (Wedemeyer, 1996, Wendelaar-Bonga, 1997). Este aspecto es de gran importancia ya que, en determinadas situaciones de estrés, podría generarse un desequilibrio de los sistemas antioxidantes, conduciendo, en algunos casos, a una situación de estrés oxidativo (Tort *et al.*, 1996) que estaría muy influenciada por la composición de la dieta (Jackson, 1994). Todo esto, unido a una posible existencia de un componente genético en la capacidad de respuesta del pez para enfrentarse a situaciones adversas (Fevolden *et al.*, 2002; Pottinger y Carrick, 1999b), trae consigo la aparición de líneas de investigación encaminadas a la búsqueda de estrategias que eviten o minimicen aquellos factores que puedan afectar a la producción y calidad de los peces.

## **2. AGENTES ESTRESANTES ASOCIADOS AL CULTIVO INTENSIVO**

El hecho de que estos animales se encuentren en un medio acuático va a ser un condicionante básico a la hora de determinar aquellos factores que pueden repercutir negativamente en su desarrollo.

Básicamente, podríamos clasificar aquellos factores que pueden generar una respuesta de estrés en tres grupos:

### **Cambios ambientales**

En general, todos aquellos que se refieren al estado y calidad del agua del cultivo: temperatura, turbidez, salinidad, concentración de oxígeno, pH, presencia de compuestos tóxicos (cuyos títulos pueden variar según las condiciones físicas y químicas del agua) y compuestos químicos (teniendo en cuenta que sus límites nocivos pueden variar según el tipo, tamaño y estado del pez).

### **Interacciones animales**

Predación, parásitos, competencia por el espacio, comida o pareja sexual. Se ha comprobado que, al compartir un mismo espacio varios peces, al inicio existen comportamientos realmente agresivos en la búsqueda de la dominancia del territorio, hasta que se establecen las jerarquías; después, las interacciones sociales suelen ser menos intensas, los conflictos suelen ser menores y existe una relación relativamente estable entre dominante y dominado. Como consecuencia de esto, se ha observado una disminución de crecimiento en los peces dominados que puede ser la consecuencia de un aumento del gasto calórico al estar sometidos a estrés crónico, un menor acceso a la comida o una anorexia provocada por el estado de estrés (Wedemeyer, 1997).

### **Interacciones humanas**

Entre ellas, destacan las propias de la práctica en acuicultura (manipulación, transporte, densidad de cultivo, tratamientos preventivos, etc.).

## **2.1. DENSIDAD DE PECES**

Si tenemos en cuenta que el sistema actual de producción en acuicultura es el cultivo intensivo, estaremos situando la **densidad de peces** como uno de los agentes causantes de estrés crónico que pueden influir, de manera importante, en la producción.

En el cultivo intensivo existe una tendencia dirigida a conseguir una mayor producción en el menor espacio y tiempo posibles, pero la moneda que habrá que pagar a cambio (Wedemeyer, 1997) es una "flujo-dependencia" en estos medios de cultivo con el fin de mantener un buen nivel de renovación del agua donde se encuentran los animales. La biomasa que un flujo de agua determinado puede soportar va a estar limitada por la actividad metabólica de los peces, que determinará el consumo de oxígeno y la producción de desechos. Un flujo apropiado impedirá que la concentración de oxígeno descienda

hasta niveles mortales y que los productos de deshecho excretados aumenten hasta títulos tóxicos. Con relación a esto, Westers (1984) propone un índice (R), que refleja el recambio de agua producido en una hora (volumen/tiempo). Se ha comprobado que si este índice presenta valores altos, se puede mantener una densidad de cultivo alta cubriéndose las necesidades de oxígeno y dilución de metabolitos.

Un segundo factor a tener en cuenta sería la falta de espacio necesario para un buen desarrollo de los individuos. Es bien sabido el establecimiento de relaciones de dominancia entre individuos cuando existen limitaciones en cuanto a espacio y disponibilidad de alimento. A este respecto es interesante destacar el problema de erosión de las aletas, así como el aumento de la probabilidad de contagio horizontal de patógenos, al haber mayor posibilidad de contacto entre los animales.

A todo esto hay que añadir la necesidad de un aporte externo de nutrientes para poder mantener una carga elevada de peces, con lo que se deben tener en cuenta los posibles restos de dieta no consumidos que pueden actuar también como contaminantes, produciéndose un descenso del oxígeno y un aumento de dióxido de carbono y amonio como consecuencia de su descomposición.

Por otro lado, también existen diferencias interespecíficas en cuanto a las necesidades de oxígeno, habiéndose encontrado que son mayores en trucha arco iris que en otras especies como el salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*) o Atlántico (*Salmo salar*) o; sin embargo, se ha encontrado que las primeras presentan mayor capacidad de resistencia a situaciones de alta densidad. Esto puede deberse a que existe cierto grado de domesticación adquirido que hace que la trucha se vea menos afectada por los factores comportamentales, así como una mayor tolerancia fisiológica a las condiciones de altas densidades de cultivo. No obstante, es interesante destacar el resultado obtenido en experimentos con trucha arco iris, donde la suplementación de oxígeno, hasta condiciones hiperóxicas, daba lugar a unos efectos estresantes similares a los producidos por la hipoxia (Caldwell y Hinshaw, 1994).



En resumen, podríamos entender el efecto negativo de la densidad de cultivo, asociado a la acuicultura intensiva, desde dos puntos de vista:

Desde un punto de vista **metabólico**: el hecho de tener que hacer frente a un mayor consumo de oxígeno, eliminación de excretas (CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>) así como de aquellos restos de dieta administrada no consumidos, hace que sea necesario un incremento en la capacidad de renovación del agua en la que se encuentran los animales. En este caso las unidades de expresión más correctas para este parámetro serían peso/ flujo.

Desde un punto de vista **comportamental**: en donde se tiene en cuenta la idea del espacio y los efectos del establecimiento de jerarquías así como de las competencias provocadas por un exceso de individuos. En este caso las unidades serían peso/ unidad de volumen.

Desde ambas perspectivas, destacaríamos como principal causa de estrés la primera, estando el establecimiento de jerarquías en un segundo plano (Wedemeyer, 1997).

Una actuación dirigida a controlar aquellos factores que puedan resultar determinantes a la hora de interferir en la buena marcha del cultivo, podría contribuir a una mejora en los resultados. A este respecto, es bien sabido el papel de la densidad de cultivo como principal agente estresante asociado a la acuicultura (Wedemeyer, 1996).

Para poder desarrollar una línea de investigación efectiva (Pickering, 1992) es fundamental conocer las distintas etapas que se producen en la respuesta de estrés, ya que ésta va a suponer una movilización integrada a diferentes niveles del organismo. De esta forma, podrían llegar a establecerse aquellos puntos clave para poner de manifiesto el estado de estrés y que permitan modificar o reconducir sus consecuencias, con el fin de mejorar los resultados de producción del cultivo.

### 3. ETAPAS DE LA RESPUESTA DE ESTRÉS

El concepto de estrés es muy amplio, ya que abarcaría un estado concreto en los seres vivos, encaminado a hacer frente a situaciones adversas (García-Rejón y Morales, 1989a; Pickering, 1992; Wedemeyer, 1996). Por esto, parece lógico pensar que, utilizando un enfoque darwiniano, se pueda entender como un proceso de selección natural con fines evolutivos. Siguiendo esta idea, sólo permanecerían aquellos individuos con una mayor capacidad de respuesta a alteraciones externas.

Los efectos de los agentes estresantes se pueden clasificar como **directos**, caracterizados por variaciones a nivel hormonal, fisiológico, metabólico y celular, generándose, como consecuencia de éstos, unos efectos **indirectos** que afectarían a la población o comunidad de la especie, alterando las relaciones tróficas del sistema. Así, podemos entender que el estrés viene dado como una respuesta **adaptativa** (capacidad para poder responder a situaciones adversas) y una respuesta **maladaptativa**, cuando los mecanismos se fuerzan más allá de sus límites en detrimento de la salud (Barton e Iwama, 1991). Como ya se comentó previamente, cuando el agente estresante actúa durante un corto período de tiempo (minutos, horas) estaremos hablando de **estrés agudo**. Por el contrario, si el agente actúa durante varias horas, días e incluso semanas hablaremos de **estrés crónico** (Pickering, 1992). A este respecto, se podría establecer una relación directa entre la duración del agente estresante y el paso de una respuesta adaptativa a maladaptativa (Pickering, 1989; Pickering y Pottinger, 1989).

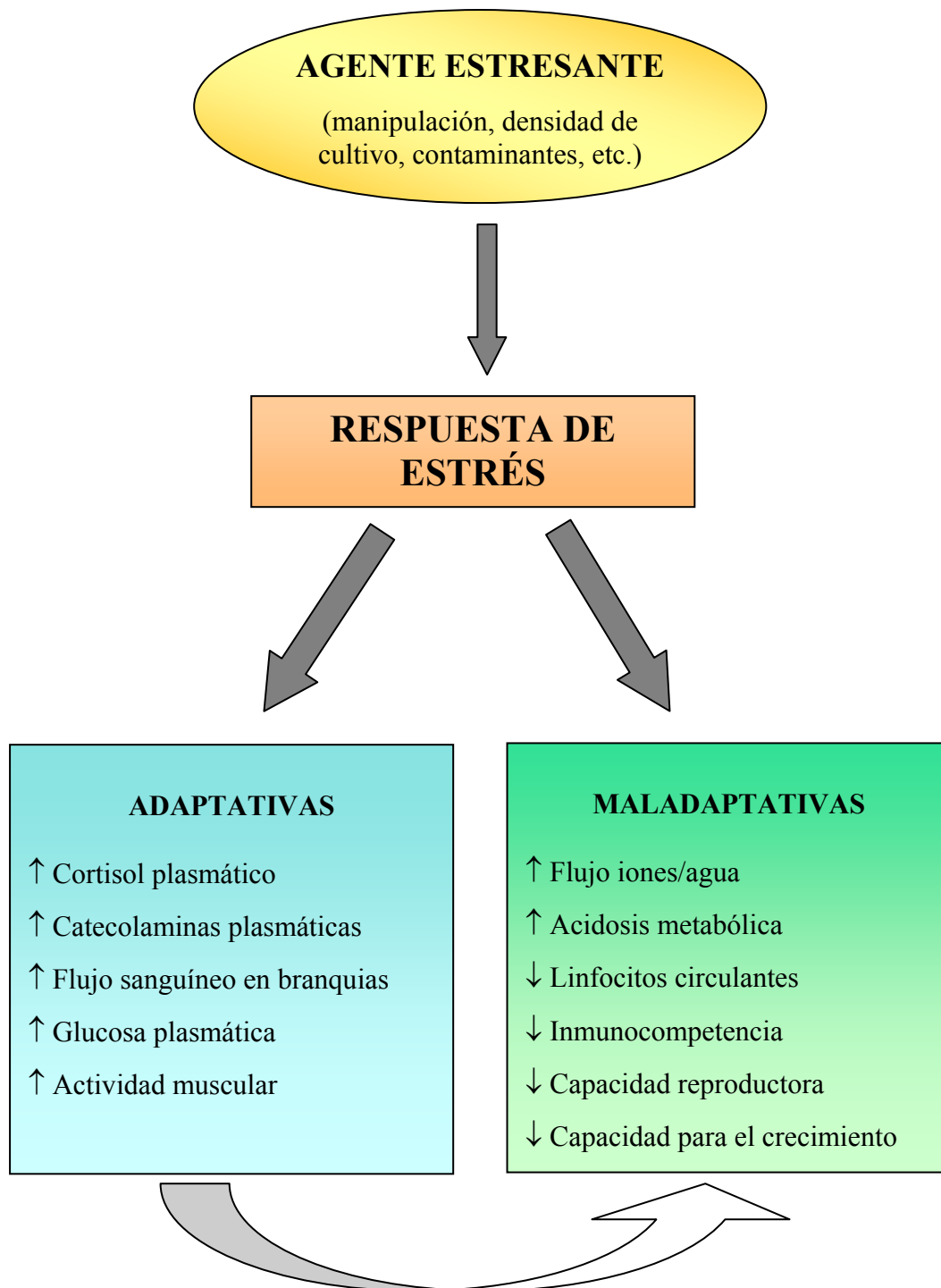


Figura II.1.- Efectos generales de la respuesta de estrés (Barton e Iwama, 1991)

De una forma más esquemática, Selye (1973) define el estado de estrés como una respuesta inespecífica dividida en tres fases: primero hay una señal de **alarma**, como un efecto inicial al estímulo, que se sigue de un estado de **respuesta**, en el que el organismo intenta mantener el equilibrio interno, llegándose, por último, al estado de **exhaustividad**, si la respuesta no es del todo eficiente y el organismo es incapaz de hacer frente al agente estresante, pudiendo desembocar en alguna patología e incluso la muerte. A estas tres fases, que se van a dar de forma general, como respuesta ante una alteración externa, Selye las definió como GAS o Síndrome de Adaptación General.

Wedemeyer (1996) concreta la fase de respuesta en tres niveles de actuación:

- **Respuesta primaria:** En la que se producen una serie de cambios endocrinos, como consecuencia de la actuación de los centros cerebrales, que culminará en la liberación masiva de catecolaminas y corticoides, hormonas asociadas a la respuesta de estrés.

- **Respuesta secundaria:** En donde se dan los cambios producidos como consecuencia de la liberación hormonal. Estos cambios ocurren a nivel fisiológico, metabólico y tisular, incluyendo, entre otros efectos, un aumento del ritmo cardíaco, una movilización de los substratos energéticos y alteraciones del equilibrio hidromineral.

- **Respuesta terciaria:** Se produce como consecuencia de las dos respuestas anteriores, dando lugar a una disminución en el crecimiento y la resistencia a enfermedades, así como alteraciones en la capacidad reproductora. También se verá afectada la capacidad para hacer frente a otras situaciones estresantes adicionales (Wedemeyer, 1996; Wendelaar-Bonga, 1997).

- Por último, podemos considerar una **respuesta cuaternaria**, si ampliamos el nivel de afectación hasta estratos superiores. La alteración de una población de peces puede afectar negativamente al ecosistema, mediante una alteración del flujo energético en la cadena trófica del ecosistema donde se encuentre esa población.

### 3.1. RESPUESTA PRIMARIA

En la respuesta ante un agente estresante, los cambios producidos a nivel neuroendocrino van a ser imprescindibles para que se pueda llevar a cabo la cascada de acontecimientos fisiológicos y metabólicos, encaminada a proporcionar los substratos energéticos necesarios para hacer frente a las situaciones adversas (van der Boon, 1991; Pickering, 1992, 1993a; Wendelaar-Bonga, 1997).

La reacción generalizada y común, en situaciones de estrés, viene dada por una liberación de catecolaminas y corticoides, de tal forma que el incremento de estas hormonas generalmente se asocia a estados de estrés en el animal. Autores como Munck (1984) explican esta secreción de corticoides como un medio de protección del pez frente a sus propios mecanismos de defensa, contrarrestándolos.

#### 3.1.1. Papel de las catecolaminas

La primera respuesta y la más rápida es la de *catecolaminas*: adrenalina, nor-adrenalina y dopamina, aunque esta última en menor grado. Su liberación se asocia a situaciones de estrés agudo severo y que está relacionada con alteraciones de tipo respiratorio como:

- **Hipoxia**: Parece ser que el desencadenante de la liberación hormonal se debe a valores críticos de  $PO_2$ , asociados a un descenso en la saturación de la hemoglobina (Hb)- $O_2$ .
- **Acidosis**: Un incremento de la tasa respiratoria va a generar un aumento de  $CO_2$  que produce una bajada del pH plasmático dando lugar a una disminución de la afinidad de la Hb- $O_2$  (efecto Root-Bohr).

- **Ejercicio exhaustivo y manipulación:** Se produce un incremento de las necesidades de oxígeno y, tras el ejercicio, el lactato producido por un aumento del metabolismo anaerobio contribuye a la bajada del pH.
- **Aumento de T<sup>a</sup>:** Da lugar a una disminución del contenido de oxígeno del agua, también se produce un incremento en la tasa metabólica del animal así como un engrosamiento del epitelio de las branquias que dificulta el intercambio gaseoso (Reid *et. al*, 1998).

**Para tener en cuenta la acción de las catecolaminas se establecen dos vías de estudio:**

1) Una vía **AFERENTE**, en la que se estudian las rutas y procesos de secreción de las hormonas.

A este respecto, se puede establecer que la secreción de catecolaminas en teleósteos se realiza en el tejido cromafín, cuyas células se encuentran principalmente dispersas o formando grupos en las paredes de la vena cardinal posterior, así como en la parte anterior o cabeza del riñón asociadas al tejido linfoide (Hathaway y Epple, 1989; Pickering, 1993a; Reid *et. al*, 1994). Las hormonas se encuentran almacenadas en una serie de gránulos celulares que presentan diferencias de densidad en función del tipo de hormona almacenada (Reid *et al.* 1998).

El tejido cromafín se encuentra innervado por fibras nerviosas simpáticas preganglionares. Por medio de neurotransmisores de los centros nerviosos se activa el eje simpático-tejido cromafín. La secreción de estas hormonas es rápida, ya que existe una reserva en este tejido con el fin de permitir que la respuesta sea inmediata, aunque se ha visto que los niveles de hormona en estos tejidos no decrecen, lo que parece indicar una síntesis hormonal para compensar la cantidad liberada (Reid *et al.*, 1994). Esta secreción se asocia a una activación de fibras colinérgicas, que se traducirá en una activación de la maquinaria enzimática de síntesis, así como de la secreción hormonal. En cuanto a esto

último, parece que los receptores adrenérgicos nicotínicos del tejido cromafín juegan un papel realmente importante, ya que se generará una apertura de los canales de calcio de membrana produciéndose un incremento de su concentración celular, que desembocará en la secreción de catecolaminas (Furimsky *et al.*, 1997).

Por otro lado, se ha puesto de manifiesto la existencia de otras vías de activación no colinérgicas, realizándose experimentos en los que se observó que cuando las fibras que inervan el tejido cromafín se seccionaban, no se evitaba totalmente la secreción de catecolaminas (Perry *et al.*, 1991). Esta activación no colinérgica puede estar mediada por agentes no humorales ( $\uparrow K^+$ ,  $\uparrow$  acidosis,  $\downarrow$  oxígeno) los cuales, en algunos casos, también pueden estar implicados en la activación colinérgica, o bien por agentes humorales (Reid *et al.*, 1998; Perry y Bernier, 1999), entre los que se encuentran:

- **Serotonina**, cuya presencia se ha detectado en el tejido cromafín.
- **Angiotensina II**, para la cual existen receptores en las células del tejido cromafín.
- **Péptidos natriuréticos, opiáceos, etc.**, en determinadas especies se han encontrado asociados al tejido cromafín.
- **ACTH**, hormona asociada a situaciones de estrés de la que también se han encontrado receptores en el tejido cromafín.
- **Cortisol**, generalmente su activación es colinérgica aunque también hay indicios de que puede sensibilizar al tejido cromafín frente a determinados activadores de secreción no colinérgicos.
- **Catecolaminas**, en algunas especies se ha encontrado un efecto activador de su propia secreción.

Los niveles de catecolaminas en reposo se pueden conocer mediante muestras sanguíneas de peces canulados y, generalmente, son inferiores a 5 nM. Ante un **estrés agudo** se produce un rápido aumento de los niveles de estas hormonas, que pueden llegar a alcanzar títulos superiores 100 nM en un plazo de 1-3 minutos, aunque estos elevados niveles desaparecen rápidamente, lo que pone de manifiesto el poco tiempo de actuación de las catecolaminas. Si el **estrés es crónico**, los niveles de catecolaminas pueden mantenerse durante horas e incluso días. Una forma de compensar los altos niveles de catecolaminas en sangre es mediante la modulación de sus receptores en las células diana. También se ha observado una disminución de la capacidad de respuesta del tejido cromafín (síntesis de catecolaminas) a estimulaciones colinérgicas, después de un prolongado estrés físico (Reid *et al.*, 1994; Wendelaar-Bonga, 1997).

2) Con respecto a la actuación de la vía **EFERENTE**, en líneas generales (este aspecto se tratará de forma más amplia en la respuesta secundaria al estrés), se puede concretar que la secreción de catecolaminas trae asociada una serie de efectos:

- Mayor aporte de oxígeno mediante un aumento de la presión sanguínea y ritmo cardíaco y, especialmente en las branquias, una mayor vascularización asociada a un aumento de la superficie de intercambio gaseoso. También se produce una mejora de la capacidad de transporte de oxígeno en sangre, incrementando los niveles plasmáticos de glóbulos rojos y la afinidad Hb-O<sub>2</sub>.

-Activación de rutas glucogenolíticas, gluconeogénicas, así como de movilización lipídica, con fines energéticos (Perry y Reid, 1993; Pickering, 1993a).

### **3.1.2. Papel de los corticoides**

Se ha comprobado que hay una relación más o menos clara entre la respuesta de estrés y el aumento de los niveles de cortisol plasmático (Pickering 1992, 1993a; Sumpter, 1997; Ruane y Komen, 2003) observándose, incluso, una relación cuantitativa entre la intensidad del estímulo y el grado de aumento de cortisol (Flos *et al.*, 1988; Spotte y



Anderson, 1989; Foo y Lamb, 1993b; Vazzana *et al.*, 2002). Por otro lado, diversos autores han puesto de manifiesto casos en los que una situación de estrés no está asociada a un aumento de esta hormona; Vijayan *et al.* (1990) no observaron ningún efecto de una alta densidad de cultivo, durante 30 días, sobre los niveles de cortisol plasmático. Ocurre algo similar al administrar determinados niveles estresantes de Cd (Schreck y Lorz, 1978), pesticidas como endrinas (Grant y Mehrle, 1973), o ante infecciones por ciertos parásitos sanguíneos (Laydley *et al.*, 1988). A este respecto Ruane y Komen (2003) proponen que la medida de cortisol en el agua donde se encuentran los animales puede ser de gran utilidad a la hora de evaluar la respuesta de estrés a altas densidades de cultivo. Esto podría explicar situaciones de estrés en las que no se observa un incremento de cortisol debido a que parte de este podría haber sido excretado vía branquias, heces u orina al medio acuático.

Por otro lado, existen otros corticoesteroides como la cortisona, con una velocidad de incremento en situaciones de estrés superior al cortisol (Pottinger y Moran, 1993), alcanzándose títulos de 100-200 ng/ml en plazos de 10-20 minutos.

**Al igual que se observó para las catecolaminas, en la acción de los corticoides se establecen dos vías de estudio:**

1) Vía **AFERENTE**

La secreción de cortisol es más lenta que la de las catecolaminas ya que, a diferencia de éstas, no se encuentra almacenado y su síntesis tiene que ir precedida de una cascada hormonal que desembocará en su secreción.

La liberación del cortisol está mediada por la activación del eje hipotálamo-hipófisis-tejido interrenal (HHI) (Pickering 1992, 1993a). Este tejido se encuentra distribuido a lo largo del riñón de una forma difusa, sin formar ningún órgano determinado. El eje HHI en salmónidos se activa en respuesta a la mayoría de agentes estresantes (contaminantes, acidificantes, hipoxia, cambios de salinidad, interacción social, predación, manipulación en acuicultura). De hecho, ya en larvas de algunos teleósteos, se observó un

incremento de los niveles de cortisol tras la eclosión, lo que sugiere una activación del eje HHI en estadios de desarrollo muy tempranos (Sampath-Kumar *et al.* 1997). Asimismo, en doradas (*Sparus aurata*), se ha puesto de manifiesto una activación de este eje en situaciones de alta densidad de cultivo (Rotllant *et al.*, 2000).

La secuencia parte de una serie de neurotransmisores cerebrales que promueven la liberación de la CRH (hormona liberadora de corticotropina) por parte de las neuronas que se encuentran en la zona del hipotálamo. Este neuropéptido es transportado por los axones desde el hipotálamo a la hipófisis anterior, donde se encargará de activar la producción de ACTH (hormona adrenocorticotrópica), de la que claramente se sabe que es la responsable de la síntesis y liberación de cortisol en el tejido interrenal (van der Boon *et al.*, 1991; Sumpter, 1997; Belanger *et al.*, 2001). La relación entre el estrés y la activación del eje HHI se puso de manifiesto tras observar que tres minutos de estrés agudo daban lugar a una rápida liberación de ACTH, alcanzándose un pico en los niveles plasmáticos de esta hormona en tan solo cinco minutos (Sumpter *et al.*, 1986). Si el estrés persiste, estos niveles de ACTH pueden disminuir a títulos basales (Balm y Pottinguer, 1995), como mecanismo regulador, para evitar una elevación de los niveles del cortisol, mediante una bajada de actividad de las células hipofisarias productoras de ACTH.

Los niveles basales de cortisol pueden variar dentro de unos límites (en función de la época, estado de maduración, etc.), y se considera que en un pez no estresado deben de ser inferiores a 5 ng/ml, pudiendo alcanzar valores de hasta 200 ng/ml en salmónidos sometidos a situaciones de estrés crónico (Pickering y Pottinguer, 1989). En el caso del **estrés agudo**, por manipulación, confinamiento a corto plazo, etc., los niveles de cortisol se pueden elevar por unas pocas horas; sin embargo, cuando la trucha se somete a un **estrés crónico** o estrés agudo repetido, la elevación de los niveles de cortisol puede permanecer durante días o incluso semanas, sufriendo después un descenso a títulos basales, posiblemente debido a mecanismos de aclimatación (Pickering y Pottinger, 1989). Esto explicaría los resultados obtenidos en experimentos en los que se demuestra que la respuesta en la secreción de cortisol depende de la intensidad y duración del estímulo. Si es agudo se produce un aumento rápido que se estabiliza a las pocas horas y si es crónico el

incremento se mantiene más tiempo aunque no de una forma tan acusada (Pottinger *et al.*, 1995; Tort *et al.* 1996).

## 2) Vía **EFERENTE**

Los efectos derivados de la liberación de cortisol van a ir encaminados a producir una serie de cambios fisiológicos y metabólicos con el fin de combatir aquellos desequilibrios producidos en el animal ante una situación de estrés. Básicamente (se explicará de forma más detallada en la respuesta secundaria), su acción será complementaria a la de las catecolaminas, dando lugar a una serie de variaciones hematológicas con el fin de favorecer un mayor aporte de oxígeno, así como a cambios metabólicos encaminados a movilizar metabolitos que cubran un incremento de las necesidades energéticas asociado a situaciones de estrés (Barton e Iwama, 1991). Como ya veremos más adelante, un efecto continuado del cortisol a estos niveles, puede desembocar, a largo plazo, en una serie de problemas asociados al crecimiento, resistencia a enfermedades y calidad en la reproducción de los animales.

***La regulación de los efectos del cortisol se puede realizar sobre cuatro puntos de actuación:***

### *1) En el HHI*

Se ha comprobado que, en el eje HHI, existen una serie de hormonas que van a intervenir en la secreción del cortisol regulando la acción de la CRH y de la ACTH.

La **urotensina I** presenta una estructura similar a la de la CRH, comprobándose que estimula la secreción de ACTH en la hipófisis (Tran *et al.*, 1990). La producción de **AVT** (arginina vasotocina) a la altura del hipotálamo, se asoció en un principio al estrés ocasionado por cambios de aguas dulces a aguas marinas, pero hoy en día se considera que forma parte de la respuesta generalizada de estrés, activando la secreción de ACTH (Sumpter, 1997; Gilchrist *et al.*, 2000). También parece existir cierta relación entre la

**vasopresina** y la estimulación de la producción de ACTH (Fryer y Lederis, 1986). Quizás, como se ha demostrado en mamíferos, la secreción conjunta de vasopresina y CRH ejerza un efecto sinérgico en la estimulación de ACTH en los peces (Sumpter, 1997).

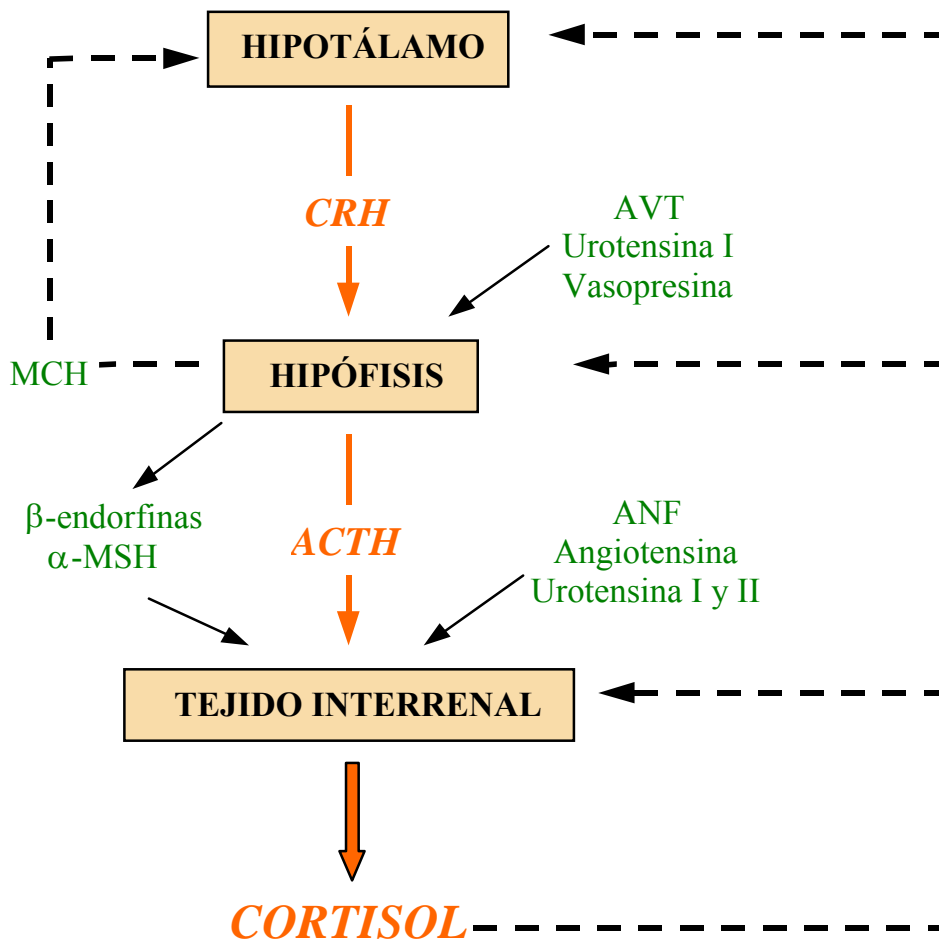


Figura II.2.- El eje hipotálamo-hipófisis-interrenal y su interacción con otras hormonas. Las flechas continuas indican una acción estimuladora mientras que las líneas discontinuas acción inhibitoria (Sumpter, 1997).

Por otro lado, la hipófisis, además de ACTH, secreta **β-endorfinas** y **α-MSH** (melanotrofinas), que también potencian la síntesis de cortisol en el tejido interrenal actuando, asimismo, de forma sinérgica con la ACTH (Balm *et al.*, 1995). Experimentos de estrés crónico por confinamiento en dorada han reflejado un incremento rápido de α-MSH

asociado a un aumento gradual de  $\beta$ -endorfinas (Arends *et al.*, 1999). También, recientes estudios han puesto de manifiesto un descenso de las reservas hipofisarias de ACTH,  $\beta$ -endorfinas y  $\alpha$ -MSH tras estrés por manipulación y confinamiento (Rotllant, *et al.*, 2001).

La **angiotensina**, **urotensina I y II**, y **ANF** (factor atrial natriurético) actuarían activando el tejido interrenal para aumentar la producción de cortisol (Wendelaar- Bonga, 1997). En cuanto a la regulación de la **MCH** (hormona concentradora de melanina), secretada por la hipófisis, parece que tiene un papel depresor sobre el eje HHI, inhibiendo la síntesis de CRH y ACTH además de  $\alpha$ -MSH (Green *et al.*, 1992; Sumpter 1997). Green y Baker (1991) realizaron experimentos en los que tras situaciones de estrés por manipulación se producía un incremento en los niveles de MCH, lo que apoyaría la idea del efecto modulador de esta hormona sobre el eje HHI. Por último, se ha observado que el propio cortisol ejerce un efecto inhibitor de su secreción a nivel del hipotálamo, hipófisis y tejido interrenal (Sumpter, 1997).

## *2) Regulación de los niveles plasmáticos de cortisol*

La persistencia de la actuación del agente estresante hace necesarios una serie de mecanismos de adaptación que eviten títulos tan altos de cortisol durante períodos de tiempo prolongados.

Existen diversos experimentos, en los que se induce un estrés crónico por alta densidad de cultivo, que reflejan un descenso de los niveles de cortisol plasmático aún en permanencia de las condiciones estresantes (Pickering y Stewart, 1984; Vijayan y Leatherland, 1990; Vazzana *et al.*, 2002). Así, Pickering y Pottinger (1987) observaron una aclimatación en los niveles de cortisol que, en el caso de la trucha común, se alcanzaba a los seis días, y en la trucha arco iris a los diez días. Asimismo, en experimentos con truchas (Pottinger *et al.*, 1995), ciprínidos (Pottinger *et al.*, 2000) y doradas (Arends *et al.*, 1999) sometidas a estrés crónico por confinamiento, se produce un aumento de los niveles plasmáticos de cortisol que a las pocas horas se estabiliza. Situaciones de estrés agudo repetido pueden también dar lugar a una aclimatación en la secreción de cortisol. Así, en

experimentos en los que el factor estresante era una disminución del volumen del tanque se observaron unos máximos de cortisol que volvían a valores iniciales en un plazo de 24 horas. Cuando se repetía dicha situación de estrés agudo cada cierto tiempo, llegaba un momento en que el incremento de cortisol se veía disminuido, alcanzando unos picos menores a los anteriores y con un período de recuperación más corto (Einarsdóttir y Nilssen, 1996).

Esta respuesta generalizada podría deberse a una atrofia o aclimatación del tejido interrenal, ocasionado por una inhibición en la liberación de las hormonas que promueven su secreción en este tejido (Barton *et al.*, 1987; Barton e Iwama, 1991; Rotllant *et al.*, 2000). De esta manera, se observa que situaciones mantenidas de alta densidad de cultivo hacen que el animal estresado sea incapaz de responder a factores estresantes adicionales. Esto se pone de manifiesto con la administración *in vitro* de ACTH en células interrenales, observándose una activación de la secreción de cortisol más patente en las células de aquellos animales sometidos a baja densidad de cultivo. Parece ser que en los otros animales el tejido interrenal se inactiva o es incapaz de responder a factores estresantes adicionales (Vijayan y Leatherland, 1990). Barton *et al.* (1987) demostraron una atrofia del tejido interrenal debido a la ausencia de estimulación por ACTH, inhibida por la administración continuada de cortisol. Por otro lado, Pickering y Stewart (1984) discuten el descenso de cortisol proponiendo un posible incremento en la tasa de degradación de esta hormona como mecanismo adaptativo. Asimismo, Vijayan y Leatherland (1990) encontraron un incremento de la captación hepática de cortisol con fines degradativos.

Otro recurso que se ha observado en embriones de salmónidos es la habilidad que presentan para inactivar o detoxificar el cortisol, con el fin de protegerse de los efectos adversos de esta potente hormona, desviando los productos de su catabolismo a la síntesis de otros compuestos como 11 $\beta$ -OHA (11beta-hidroxyandostenediona) (Khan *et al.*, 1997).

No sólo la etapa de desarrollo sino también el grado de maduración sexual va a influir en la capacidad de regulación de la síntesis de cortisol. Así, se ha visto que tras someter a truchas maduras e inmaduras a un período de confinamiento de 24 horas, los peces inmaduros presentaban picos de cortisol mayores. Parece ser que en los animales

maduros existe un mayor control de la secreción de cortisol, modulada por el hipotálamo/hipófisis, que se refleja en títulos más bajos de ACTH (Pottinguer *et al.*, 1995).

### 3) *Sensibilidad de tejidos diana*

La aclimatación al estrés crónico no sólo implica la reducción de los niveles de cortisol sino que también actúa sobre la capacidad de respuesta de los tejidos diana (Pickering, 1992). La activación del eje hipófisis-interrenal da lugar a importantes cambios en la naturaleza de los receptores de las células diana del cortisol. Los receptores no son estructuras estáticas, incluso muchos de sus parámetros, como afinidad, localización y turnover, pueden verse alterados (Sumpter, 1997). Parece ser que la presencia de la hormona puede actuar modificando algunos de estos parámetros e incluso en el proceso de transcripción del gen que codifica el receptor.

Se ha puesto de manifiesto que el estrés crónico provoca un descenso significativo en la afinidad de los receptores de cortisol en salmónidos (Maule y Schreck, 1991; Trenzado *et al.*, 2003). Pottinger (1990) demostró un descenso del 40% en la capacidad de unión del cortisol a receptores citosólicos hepáticos, tras 96 horas de confinamiento con respecto a peces control. Posteriores experimentos (Pottinger *et al.*, 1994a) han puesto de manifiesto que el estrés crónico por confinamiento durante 14 días da lugar a un decremento del 60% en el número de receptores celulares hepáticos del cortisol. A esto hay que sumar un aparente descenso en la afinidad de dichos receptores por el cortisol. De esta manera, se consigue una disminución en la sensibilidad de las células diana frente al cortisol, con lo que se compensa el efecto continuado de la hormona en situaciones de estrés crónico. Según Pottinger *et al.* (2000), los elevados niveles de cortisol, presentes en ciertos ciprínidos (*Leuciscus cephalus*) en situaciones de reposo (50-100 ng/ml) y estrés crónico o agudo (1500 ng/ml), con respecto a los datos existentes en salmónidos como la trucha arco iris, revelaron que mientras la abundancia de receptores era similar en ambas especies, la afinidad era ocho veces inferior en el caso del ciprínido, lo que supone, en esta especie, una estrategia de alta resistencia a la acción de los corticoides.

#### 4) Proteínas reguladoras

En el caso del cortisol se ha comprobado la existencia de mecanismos que evitan el efecto prolongado de esta hormona. Así, parte del cortisol secretado por el tejido interrenal se une de forma reversible a proteínas sanguíneas biológicamente inertes, de manera que se produce la inactivación de éste. Entre estas proteínas podríamos destacar la **transcortina** (glucoproteína) y, en el caso de que ésta se encuentre saturada, la **albúmina**. La cantidad de cortisol unido formando complejos es de un 30-55% de los niveles presentes. Este tipo de unión tiene también una función protectora que evita la metabolización e inactivación de esta hormona en el hígado (van der Boon *et al.*, 1991).

También se ha puesto de manifiesto, en situaciones de respuesta de estrés, la presencia de una serie de proteínas que, aunque no regulan directamente los efectos del cortisol, tienen como finalidad la protección y la restauración del tejido dañado así como el proporcionar a las células una mayor capacidad de defensa frente a los agentes estresantes. Entre estas proteínas se encuentran las **metalotioneínas**, que constituirían puntos de unión para quelar metales tóxicos. Tort *et al.* (1996) comprobaron, en trucha arco iris, que exposiciones a cadmio provocaban un aumento de los niveles de cortisol que iba asociado a un aumento de los niveles de metalotioneína. Dang *et al.* (2000) también observaron el efecto del cobre sobre el incremento de metalotioneínas en el epitelio branquial de trucha arco iris. Las **ubiquitinas** tendrían un papel mediador en la proteólisis no lisosomal de células estresadas. Se han encontrado efectos estimuladores del cortisol sobre la secreción de ubiquitinas así como de metalotioneínas en respuesta al estrés por confinamiento (Wendelaar-Bonga, 1997). Las **HSP** (proteínas de choque térmico), producidas ante cambios bruscos de T<sup>a</sup>, tendrían una función de reparación y degradación de proteínas alteradas o desnaturalizadas bajo situaciones de estrés (Basu *et al.*, 2002). La presencia de HSP también se ha asociado a otros tipos de estrés, como situaciones de dominancia entre especies (Kagawa *et al.*, 1999). Con relación al cortisol, Basu *et al.* (2001) encontraron que, en situaciones de estrés físico asociado a incrementos de temperatura, esta hormona tenía un efecto supresor en la expresión de las HSP, observándose, en cambio, un incremento de éstas tras la liberación de catecolaminas (Basu *et al.*, 2002). Recientes



estudios (Basu *et al.*, 2003) han puesto de manifiesto el papel de estas proteínas incrementando la funcionalidad de los receptores de glucocorticoides, mediante su unión a estos, con el fin de asegurar una mayor eficacia en la respuesta de estrés mediada por el cortisol.

El hecho de que las HSP se asocien a una respuesta de estrés no implica necesariamente que su presencia sea indicativa de que el animal se encuentre estresado, ya que puede ocurrir que simplemente sea un mecanismo de defensa a nivel tisular o celular sin que el factor adverso alcance títulos tan altos como para promover una respuesta integrada frente al estrés (Wendelaar-Bonga, 1997).

### **3.1.3. Interacción entre cortisol y catecolaminas**

La tendencia actual, en el estudio de la activación endocrina asociada a la respuesta de estrés, ha sido la de separar las dos vías que dan lugar a la síntesis de corticoides y catecolaminas, estudiándose de forma paralela. Esto puede llevar a pensar, de manera errónea, que ambas hormonas actúan por separado, sin conexión. La poca información que se tiene al respecto sugiere un importante grado de interacción entre ambas hormonas.

Se ha visto que la liberación de catecolaminas da lugar a una activación del eje HHI en los receptores adrenérgicos en células del hipotálamo y de la hipófisis, que podría estar asociada, como ocurre en mamíferos, al aumento de CRH y ACTH (Sumpter, 1997), pero también se ha observado el efecto recíproco. Se sabe que el nivel de actuación de las catecolaminas es mediante  $\alpha$  y  $\beta$ -adrenoreceptores con una serie de reacciones en cascada en la célula diana de catecolaminas en las que estaría implicado el AMP cíclico y el ión calcio entre otros (Fabri *et al.* 1998). Parece ser que el aumento de los niveles de cortisol, asociado al estrés crónico, va a dar lugar a una síntesis de  $\beta$ -adrenoreceptores en el citoplasma de las células diana (como los glóbulos rojos y hepatocitos) por medio de un aumento en su transcripción génica, y que dichos receptores, en situaciones de estrés agudo, pasarán a la superficie celular con el fin de incrementar la actividad de las catecolaminas. Por tanto, la elevación crónica del cortisol va a influir en la efectividad de la acción de las catecolaminas ante una situación de estrés agudo (Reid y Perry, 1991; Perry

*et al.*, 1993). Por otro lado, Dugan y Moon (1998) observaron que elevaciones crónicas de cortisol no daban lugar a alteraciones en los receptores adrenérgicos de células hepáticas. Sin embargo, según Jönsson *et al.* (1983), un incremento de cortisol tras situaciones de estrés también podría ejercer su acción acelerando la tasa de síntesis de catecolaminas. De esta manera, la acción conjunta de ambas hormonas iría encaminada a potenciar la respuesta de estrés con el fin de hacer frente al agente estresante en el menor tiempo posible y, de este modo, evitar las consecuencias negativas de un tiempo de actuación prolongado del mismo (Sumpter, 1997).

### 3.1.4. Otras respuestas endocrinas asociadas al estrés

La respuesta endocrina va a estar interconectada con otra serie de hormonas que también pueden verse afectadas por una situación de estrés.

En el capítulo destinado a los efectos del estrés y del cortisol sobre el crecimiento (3.3.1.1), veremos su relación y consecuencias sobre determinadas hormonas que intervienen en la regulación de la síntesis tisular, como la **hormona del crecimiento (GH)**, **las hormonas tiroideas y los esteroides**.

Otras hormonas de la hipófisis que también están implicadas en la respuesta integrada de estrés son:

**La prolactina** está asociada a la regulación de la permeabilidad del tegumento y relacionada con el control osmótico. En general, parece que sí existe una correlación entre los niveles de prolactina y los efectos del estrés, ya que se ha comprobado que, en situaciones de estrés agudo, el incremento de cortisol va unido a un aumento de prolactina (Wendelaar-Bonga. 1997), aunque hay casos de estrés por confinamiento en los que no se encontraron cambios en los niveles de esta hormona (Wendelaar-Bonga, 1997), observándose, incluso, una disminución en situaciones de estrés crónico (Rand-Weaver *et al.* 1993).

**La somatolactina** es otra hormona de la hipófisis de la que se ha comprobado que hay un rápido incremento de su concentración plasmática en respuesta al estrés (Sumpter, 1997). El papel de la somatolactina podría estar relacionado con la maduración gonadal y la puesta, la regulación hidromineral y con procesos de movilización energética, lo que explicaría su intervención en situaciones de estrés (Wendelaar-Bonga, 1997). Experimentos de estrés a corto plazo muestran un patrón de comportamiento similar al del cortisol (se alcanzan picos de 1-2 horas con bajadas a las 2-3 horas) aunque algo más retardado y con otro pico máximo a las 24 horas. Esta elevación relativamente rápida de somatolactina hace pensar que existe una estimulación a nivel hipotalámico de esta hormona con intervención de la CRH (Rand-Weaver *et al.* 1993). Por otro lado, parece ser que hay una inervación directa del hipotálamo a las células que la secretan (Olivereau y Olivereau, 1988, 1990).

### 3.2. RESPUESTA SECUNDARIA

Como consecuencia de la secreción de estas hormonas se van a producir una serie de alteraciones fisiológicas que van a desembocar en cambios hematológicos, metabólicos, hidrominerales e incluso estructurales.

#### 3.2.1. Alteraciones fisiológicas y hematológicas

En un principio, la liberación de catecolaminas se considera una respuesta compensatoria tendente a optimizar las funciones cardiovasculares y respiratorias frente a una situación estresante (ya se comentó que su secreción se asocia a situaciones de estrés respiratorio). Esto se consigue mediante una serie de cambios fisiológicos destinados a favorecer un mayor aporte de oxígeno, entre los que se encuentra un incremento de la vascularización periférica, especialmente en branquias, un aumento en las superficies de intercambio gaseoso, una mayor capacidad de transporte de oxígeno en sangre (mediante una elevación del hematocrito o de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno), e incluso un aumento de la presión sanguínea (Perry y Bernier, 1999) asociado a un mayor ritmo y capacidad cardiaca (Farrell *et al.*, 1992; Fabbri *et al.*, 1998).

No obstante, parece que existen ciertas excepciones a este respecto, ya que se dan casos de estrés moderado en los que no se produce una variación de los niveles de catecolaminas pero sí un incremento de ventilación, que no se acentúa con la administración posterior de catecolaminas. Además, parece que la adrenalina presenta cierta dificultad de permeabilidad para atravesar la barrera que limita su punto de actuación en el sistema nervioso central (centro regulador de la respiración) y aunque la noradrenalina sí sea permeable hay casos en que también presenta ciertas dificultades (Perry y Bernier, 1999). Esto explicaría experimentos en los que, tras estrés agudo, un aumento del ritmo cardíaco y de la presión de la aorta ventral no se asoció a variaciones en los niveles de catecolaminas plasmáticas, sino a una activación del sistema nervioso simpático (Davison *et al.*, 1995).

Se ha demostrado una acción de la adrenalina sobre el equilibrio iónico de los glóbulos rojos en trucha y otras especies, favoreciendo una entrada de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  a la célula y una salida de  $\text{H}^+$  (intercambiándose estos dos últimos mediante un sistema antiporte), con el fin de evitar un descenso del pH interno, que disminuiría la afinidad de la Hb por el oxígeno (Vermette y Perry, 1988; Motais *et al.*, 1992; Perry y Reid, 1993). El aumento de iones en los glóbulos rojos produciría un incremento del volumen celular que explicaría valores de hematocrito altos asociados a un descenso en la CCMH (concentración corpuscular media de hemoglobina) (Bourne, 1986).

Este incremento en el volumen celular podría estar relacionado con una mayor deformabilidad de las membranas de los glóbulos rojos que determinaría un descenso en la viscosidad en la sangre (Nikinmaa, 1990; Sadler *et al.*, 2000). De hecho, se ha demostrado una posible acción de las catecolaminas sobre los receptores de membrana de glóbulos rojos, aumentando en estos su deformabilidad y provocando este descenso de la viscosidad sanguínea, lo que facilitaría el flujo sanguíneo en períodos de esfuerzo (Pankhurst, 1992).

Por otra parte, simulaciones de cambios estacionales, mediante alteraciones de la temperatura, luz y oxígeno del medio que puedan resultar estresantes, producen un descenso en la proporción de eritrocitos maduros frente a los juveniles. Houston *et al.*

(1996a, b) explican estos efectos basándose en que la hemoglobina de las células inmaduras presenta una mayor afinidad por el oxígeno, condición que disminuiría con la edad celular. Así, Lecklin *et al.* (2000) pusieron de manifiesto la influencia del grado de madurez de los glóbulos rojos sobre su capacidad de respuesta a las catecolaminas encontrando que, en células inmaduras, los fenómenos de regulación del pH celular eran más efectivos. De hecho, se sabe que existe un efecto de la edad en la disminución del volumen celular, con un consecuente aumento de la viscosidad interna y disminución en el grado de deformabilidad, inversamente relacionado con la viscosidad sanguínea (Nikinmaa, 1990).

Se ha puesto de manifiesto la intervención del cortisol para facilitar un mayor aporte de oxígeno (Morgan e Iwama, 1996). Existen estudios en los que un estrés crónico asociado a una alta densidad de cultivo provocaba una elevación del hematocrito y la hemoglobina como consecuencia del aumento de los niveles de cortisol (Mazur e Iwama, 1993; Montero *et al.*, 1999). También se ha observado un aumento del hematocrito en lubina estriada (*Morone saxatilis*) sometida a ejercicio moderado y exhaustivo (Young y Cech, 1993, 1994), en salmones sometidos a transporte (Iversen *et al.*, 1998), así como en situaciones de estrés agudo por manipulación y confinamiento en trucha (Biron y Benfey, 1994; Benfey y Biron, 2000) y otras especies (Davison *et al.*, 1995; Lappivaara, 2001). El aumento de hematocrito podría estar asociado a una reducción del volumen plasmático o hemoconcentración (Barton *et al.*, 1987; Young y Cech, 1993), o bien a una mayor producción de glóbulos rojos (Caldwell y Hinshaw, 1994), que implicaría, en ambos casos, un aumento de la hemoglobina (Benfey y Biron, 2000).

En contraposición a lo descrito anteriormente, experimentos de estrés por confinamiento en pintarroja (*Scyliorhinus canícula*) dieron lugar a un descenso significativo en valores de hematocrito, hemoglobina, HCM, CCM y recuento de glóbulos rojos (Torres *et al.*, 1986). Valores altos de hematocrito pueden provocar mayor viscosidad sanguínea, lo que aumentaría el gasto de flujo y circulación. A este respecto Houston *et al.* (1996a), explican el descenso de hematocrito en truchas sometidas a situaciones de hipoxia y altas temperaturas, como un mecanismo compensatorio para minimizar estos costes circulatorios. Por otro lado, es bien sabido que, como consecuencia de la respuesta de

estrés, se producen una serie de alteraciones en el contenido iónico de la sangre; esto podría explicar un descenso en hematocrito y hemoglobina, posiblemente debido a una hemodilución producida en respuesta a un incremento de la osmolaridad plasmática (Diouf *et al.*, 2000).

### **3.2.2. Alteraciones metabólicas**

El aumento de las demandas energéticas, asociado a la respuesta de estrés, se manifiesta con una serie de alteraciones en el metabolismo destinadas a favorecer una mayor disponibilidad de sustratos que pueden ser utilizados como fuente de energía en diversos tejidos. Así, existen numerosos trabajos en los que se asocia un efecto hiperglucemiante a la respuesta de estrés. Un aumento inicial de los niveles de glucosa a partir de glucógeno trae consigo una posterior utilización de ésta por activación de las vías glucolíticas, así como el mantenimiento la glucemia en sangre, en el que podrían implicarse determinados metabolitos con un papel gluconeogénico (van der Boon, *et al.*, 1991).

#### ***3.2.2.1. Activación de la glucogenolisis***

Se ha demostrado que, entre los mecanismos hiperglucemiantes, las catecolaminas secretadas, en una primera respuesta de estrés, van a ejercer su acción sobre las reservas de glucógeno como fuente de energía inmediata (Janssens y Waterman, 1988; Ottolenghi *et al.*, 1989; Vijayan *et al.*, 1997; Fabbri *et al.*, 1998).

Por otro lado, la persistencia de los niveles elevados de glucosa, tras una respuesta inicial a las catecolaminas, estaría asociada al cortisol (Vijayan *et al.*, 1992 y 1994; Benfey y Biron, 2000; Diouf *et al.*, 2000). Leach y Taylor (1980) realizaron experimentos en los que se puso de manifiesto que el cortisol actuaba manteniendo altos los niveles de glucosa plasmática tras la actuación de catecolaminas ya que, tras utilizar un inhibidor del cortisol, la respuesta hiperglucemiante que se producía era transitoria. En general, se ha demostrado que existe una correlación positiva entre los niveles de glucemia y el incremento de cortisol plasmático administrado de forma exógena (Foster y Moon, 1986; Vijayan *et al.*, 1996) o producido como respuesta a diferentes agentes estresantes como simulación de

transporte a altas densidades de animales (Staurnes et al., 1994), cambio de salinidad en el medio (Soengas et al., 1993a; Morgan e Iwama, 1996; Diouf et al., 2000), efecto de bajas temperaturas (Diouf et al., 2000), altas densidades de cultivo (Vazzana et al., 2002), manipulación (Biron y Benfey, 1994; Papoutsoglou et al., 1999) y confinamiento (Swift, 1983). Por otro lado, White y Fletcher (1986) no obtuvieron resultados tan claros al provocar estrés en platijas (*Pleuronectes platessa*) mediante agitación aérea debido a que, posiblemente, esta especie, en situaciones de estrés moderado, presente una respuesta hiperglucemiante retardada con respecto al incremento hormonal. Vijayan et al. (1990) observaron en salmónidos como el salvelino (*Salvelinus fontinalis*) que, tras un estrés crónico inducido por altas densidades de cultivo, se producía un descenso en los niveles de glucosa plasmática, debido posiblemente a su alta utilización como combustible energético, el cual podría enmascarar el efecto hiperglucemiante asociado al estrés. Asimismo, recientes experimentos en carpa reflejaron una buena capacidad de adaptación de esta especie a altas densidades de cultivo, al no manifestar variaciones en los niveles de glucosa plasmática, a pesar de observarse un incremento inicial de cortisol que se restableció al poco tiempo (Ruane y Komen, 2003).

Diversos estudios revelan la degradación del glucógeno como efecto responsable de una hiperglucemia a corto plazo (Bourne et al., 1986; Soengas et al., 1995; De Boek et al., 2001). De esta manera, se ha observado un descenso en los niveles de glucógeno, como consecuencia de la alta densidad de cultivo (Vijayan et al., 1990; Skjervold et al., 1999, 2001), manipulación (Reubush y Heath, 1996) y cambios en la salinidad del medio (De Boeck, 2000), asociado a un incremento de la actividad **GPasa** (Glucógeno fosforilasa) y un descenso de la **GSasa** (Glucógeno sintetasa) (Soengas et al., 1993a, b; Fabbri et al., 1998; Lappivaara, 2001).

Experimentos con cultivos celulares de hepatocitos revelan una intervención de las catecolaminas y glucagón en la activación de la glucogenólisis (Janssens y Waterman, 1988; Ottolenghi, 1989; Moon et al., 1999), encontrando un posible efecto indirecto del cortisol al modificar los receptores de los hepatocitos para las catecolaminas (Vijayan et al., 1993a). También se ha demostrado una intervención de las hormonas tiroideas, en

combinación con el cortisol, asociada a un descenso de glucógeno hepático y un aumento de la actividad GPasa (Soengas *et al.*, 1992). Además, experimentos de aclimatación a bajas temperaturas pusieron de manifiesto una relación inversa entre las reservas de glucógeno y los niveles de cortisol producidos durante el proceso adaptativo (Paxton *et al.*, 1984), observándose también que elevaciones crónicas de cortisol daban lugar a descenso de los niveles de glucógeno hepático (Barton *et al.*, 1987; Andersen *et al.*, 1991).

En contraposición, experimentos de simulación de transporte a alta carga en bacalao (*Gadus morhua*) no reflejaron descensos en los niveles de glucógeno hepático y muscular, lo que demostraría la alta capacidad de resistencia de esta especie frente a situaciones de estrés (Staurnes *et al.*, 1994). En el caso del glucógeno hepático esto podría deberse a una alteración en la sensibilidad de los hepatocitos frente a determinadas hormonas (catecolaminas y cortisol) con la finalidad de mantener las reservas de glucógeno mediante la intervención de la insulina, la cual favorecería su deposición (Vijayan *et al.*, 1993a, b, 1994).

### 3.2.2.2. Alteraciones en el metabolismo central

Cuando la situación de estrés persiste o se hace crónica, el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre, como medio para hacer llegar suficiente combustible a los tejidos que dependen de ésta, va a estar condicionado, en gran parte, a la activación de los procesos gluconeogénicos.

Como es bien sabido, existen una serie de moléculas precursoras de la síntesis de glucosa entre las que se encuentran los aminoácidos, el glicerol (procedente de la degradación de triglicéridos) y una serie de sustratos del metabolismo intermediario, como lactato, piruvato e intermediarios del ciclo de Krebs (Lehninger, 1986).

**La gluconeogénesis y la glucolisis** tienen muchas reacciones en común catalizadas por la misma enzima que transcurren en un sentido u otro según el caso. Por otra parte, existen otras reacciones que se encuentran catalizadas por dos enzimas diferentes y que no son reversibles. Este aparente despilfarro de energía se justifica debido al alto coste



energético que supondría, en determinados puntos, una reacción catalizada por la misma enzima en sentido inverso y, por otro lado, la necesidad de una regulación independiente de los procesos degradativos y biosintéticos, que se llevaría a cabo en estas enzimas (Lehninger, 1986). Esto explica la existencia de reacciones catalizadas por enzimas propiamente glucolíticas y propiamente gluconeogénicas (Rawn, 1989). Así, una forma de poner de manifiesto los efectos del estrés sobre el metabolismo, sería el estudio de aquellas enzimas clave y con función reguladora implicadas en la síntesis de la glucosa, así como de aquellas relacionadas con el aprovechamiento de su energía (glucolisis).

Se ha demostrado, en diversos experimentos con salmónidos, que existe una clara activación de los procesos gluconeogénicos reflejada en un aumento en la actividad de la enzima **FBPasa** (fructosa 1,6-bisfosfatasa) en diferentes situaciones de estrés: adaptación a cambios de salinidad (Soengas *et al.*, 1993a), administración continuada de cortisol exógeno (Vijayan *et al.*, 1991), estrés por manipulación (Morales *et al.*, 1990), alta densidad de cultivo (Vijayan *et al.*, 1990) y períodos relacionados con la migración (Shitaka, 1998). En algunos casos, paralelamente a este aumento de la actividad FBPasa, se observó un descenso de la actividad **PFK** (fosfofructoquinasa) que cataliza la reacción inversa, aunque inesperadamente asociado a un descenso en la glucosa plasmática (Vijayan *et al.*, 1991). Por otro lado, Sugita *et al.*, (2000) observaron que, en hígado de carpas sometidas a ejercicio se producía un aumento de la actividad **G6Pasa** (Glucosa 6 fosfatasa) y FBPasa, dando lugar a una hiperglucemia con el fin de hacer llegar suficiente combustible al músculo, donde se haría uso de la glucosa mediante un aumento de la actividad PFK. La mayor actividad PFK en hígado (Vijayan *et al.*, 1990) asociado, en algunos casos, a un descenso de la actividad FBPasa en músculo (Soengas *et al.* 1993b), podría explicar por qué, en algunos casos de estrés por densidad o cambios en la salinidad, no se observó un efecto hiperglucemiante.

Con respecto a la enzima glucolítica **PK** (piruvato quinasa) los resultados son variables. Tras estrés por confinamiento se observó un incremento de su actividad (Vijayan *et al.*, 1997), mientras que con tratamientos de cortisol ésta sufría un descenso (Vijayan *et al.*, 1997) o bien no se afectaba (Foster y Moon, 1986; Vijayan *et al.*, 1996). Situaciones de estrés crónico por densidad (Vijayan *et al.*, 1990) y ejercicio continuado (Vijayan *et al.*,

1993b) tampoco reflejaron cambios en su actividad.

Existen una serie de intermediarios del metabolismo de la glucosa y pertenecientes al ciclo de Krebs cuyos niveles sufrieron variaciones en ciprínidos sometidos a ejercicio breve, de forma que, un incremento de glucosa iba acompañado de un aumento de glucosa 1 P, glucosa 6-P, fructosa 6-P, piruvato, lactato y malato, lo que indica que pueden ser buenos indicadores de la respuesta de estrés (Huber *et al.*, 1989; Sugita *et al.*, 2000). Pacual *et al.*, (1995), pusieron de manifiesto que el estrés derivado de un ayuno prolongado daba lugar, en músculo de dorada, a una mayor actividad **CS** (citrato sintasa), **IDH** (isocitrato deshidrogenasa) y **MDH** (malato deshidrogenasa), lo que podría estar relacionado con una activación de las vías glucolíticas debido a un aumento de las necesidades energéticas en estas condiciones. Otros autores también observaron una mayor actividad CS en músculo de truchas sometidas a un entrenamiento natatorio (Farrell *et al.*, 1992) y en hepatocitos de anguilas incubados con cortisol (Foster y Moon, 1986).

**El lactato** se produce como consecuencia la glucolisis anaerobia en músculo blanco, lo que permitiría seguir utilizando el piruvato como fuente de energía, aún en ausencia de oxígeno (Love, 1970). Krumschnabel y Lackner (1993) demostraron que, la respuesta de estrés generaba en trucha arco iris un descenso de los niveles de glucosa frente a un aumento de piruvato y lactato. Los experimentos de Swith (1983) en caballa (*Scomber scombrus*), reflejaron niveles altos de lactato muscular tras un ejercicio intenso, asociado posteriormente a un incremento de este metabolito en plasma. Efectivamente, se ha comprobado que las catecolaminas actuarían favoreciendo la recuperación del músculo tras el ejercicio, mediante una activación del transporte de lactato a la sangre (Fabri *et al.*, 1998), lo que explicaría su elevación en plasma.

Diversos experimentos reflejan este aumento de lactato en situaciones de ejercicio agudo (Schoonbee *et al.*, 1989) así como en adaptaciones crónicas al ejercicio (Young y Cech, 1993, 1994), situaciones de estrés por arrastre y transporte (Turunen *et al.*, 1994; Iversen *et al.*, 1998), estrés físico agudo (manipulación, aireación, confinamiento) (Huber *et al.*, 1989; Carragher y Ress, 1994; Reubush y Heath, 1994; Barton *et al.*, 1998; Arends *et*

*al.*, 1999; Barton *et al.*, 2000), confinamiento a alta densidad (Skjervold *et al.*, 1999, 2001) y procesos infecciosos (Mesa *et al.*, 1998). También se observó una influencia de la densidad de animales, en situaciones de confinamiento breve, sobre un mayor incremento de los niveles de lactato (Skjervold *et al.*, 1999, 2001).

En contraposición, en experimentos con carpas sometidas a estrés por manipulación, el lactato no parece ser un metabolito indicativo de estrés ya que sus niveles no sufren variaciones, posiblemente debido a una ausencia de anoxia en tejidos (Braley y Anderson, 1992). Un comportamiento similar se observó en experimentos con doradas sometidas a estrés por confinamiento a alta densidad (Arends *et al.*, 1999) y durante el transporte de bacalao a alta densidad (Staurnes *et al.*, 1994), lo que podría reflejar una buena resistencia de estas especies ante situaciones de estrés.

El incremento de la actividad **LDH** (lactato deshidrogenasa) es un buen indicador de la actividad glucolítica, como se observó en condiciones de estrés por confinamiento (Vijayan *et al.*, 1997), aunque algunos experimentos de estrés por ayuno y ejercicio continuado no reflejaron cambios en la actividad de esta enzima (Vijayan, 1993a).

Una vez liberado a la sangre, el restablecimiento de los niveles basales de lactato podría deberse bien a su oxidación o bien a una utilización de éste como precursor en la síntesis de glucosa (Hansen y Abraham, 1989; Reubush y Heth, 1996; Sugita *et al.*, 2000).

En cuanto al **metabolismo de proteínas**, en situaciones de estrés se produce una inhibición de su síntesis acompañada de una activación de su catabolismo en tejidos periféricos. Esto se puso de manifiesto al observarse un incremento de aminoácidos plasmáticos en situaciones de estrés por manipulación (Morales *et al.*, 1990; Braley y Anderson, 1992), ejercicio a corto plazo (Sugita *et al.*, 2000) y exhaustivo (Milligan, 1997), administración continuada de cortisol (Andersen *et al.*, 1991) y confinamiento (Vijayan *et al.*, 1997). Por otro lado, Foster y Moon (1986) observaron que la administración de cortisol en anguilas daba lugar a un incremento de proteínas en plasma (Foster y Moon, 1986) mientras Vijayan *et al.*, (1990) no encontraron ningún efecto de la exposición

crónica a elevada densidad de cultivo sobre el metabolismo proteico, no observando variaciones en los niveles de proteínas plasmáticas. Experimentos posteriores con rascacio (*Hemipterus americanus*) sometido a tratamientos de cortisol, sí reflejaron cambios en determinados enzimas del metabolismo de proteínas, aunque la ausencia de variaciones en aminoácidos plasmáticos podría asociarse a un incremento de su turnover (Vijayan *et al.*, 1996). Medale *et al.* (1987), en un experimento de hipoxia con trucha, observaron un descenso de proteínas y aminoácidos en hígado y en plasma, y sólo de aminoácidos en músculo, lo que explicaría una mayor disponibilidad energética a expensas del anabolismo proteico, habiendo tomado los aminoácidos un destino gluconeogénico u oxidativo.

Un tipo de enzimas clave, asociadas al metabolismo de aminoácidos, son las transaminasas o aminotransferasas, que van a catalizar la transferencia del grupo amino de un determinado aminoácido al  $\alpha$ KG ( $\alpha$ -cetoglutarato) para dar lugar a glutamato. De esta manera, la mayoría de los grupos amino trasferidos en estas reacciones convergen en este aminoácido. La acción de estas enzimas se asocia a procesos en los que los esqueletos carbonados de los aminoácidos van a ser oxidados para la obtención de energía o bien reutilizados para la síntesis de otros compuestos como la glucosa. Esto hace que estas enzimas puedan ser indicativas de la utilización de aminoácidos con fines gluconeogénicos (Lehninger, 1986; Rawn, 1989) en situaciones de estrés.

A este respecto, se ha demostrado un incremento de la actividades hepáticas de **AAT** (alanina aminotransferasa o glutamato/piruvato transaminasa), **TAT** (tirosina aminotransferasa) y/o **GOT** (glutamato/oxalacetato transaminasa o aspartato aminotransferasa) asociados a un incremento de cortisol exógeno (Vijayan *et al.*, 1996), estrés por manipulación (Morales *et al.*, 1990), confinamiento (Vijayan *et al.*, 1997), ejercicio a corto plazo (Sugita *et al.*, 2000) y períodos de puesta o migración (Shikata, 1998; Srivastava *et al.*, 1998). Pacual *et al.*, (1995) pusieron de manifiesto que, en situaciones de estrés por ayuno, se producía en el músculo un aumento del catabolismo de los aminoácidos reflejado por un incremento de las actividades AAT y GOT. Por otro lado, Foster y Moon (1986), aunque encontraron un efecto del cortisol sobre la actividad GOT, no observaron ninguna variación con respecto a la AAT. Esto pone de manifiesto que los resultados con respecto a la

influencia del cortisol sobre la TAT y AAT son algo contradictorios, pudiendo depender de la especie y condiciones experimentales (van der Boon *et al.*, 1991).

Muchos autores han descrito un incremento de la actividad **GDH** (glutamato deshidrogenasa) como un sistema desintoxicador de grupos amino, con un aprovechamiento posterior de los esqueletos carbonados resultantes en procesos gluconeogénicos (Morales *et al.*, 1990; Soengas *et al.*, 1993a) o como fuente de energía (Farrell *et al.*, 1992), asociándose, en algunos casos, a un aumento de los niveles de urea en sangre, posiblemente regulado por el cortisol, como vía de eliminación de los grupos nitrogenados, (Vijayan *et al.*, 1996).

Otra enzima gluconeogénica clave es la **PEPCK** (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa). Su acción permite que el piruvato y una serie de intermediarios del ciclo de Krebs, resultantes en parte de la desaminación de aminoácidos, tras converger en la síntesis OAA (oxalacetato), puedan entrar en la vía gluconeogénica como PEP (fosfoenolpiruvato) (Lehninger, 1986). Así, en algunos casos, se ha observado un incremento de la actividad de esta enzima asociado a una elevación de los niveles de cortisol plasmático (Foster y Moon, 1986; Vijayan *et al.*, 1996, 1997).

Hansen y Abraham (1989) pusieron de manifiesto que en situaciones de ayuno se producía una compartimentación de la gluconeogénesis, de tal manera que de todos los precursores que normalmente eran utilizados en la síntesis de glucosa se observó un uso preferencial por la serina y la alanina. Diversos experimentos ponen de manifiesto el papel de la alanina como aminoácido gluconeogénico en presencia del cortisol (Foster y Moon 1986; Vijayan *et al.*, 1994) y en situaciones de estrés por confinamiento (Vijayan *et al.*, 1997) captura y manipulación (Braley y Anderson, 1992). De hecho, según Milligan (1997), un incremento de cortisol, en truchas arco iris sometidas a un ejercicio exhaustivo, provocaría una activación del catabolismo en hígado, dando lugar a una liberación de aminoácidos en sangre con destino al músculo blanco. En este tejido, el cortisol promovería la oxidación de los aminoácidos generándose glutamina, que pasaría a la sangre para ser oxidada en músculo rojo, y alanina, que iría destinada a la síntesis de glucosa en hígado.

Algunos autores observaron que tras una administración continuada de cortisol exógeno, el aumento de aminoácidos plasmáticos no se asociaba a una activación de las vías gluconeogénicas. Esto apoyaría la idea de que el cortisol podría intervenir aumentando la disponibilidad de substratos energéticos (Andersen *et al.*, 1991) pero que los efectos hiperglucemiantes podrían depender de la interacción entre el cortisol y otras hormonas (Foster y Moon, 1986).

**En relación al metabolismo de los lípidos**, en determinadas situaciones de estrés se ha puesto de manifiesto un aumento de la actividad de lipasas asociado a una liberación de glicerol y ácidos grasos, encaminada a la síntesis de glucosa o con fines energéticos (Vijayan *et al.*, 1990, van der Boon, *et al.*, 1991). De hecho, parece que existe una intervención de las catecolaminas en esta movilización lipídica (Pickering, 1993a) ejerciendo, a nivel hepático, un incremento de la actividad triacilglicérido lipasa (Fabbri *et al.*, 1998).

Hay autores (Waring *et al.*, 1996) que consideran el aumento de ácidos grasos libres en sangre como un factor indicativo del estrés en peces. Esto parece confirmarse en situaciones de estrés por ayuno (White y Fletcher, 1986), confinamiento a corto plazo (Ruane *et al.*, 2002) y ejercicio (Sugita *et al.*, 2000). Por otro lado, en salmones “parr” sometidos a natación continua, se demuestra una utilización de las reservas grasas frente a la constancia de las reservas de glucógeno, al contrario que en peces “smolt” donde la baja proporción de reservas lipídicas promueve un descenso del glucógeno (Virtanen y Forsman, 1987). También, Braley y Anderson (1992), en situaciones de estrés por captura y manipulación en perca (*Macquaria ambigua*), observaron un descenso de los ácidos grasos libres en plasma que, por una posible acción de la insulina, liberada en respuesta a un aumento de glucosa, podrían haber ido destinados a la síntesis de lípidos, o por el contrario haberse oxidado con fines energéticos. Por otro lado, Vijayan *et al.* (1996) observaron que tratamientos con cortisol no alteraban los niveles de ácidos grasos plasmáticos, lo que podría explicarse por un aumento de su turnover. A este respecto, Ruane y Komen (2003) tampoco observaron cambios en los ácidos grasos plasmáticos asociados a estrés por alta densidad.

La actividad de la enzima **G6PDH** (glucosa 6-fosfato deshidrogenasa), perteneciente a la vía de las pentosas fosfato (VíaPP), proporciona moléculas NADPH que podrían ser utilizadas en la síntesis de lípidos. En experimentos de estrés por densidad de cultivo, se comprobó que se producía un descenso en la actividad de esta enzima (Montero *et al.*, 1999), poniéndose de manifiesto una disminución en los procesos lipogénicos, lo que también se reflejó en situaciones de smoltificación (Shitaka, 1998). Por otro lado Soengas *et al.*, 1993a, b) no observaron ninguna alteración en la actividad de esta enzima durante la adaptación de la trucha al agua salada, mientras que en otras ocasiones un incremento de actividad tras estrés por manipulación podría justificar la producción de NADPH como molécula inactivadora del cortisol, regulando el exceso de éste (Morales *et al.*, 1990).

Tratamientos de cortisol han puesto de manifiesto un incremento de la actividad **HOAD** (hidroxiacil Coenzima A deshidrogenasa), ligada a la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, con el fin de hacer frente a una mayor demanda energética asociada a situaciones de estrés (Vijayan *et al.*, 1996). Experimentos con truchas sometidas a natación continuada reflejaron, tanto en músculo cardíaco como esquelético, un incremento en la actividad de esta enzima (Farrell *et al.*, 1992), lo que también se demostró en situaciones de estrés crónico por alta densidad de cultivo en dorada (Montero *et al.*, 1999) y trucha (Vijayan *et al.*, 1990). En este último caso, se observó un aumento de la **GK** (glicerol quinasa) y **G3PDH** (glicerol 3-fosfato deshidrogenasa), enzimas relacionadas con la utilización del glicerol para la síntesis de glucosa, lo cual confirmaría la acción del cortisol sobre las enzimas que favorecen la utilización de precursores lipídicos para la síntesis de glucosa (Vijayan *et al.*, 1991).

Es importante tener en cuenta el papel que juegan una serie de factores (modo de administración del cortisol exógeno, dosis, etapa de desarrollo, existencia de alguna manipulación estresante adicional, efecto sinérgico del cortisol y otras hormonas, cortisol en sangre unido a proteínas biológicamente inerte, etc.) a la hora de evaluar los efectos metabólicos de esta hormona (van der Boon, *et al.*, 1991), ya que todo esto podría explicar algunos datos y resultados contradictorios obtenidos en determinados trabajos.

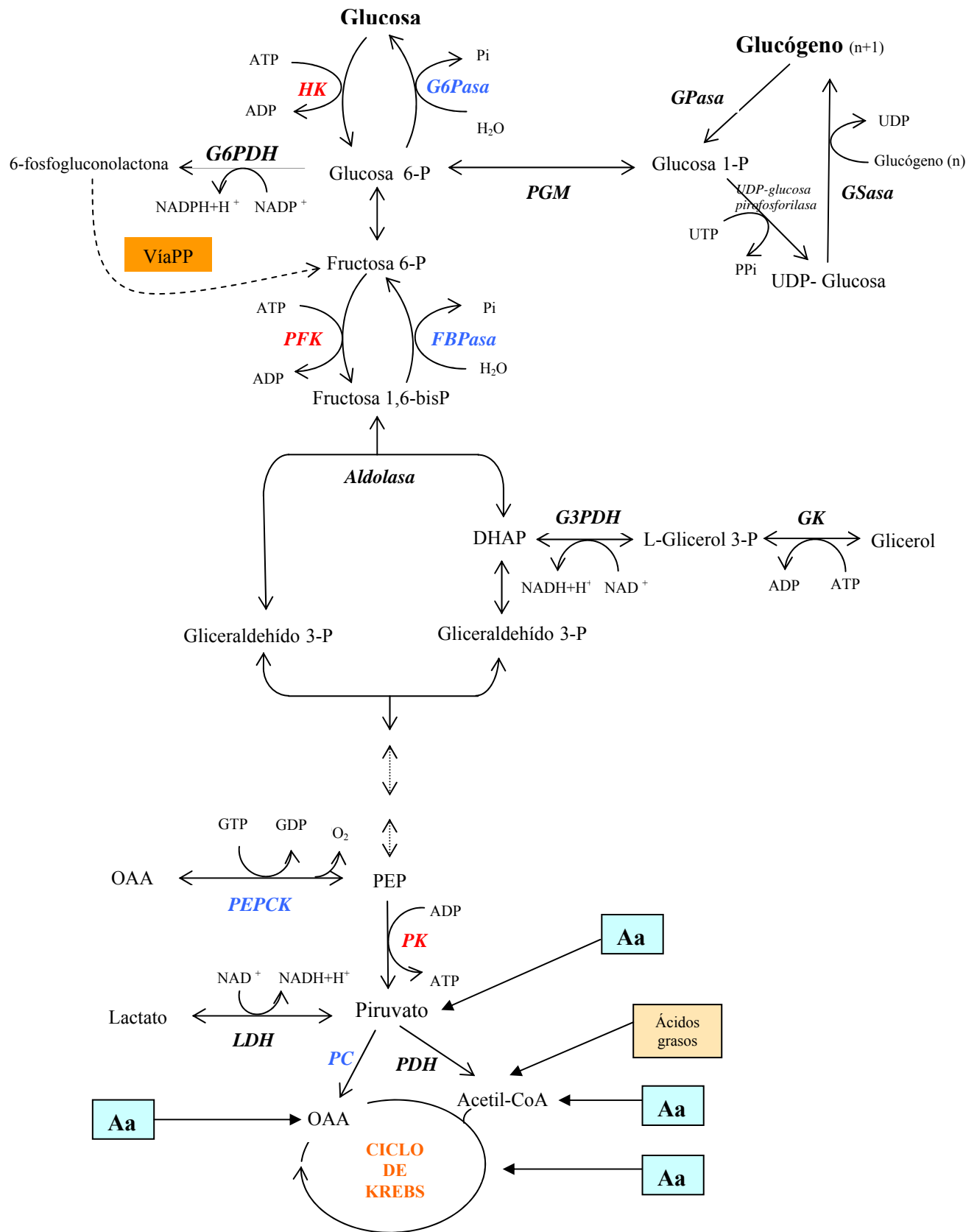


Figura II.3.- Rutas del metabolismo intermediario e incorporación de aminoácidos a este nivel. En rojo se encuentran las enzimas exclusivamente glucolíticas y en azul las propiamente gluconeogénicas.



### **3.2.3. Factores que pueden modificar la respuesta secundaria de estrés**

Anestésicos, temperatura, salinidad del medio, estado nutricional, calidad del agua, etc., son factores que van a influir en la respuesta de estrés.

#### **1) Estado nutricional**

Los estudios de Plisetskaya *et al.* (1994) revelan la importancia del glucógeno tisular a la hora de hacer frente a situaciones de estrés, como el paso a agua salada en salmones, donde se observó una influencia de los niveles de glucógeno sobre la capacidad de resistencia a condiciones adversas. Reubush y Heth, (1996, 1997b) comprobaron que el estado nutricional afectaba a la recuperación de los niveles de glucógeno tras situaciones de estrés agudo por manipulación, siendo más lento en peces ayunados. Esto es interesante si consideramos que ante una nueva situación de estrés los animales no dispondrían de todas sus reservas energéticas. Los mismos autores encontraron que, en peces ayunados, el efecto hiperglucemiante era más persistente, aunque los picos alcanzados eran más bajos. Este mantenimiento podría realizarse a costa de las reservas lipídicas del animal.

También se ha demostrado, en anguilas ayunadas, una preferencia específica por determinados aminoácidos (serina y alanina) como precursores gluconeogénicos a favor de una efectiva utilización de la proteína del animal (Hansen y Abraham, 1989). Ruane *et al.*, (2002) también demuestran una influencia del estado nutricional en la respuesta secundaria de estrés, observando una atenuación de ésta en peces ayunados con un menor incremento en los niveles de cortisol, glucosa y ácidos grasos libres en plasma.

#### **2) Adaptación al ejercicio y situaciones de estrés**

La adaptación al ejercicio va a condicionar una disminución de la sensibilidad de los hepatocitos a la acción de determinadas hormonas glucogenolíticas (adrenalina y glucagón), con el fin de mantener las reservas de glucógeno en estas situaciones de estrés

(Vijayan *et al.*, 1993b). También se ha observado que, peces sometidos a un entrenamiento natatorio presentaban una respuesta hormonal de menor magnitud y duración frente a determinadas situaciones de estrés (Davison, 1997).

En general, una adaptación de los animales a situaciones de estrés, así como una recompensa asociada a estas condiciones, va a determinar que estos animales estén mejor adaptados fisiológica y psicológicamente para hacer frente a situaciones estresantes posteriores. Es una tolerancia al estrés adquirida que se manifiesta con una respuesta más atenuada y un periodo de recuperación más rápido (Young y Cech, 1993; Schreck *et al.*, 1995).

### **3) Temperatura**

En cuanto a la temperatura, se ha comprobado que el tiempo necesario para la restauración de los niveles basales de glucosa y lactato, en peces sometidos a ejercicio exhaustivo, era mayor a 4 °C que a 20 °C (Huber *et al.*, 1989). Algo similar se comprobó con la recuperación de los niveles de pH, lactato, glucógeno y osmolaridad en salmón Atlántico sometido a ejercicio intenso (Wilkie *et al.*, 1997). Se conoce que a altas temperaturas los mecanismos de difusión de moléculas y la tasa metabólica se ven incrementados, lo que, asociado a un mayor gasto energético, daría lugar a una respuesta de estrés más acusada. Por otro lado, temperaturas excesivamente bajas podrían enlentecer el proceso de recuperación. Los resultados más beneficiosos se asociarían a un intervalo de temperatura intermedio, que no diera lugar a un incremento de la respuesta de estrés al mismo tiempo que favoreciera su pronta recuperación (Davis y Parker, 1990).

Por otro lado, experimentos de estrés por densidad de cultivo reflejan que el enfriamiento *in vivo*, previo al sacrificio de animales, suprimía en parte los efectos de la respuesta secundaria de estrés sobre la calidad de la carne (Skjervold *et al.*, 1999, 2001).

#### 4) Salinidad

El estrés provoca un aumento del flujo a través de las branquias lo que origina un aumento de la diuresis acompañada de pérdida de electrolitos. Así, se ha comprobado que, en peces de agua dulce, la inclusión de sales en el medio de recuperación podría tener cierta efectividad a la hora de atenuar la respuesta al estrés por manipulación en determinados animales (Wedemeyer, 1996). En lubinas estriadas recuperadas en aguas con un 5% de salinidad, los niveles de lactato volvían más rápidamente a los valores de reposo (Reubush y Heath, 1997a) que a otras concentraciones salinas. Por otro lado, en experimentos con condrosteos de agua dulce como el pez espátula (*Polyodon spathula*), la salinidad del medio no favorecía el tiempo de recuperación del animal. Puede que esto se deba a que el principal beneficio del medio salino sea prevenir las alteraciones iónicas, las cuales no se presentaban en estos animales sometidos a estrés (Barton *et al.*, 1998). Por otro lado, experimentos de estrés asociados a transporte y establecimiento de altas densidades de cultivo, reflejaron que la presencia de cloruro sódico en el medio disminuía la secreción de cortisol y el aumento de glucosa, siendo éste el medio adecuado para una recuperación post-estrés (Tsuzuki *et al.*, 2001).

#### 5) Calidad del medio

Se ha observado que el período de recuperación de las alteraciones metabólicas, originadas como consecuencia del transporte y el ejercicio de los animales, parece estar directamente relacionado con la calidad del agua del medio (Schoonbee *et al.*, 1989). Como es bien sabido, las situaciones estresantes van a incrementar las necesidades de oxígeno del animal. De acuerdo con esto, se ha comprobado que un aporte adicional de oxígeno en el medio permitiría que animales sometidos a densidades de transporte de más de 1000 Kg/m<sup>3</sup> no sufrieran alteraciones fisiológicas graves, al no observarse alteraciones en el consumo de oxígeno y no existir variaciones iónicas en plasma, ni cambios en los niveles de lactato muscular o de las concentraciones de glucógeno hepático y muscular (Staurnes *et al.*, 1994).

## 6) Utilización de anestésicos

El efecto de anestésicos, como atenuantes de la respuesta de estrés, se ha puesto de manifiesto en experimentos de estrés por manipulación, donde se observó un efecto bloqueante del metomidato en la secreción de cortisol (Olsen *et al.*, 1995). Por otro lado, se ha observado que cantidades elevadas de anestésico pueden ocasionar el efecto contrario, actuando éste como un agente estresante. Así, el hecho de que se produzca una respuesta u otra dependerá de diversos factores como la dosis, modo de aplicación, período de actuación, etc. (Morales *et al.*, 1990; Thomas y Robertson, 1991).

## 7) Hábitat

Con respecto al hábitat de procedencia, parece ser que, efectivamente, animales salvajes presentan una mayor respuesta de estrés por carga, en términos de cortisol y hematocrito, con respecto a los que se encuentran en criadero, ya que los segundos están habituados a situaciones de cautividad y cultivo intensivo, lo que no les permitiría estar más preparados para hacer frente a este tipo de situaciones adversas (Mazur e Iwama, 1993). Lepage *et al.*, (2000) muestran que las diferencias encontradas en truchas salvajes, con una mayor secreción de cortisol y glucosa, frente a las domesticadas, podrían estar relacionadas con un comportamiento distinto en la secreción de neurotransmisores.

## 3.3. RESPUESTA TERCIARIA

Una persistencia de las situaciones adversas va a generar una serie de efectos a largo plazo, como consecuencia de un desvío energético destinado al mantenimiento de la homeostasis, en detrimento de una serie de funciones como el crecimiento, reproducción y capacidad de respuesta inmune que, en el peor de los casos, pueden desembocar en la muerte del animal.

### 3.3.1. Crecimiento

Uno de los principales aspectos a tener en cuenta en la acuicultura intensiva es el rendimiento de la producción. Esto hace que todos los factores que puedan afectar negativamente al crecimiento del animal cobren especial importancia en esta práctica.

Se ha observado, en muchos casos, un descenso del crecimiento asociado a situaciones de estrés, lo cual parece lógico si consideramos que parte de la energía destinada a crecimiento debe de ser utilizada para otros procesos y necesidades más inmediatas como la respiración, control del balance electrolítico, locomoción, reparación de tejidos, etc. A todo esto habría que sumar una movilización de las reservas energéticas del animal reflejada, en algunos casos, en un aumento de su tasa metabólica y respiratoria, todo ello encaminado a cubrir el incremento de la demanda energética (Vijayan *et al.*, 1990; Pankhurst y van der Kraak, 1997; De Boeck *et al.*, 2000).

Otro factor, que en situaciones de estrés puede ser determinante, es un descenso en los niveles de ingesta y de asimilación de nutrientes, lo que podría suponer un mecanismo compensatorio encaminado a disminuir los costes energéticos asociados a los procesos de digestión y absorción de nutrientes. En casos de estrés por alta densidad de cultivo esto tiene especial importancia, ya que habría que sumar una disminución en la disponibilidad del alimento, ya sea por la mayor densidad de animales o por el establecimiento de jerarquías entre ellos (Wendelaar-Bonga, 1997).

Todos estos aspectos se pueden unificar basándonos en la ecuación de distribución de energía en el metabolismo:

Si partimos de la energía bruta aportada en el alimento ingerido (*GE*), habría que tener en cuenta las pérdidas en heces (*FE*) y orina (*UE*), quedando así la energía metabolizable (*ME*), que se distribuiría entre el mantenimiento del animal (*ME<sub>m</sub>*) y la síntesis y renovación de tejidos (*ME<sub>p</sub>*).

$$GE = FE + UE + ME (ME_m + ME_p)$$

En situaciones de estrés esta ecuación se puede ver afectada a varios niveles, de tal manera que un descenso en la ingesta va a disminuir la energía bruta aportada por el alimento. La efectividad en la asimilación y absorción de nutrientes también puede verse afectada en estas condiciones, lo que influiría en la disponibilidad de energía metabolizable que, en casos de estrés, puede verse disminuida. Por último, el preferente destino energético de los nutrientes, para hacer frente a determinadas alteraciones metabólicas, hace que la relación  $ME_p/ME_m$  disminuya en situaciones de estrés, lo que explicaría un descenso en la producción o crecimiento final (van Weerd y Komen, 1998).

Marchand y Boisclair (1998) proponen modelos más esquemáticos en los cuales el crecimiento viene expresado en función de dos variables: ingesta y actividad. Efectivamente, estos autores han demostrado en truchas juveniles, que el incremento de densidad de cultivo ocasiona una menor ingesta y un aumento en la actividad (conductas agresivas, competición, etc.), lo que se traduciría en un menor crecimiento. En este caso, parece que las diferencias en crecimiento dependerían en un 40% de la ingesta y en un 60% del gasto energético.

### ***3.3.1.1. Efecto de la respuesta de estrés sobre las hormonas que controlan el crecimiento***

Existe un efecto inhibitorio del estrés sobre determinadas hormonas que promueven el crecimiento como la insulina, prolactina, hormona del crecimiento, hormonas tiroideas y andrógenos.

Por otro lado, como ya se ha comentado, la estimulación de la producción de cortisol, en una situación de estrés continuada, va a disminuir el crecimiento de una forma directa, estimulando el consumo energético y la actividad de determinadas rutas catabólicas, o indirecta, por medio de su interacción con otras hormonas (Viajan *et al.*,

1990; Pickering, 1993a; Pankhurst y van der Kraak, 1997). El problema estaría en encontrar esa cascada de acontecimientos que relacione ambos aspectos de forma tan directa.

**1) La hormona del crecimiento (GH)** es secretada por la hipófisis estimulando en el hígado la producción del IGF-1 (factor de crecimiento insulínico tipo 1) que llegará vía sanguínea a los tejidos periféricos promoviendo la diferenciación celular y el crecimiento (Pankhurst y van der Kraak, 1997).

Se ha encontrado una influencia del estrés en la secreción de esta hormona, aunque no está del todo clara, ya que en casos de estrés agudo por manipulación y confinamiento, se produce una bajada en la GH asociada a un aumento de corticoides y ACTH, mientras que, en situaciones de estrés crónico por densidad de cultivo (100 g/l), se produce un incremento de GH, posiblemente en respuesta a un descenso del crecimiento por efecto directo del cortisol o de una disminución en la ingesta (Pickering *et al.*, 1991). También se ha observado que la influencia de ciertas prácticas estresantes, como la administración de solución salina o insulina mediante inyecciones, o el sometimiento a ayuno, provocan un incremento en los niveles de GH (Takahashi *et al.*, 1991). Por otro lado, hay casos en los que situaciones crónicas de alta densidad de cultivo se asocian con una reducción prolongada de GH plasmática (Rotllant *et al.*, 2000) e incluso casos en los que situaciones de estrés no provocaron alteración alguna en los niveles de esta hormona (Wagner y Mc. Keown, 1986). Esta discrepancia en los resultados podría estar condicionada por el tipo de agente estresante e incluso por las variaciones circadianas de esta hormona que, en cierto modo, podrían enmascarar las variaciones en los niveles de la misma (Takahashi *et al.*, 1991).

Con respecto a las interacciones entre cortisol y GH, parece que se ha encontrado un efecto sinérgico de ambas hormonas sobre la inhibición de la enzima HK, con lo cual se produciría una disminución de la utilización celular de la glucosa (van der Boon *et al.*, 1991). Esto podría explicar experimentos en los que se ha demostrado que un incremento de los niveles de glucosa plasmática podría dar lugar a una inhibición de la secreción de GH inducida por situaciones de estrés (Takahashi *et al.* 1991).

La actuación conjunta de ambas hormonas se refuerza con una retroalimentación positiva, en la que la secreción de cortisol por el tejido interrenal activaría en la hipófisis la producción de GH y esta, a su vez, activaría al tejido interrenal para la secreción de cortisol (van der Boon *et al.*, 1991; Pankhurst y van der Kraak, 1997). La correlación positiva entre los niveles de cortisol y GH, en situaciones de estrés crónico, no se correspondería con el descenso del crecimiento asociado al estrés. Esta aparente contradicción podría explicarse como un efecto compensatorio de la hormona por disminución de la sensibilidad de sus receptores en las células diana (Pickering *et al.*, 1991). Posteriores estudios pueden llevar a aclarar los efectos del estrés sobre la GH.

**2) Las hormonas tiroideas**, cuya estimulación se hace también vía hipófisis, tienden a estimular el anabolismo, ya que se encargan de promover la síntesis proteica. Se ha visto que tras su entrada en los tejidos periféricos (principalmente hígado), la T4 (tiroxina) se transforma en T3 (triyodotironina) que ejercerá su influencia sobre los distintos tejidos somáticos (tejido muscular). Los efectos inhibitorios del estrés sobre esta hormona se ejercen a estos dos niveles: entrada de T4 en tejidos periféricos y actuación de T3 en tejidos somáticos. Por otro lado, se ha encontrado un efecto inhibitorio del cortisol sobre la secreción de hormonas tiroideas, lo que contribuirá a su descenso y, en último término, a la disminución del crecimiento (Pankhurst y van der Kraak, 1991).

En contraposición a esto, se han encontrado casos en los que existe un efecto sinérgico entre las hormonas tiroideas y el cortisol de tal forma que, a dosis apropiadas, no sólo se consigue una estimulación del crecimiento larvario, sino que éste se realiza de forma equilibrada y proporcional. El cortisol actuaría estimulando la reabsorción del saco vitelino y este aporte energético favorecería el crecimiento de la larva (Mathiyalagan *et al.*, 1996).

**3) Los andrógenos**, hormonas secretadas por las gónadas bajo estimulación de la hipófisis, también actúan promoviendo el crecimiento de tejidos somáticos, que puede verse frenado por situaciones de estrés y niveles altos de cortisol que inhibirían los efectos anabólicos de los andrógenos (Pankhurst y van der Kraak, 1991).



4) Algo similar ocurre con la **prolactina** y la **insulina**, hormonas estimuladoras del crecimiento que, en situaciones de estrés, están inhibidas.

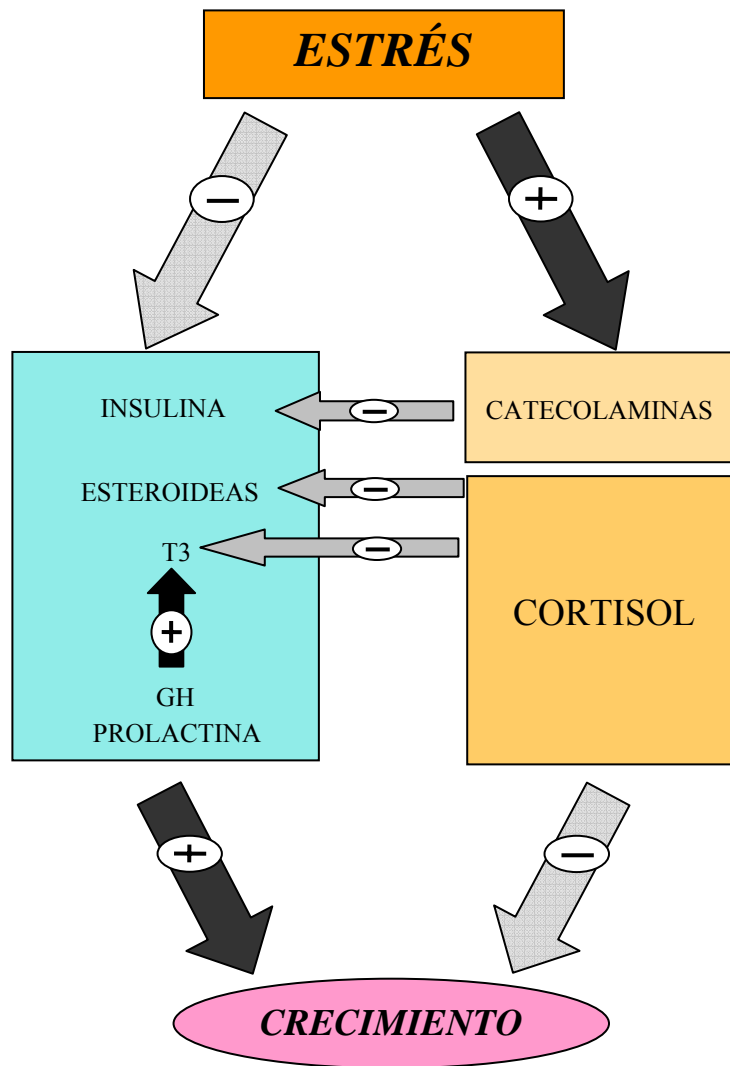


Figura II.4.- Efectos del estrés sobre las hormonas que controlan el crecimiento (Pickering, 1993a).

### 3.3.1.2. Efecto de la respuesta de estrés sobre algunos índices nutricionales y de crecimiento

El descenso de la velocidad de crecimiento, asociado a determinadas situaciones de estrés, viene reflejado por un descenso en determinados índices como: la tasa de crecimiento instantáneo (TCI), el factor de condición (FC) y la eficacia alimentaria (EA), y por un aumento en el índice de conversión del alimento (ICA) (Wendelaar-Bonga, 1997). A este respecto, se han realizado experimentos en diversas especies como tilapia (*Oreochromis spilurus* y *Oreochromis Niloticus*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), pez gato (*Clarias gariepinus*), rodaballo (*Psetta maxima*), halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), trucha, etc., observándose que, en la mayoría de los casos, el efecto de altas densidades de cultivo sobre estos índices alimentarios y de crecimiento es negativo (Pickering y Stewart, 1984; Cruz y Ridha, 1991; Zonneveld y Fadholi, 1991; Hesthagen y Johnsen, 1992; Tidwell y Webster, 1993; Björnsson, 1994; Hengsawat *et al.*, 1997; Papoutsoglou *et al.*, 1998; Ross y Watten, 1998; Hossain *et al.*, 1998; Irvin *et al.*, 1999) (Tabla II.1.). Otros autores han demostrado que, aunque una alta densidad de peces no afecta de forma significativa al FC ni a la TCI, se produce un descenso en el peso medio de los peces cultivados a altas densidades (Mazur *et al.*, 1993a). En contraposición, existen experimentos en los que altas densidades de cultivo no afectan a la producción (Watanabe *et al.*, 1990), TCI e ICA (Ruane y Komen, 2003) o que incluso favorecen la TCI y el ICA (Jørgensen *et al.*, 1993; Papoutsoglou *et al.*, 1998).

Numerosos experimentos relacionan los niveles de cortisol con alteraciones en el crecimiento y la ingesta. Ya en larvas de tilapia se demostró que la administración de cortisol exógeno a determinados niveles provocaba un mayor crecimiento (Mathiyalagan *et al.*, 1996). A esto hay que sumar los experimentos de Weil *et al.* (2001), que demuestran que, más que la magnitud alcanzada en los picos de cortisol ante situaciones de estrés, lo que va a influir en el crecimiento es la persistencia de los niveles de esta hormona en sangre. En contraposición, Gregory y Wood (1998) no encontraron ninguna relación entre la TCI y los niveles de cortisol.

Un descenso en la tasa de crecimiento en situaciones de estrés va a estar

determinado, entre otros factores, por una menor ingesta (Zonneveld y Fadholi, 1991), observándose una posible influencia del cortisol sobre los centros hipotalámicos que regulan el apetito, al ejercer un efecto inhibitor sobre la ingesta (Bernier y Peter, 2001). Pero no todo va a depender exclusivamente de la cantidad ingerida, ya que también se han encontrado descensos en la eficacia alimentaria. Efectivamente, experimentos de estrés por alta densidad de peces demuestran un descenso continuado del crecimiento de la trucha asociado a una menor EA, aunque no se observó en este caso una implicación directa del cortisol a este respecto, lo que probablemente sea debido a interacciones sociales (Pickering y Stewart, 84). Por otro lado, estudios posteriores establecen una posible conexión entre la elevación crónica de los niveles de cortisol y un descenso del apetito, TCI, FC e ICA (Gregory y Wood, 1999) así como en la EA, debido a alteraciones en el epitelio gástrico (Barton *et al.*, 1987).

En experimentos con tilapias sometidas a diferentes densidades de cultivo, además de verse afectado negativamente la EA (Cruz y Ridha, 1991), también se observó que densidades más altas iban asociadas, en algunos casos, a valores de retención proteica (VPP) más bajos (Zonnevel y Fadholi, 1991). Esto podría explicar la mejor utilización del alimento observada en algunas especies sometidas a baja densidad en condiciones de cultivo extensivo, al poder alimentarse de nutrientes naturales y no depender tanto de un aporte exógeno de dieta como ocurre en cultivos intensivos. Todo esto se traducía en un mayor incremento de peso individual y de biomasa total, al final del período experimental, en aquellos animales sometidos a bajas densidades de cultivo (Tidwell y Webster, 1993).

Existen casos en los que no está tan clara la relación inversa entre estrés por densidad de cultivo y crecimiento. Experimentos realizados en salmónidos sometidos a diferentes densidades peces pusieron de manifiesto que, en valores superiores a 60 g/l, se establecía una correlación positiva entre densidad y crecimiento. Todo esto se asociaba a una mayor ingesta (por alimentación automática) que, aunque generaba unos índices más altos de consumo de oxígeno y tasa metabólica, estos no fueron determinantes en la pérdida de peso. Por otro lado, no se observó ningún tipo de comportamiento agresivo entre los animales a alta densidad (Jørgensen *et al.*, 1993). De hecho, parece que el efecto negativo

de la densidad sobre el crecimiento puede ser compensado por los regímenes de alimentación y la frecuencia de disponibilidad del alimento (Holm *et al.*, 1990) y que, en sus efectos, puede ser determinante el tipo de tanque y características del flujo de agua, así como un previo conocimiento de la etiología y hábitat de la especie (Wedemeyer, 1997; Papoutsoglou *et al.*, 1998; Ross y Watten, 1998).

Un aumento de la densidad de animales va a disminuir los niveles de oxígeno del medio, a no ser que este sea suplementado. En experimentos de alta densidad con el halibut (Björnsson, 1994), se observó un descenso de la ingesta y un desvío energético a costa del crecimiento, posiblemente destinado a compensar el gasto por el aumento de actividad natatoria del pez para buscar zonas más oxigenadas. Sin embargo, experimentos con trucha demostraron que altas densidades de animales no daban lugar a un aumento de su tasa respiratoria (Lefrançois *et al.*, 2001); asimismo, Caldwell y Hinshaw (1994), al someter a truchas a condiciones de hipoxia, observaron que el crecimiento no se veía afectado. Por otro lado, hay experimentos de estrés, por baja saturación de oxígeno (como podría ocurrir a altas densidades de cultivo), en los que, si bien no se observa un efecto en el crecimiento, hay una disminución en los índices ARN/ADN, lo que nos indica que esta puede ser una buena medida del descenso del crecimiento a corto plazo (Peterson y Brown-Peterson, 1992).

Se ha comprobado, en muchas especies, que una adaptación al ejercicio moderado puede resultar positiva sobre el crecimiento, asociada a una mejora en el ICA y la TCI (Davison, 1997). Efectivamente, en estos casos, se observó en lubina estriada un aumento de peso y longitud, debido a un mayor depósito de reservas lipídicas que no fueron consumidas durante el ejercicio de mantenimiento. Esto aseguraría una supervivencia del animal en futuras condiciones adversas (Young y Cech, 1994). En salmón Atlántico también se observó una mejora de la ingesta y eficacia alimentaria al someterlo a ejercicio moderado y continuo, observándose poca variación en el peso de los animales, lo que favorecería la ausencia de relaciones de dominancia entre individuos (Jørgensen y Jobling, 1993). Por otro lado, experimentos en trucha arco iris dieron lugar a una ausencia de crecimiento y un menor FC en peces entrenados con respecto a los control. Esto,

posiblemente, se debiera a un estrés, en los animales entrenados, asociado a los cambios de velocidad en el agua, que afectaría negativamente a la ingesta y utilización del alimento (Farrell *et al.*, 1992).

Es interesante puntualizar que, aunque por lo general una mayor concentración de animales produce un descenso en la tasa de crecimiento, existen casos (Zonneveld y Fadholi, 1991; Hesthagen y Johnsen 1992, Hengsawat *et al.*, 1997) en los que este aspecto no repercute negativamente a la rentabilidad y producción, ya que, aunque individualmente los peces obtenidos tengan un peso menor, existe un mayor número de éstos al ser muy baja la tasa de mortalidad. En tilapia, además se ha comprobado que, a densidades de cultivo más altas, la variación en el peso y longitud de los animales es menor, lo que en algunas ocasiones puede ser más rentable a la hora de obtener una producción lo más homogénea posible (Watanabe *et al.*, 1990).

Tabla II.1.- Efecto de la alta densidad de cultivo sobre algunos índices nutricionales y de crecimiento: (↑) incremento, (↓) descenso o (=) constancia de los valores.

| Referencia                        | Especie                          | FC<br>peso/log <sup>3</sup> | TC<br>(ln P <sub>f</sub> - ln P <sub>i</sub> )/días | IC<br>ingesta/(P <sub>f</sub> - P <sub>i</sub> ) | EA<br>(P <sub>f</sub> - P <sub>i</sub> )/ingesta | VPP<br>100*(N <sub>f</sub> - N <sub>i</sub> )/N <sub>ing</sub> | Peso medio | Δ Peso | CV<br>% |
|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|---|--|--|--|------------|--------|---------|
| Cruz y Ridha, 1991                | <i>Oreochromis spilurus</i>      | ↓                           | ↓   |  | ↓  |  |            | ↓      |         |
| Zonneveld y Fadholi, 1991         | <i>Oreochromis Niloticus</i>     |                             | ↓   | ↑  | ↓  | ↓  | ↓          |        |         |
| Watanabe <i>et al.</i> , 1990     |                                  |                             | =   | =  |  |  | =          | =      | ↓       |
| Hossain <i>et al.</i> , 1998      | <i>Clarias gariepinus</i>        |                             | ↓   |  |  |  |            |        |         |
| Hengsawat <i>et al.</i> , 1997    |                                  |                             | =   |  |  |  | ↓          | ↓      |         |
| Irvin <i>et al.</i> , 1999        | <i>Scophthamus maximus</i>       |                             | ↓   |  |  |  | ↓          |        | ↑       |
| Tidwell y Webster, 1993           | <i>Lepomis</i>                   | =                           | ↓   | ↑  | ↓  |  | ↓          |        | =       |
| Björnsson, 1994                   | <i>Hippoglossus hippoglossus</i> |                             | ↓   |  |  |  |            |        |         |
| Papoutsoglou <i>et al.</i> , 1998 | <i>Dicentrarchus labrax</i>      |                             | ↑   | ↓  |  |  |            |        |         |
| Mazur <i>et al.</i> , 1993        | <i>Onchrlynchus tshawytscha</i>  | =                           | =   | ↓  |  |  | ↓          |        |         |
| Jorgensen <i>et al.</i> , 1993    | <i>Salvelinus alpinus</i>        | ↑                           | ↑   |  |  |  | ↑          |        |         |
| Ross y Watten, 1998               | <i>Salvelinus namaycush</i>      |                             | ↓   | ↑  |  |  |            |        |         |
| Pickering y Stewart, 1984         | <i>Salmo trutta</i>              |                             |   |  | ↓  |  |            |        |         |
| Hesthagen y Johnsen, 1992         |                                  |                             |   | ↓  |  |  |            |        |         |

### 3.3.1.3. Establecimiento de jerarquías entre individuos y efectos sobre el crecimiento

El hecho de que en situaciones de alta densidad de cultivo, generalmente se produzca un descenso en el crecimiento de los animales, no sólo va a estar condicionado por una menor disponibilidad en el alimento y oxígeno del medio, sino que, además, un posible establecimiento de jerarquías puede dar lugar a una situación de estrés adicional en aquellos individuos dominados. Esto explicaría una mayor dispersión del peso individual de los animales, reflejada en un aumento en el coeficiente de variación (CV) de estos (Irwin *et al.*, 1999).

El efecto de las interacciones sociales sobre el crecimiento se ha observado en experimentos con salmónidos, donde los animales sometidos presentaban una menor TCI y FC, asociándose este último a un descenso en el contenido lipídico de estos animales (Sloman *et al.*, 2000). Los mismos autores encontraron dos tipos de comportamiento entre peces dominados: el que presenta un alto gasto energético debido a que compete con el dominante para la captura de alimento, y el que permanece alejado de los peces dominantes y con un bajo coste energético. En el primer caso, el crecimiento se vio afectado por la ingesta, que no era suficiente para compensar sus costes energéticos, cosa que no ocurría en el segundo tipo, donde el bajo consumo de alimento se compensaba con el poco gasto energético debido a su baja actividad (Sloman *et al.*, 2000).

Parece ser que el establecimiento de jerarquías está, en parte, regulado a nivel del sistema nervioso mediante la secreción de determinados neurotransmisores. Efectivamente, los individuos dominantes manifiestan un comportamiento más agresivo, estimulado por la secreción de dopamina, mientras que los individuos sometidos presentan altos niveles de serotonina, la cual ocasiona una disminución de la agresividad, la actividad locomotora espontánea y la ingesta (Winberg y Nilsson, 1993). Además, se ha comprobado una intervención de estos neurotransmisores regulando la presencia de elevados niveles de cortisol en aquellos individuos sometidos (Overli *et al.*, 1999; Höglund *et al.*, 2001), no descartándose el que exista cierta relación entre la probabilidad de ser subordinado y los títulos de cortisol presentados, previos al "estrés social" (Sloman *et al.*, 2001). De hecho,

Pottinger y Pickering (1992) observaron un mantenimiento crónico, o una lenta recuperación de los niveles de cortisol, en posibles animales subordinados en situaciones de estrés por confinamiento. Por otro lado, Sloman *et al.* (2000) no encontraron diferencias en los niveles de cortisol (ni alteraciones secundarias) entre subordinados y dominantes, lo que podría deberse a una recuperación de sus niveles basales al cabo de dos semanas, más que a una ausencia de estrés, ya que sí se encontraron diferencias en los índices de crecimiento.

Actualmente, se están realizando estudios acerca de cómo paliar la influencia de las relaciones de dominancia sobre el crecimiento. Se ha comprobado en doradas de un tamaño medio, que la presencia de individuos de mayor o menor tamaño, asociada a una disponibilidad o competencia por el alimento, determinaba el crecimiento de estos animales. Con alimento en exceso, la presencia de animales de mayor tamaño aumentaba la TCI en los de peso medio, y en situaciones de competencia, el peso era mayor cuando los de peso medio se rodeaban de animales pequeños (Karplus *et al.*, 2000). Por otro lado, se ha demostrado la influencia del número de individuos en el establecimiento de jerarquías tras estrés por confinamiento. Pottinger y Pickering (1992) demostraron que pares y grupos de cinco truchas presentaban claros indicios de dominancia y subordinación con respecto a grupos de diez, en los que la ausencia de inhibición en el crecimiento, debido a interacciones sociales, se puso de manifiesto con un claro descenso en el coeficiente de variación. El comportamiento agonista de la mayoría de los salmónidos tiende a disminuir a altas densidades, cosa que también se ha demostrado en otras especies como la tilapia (Bagley *et al.*, 1994; Wedemeyer, 1997). En estas condiciones, los animales cambian continuamente su posición relativa con respecto a los otros, lo que les imposibilita reconocer el comportamiento de determinados individuos y establecer relaciones jerárquicas, viviendo en unidades sociales anónimas. En estos casos, la disponibilidad de alimento y condiciones del medio parece ser determinante en el desarrollo de una buena producción (Karplus *et al.*, 2000).



### 3.3.2. Respuesta inmune

Una de las consecuencias de una respuesta de estrés continuada es la predisposición del animal a desarrollar infecciones por parásitos o microorganismos, debido a un descenso en la capacidad de respuesta inmune (Barton e Iwama, 1991). Efectivamente, se han puesto de manifiesto los efectos inmunosupresores de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal (Balm, 1997), demostrándose que una hipercortisolemia, causada por distintos tipos de estrés, puede afectar al sistema inmune tanto a nivel de la respuesta natural o innata como de la específica o adquirida (Pickering, 1993b; Wedemeyer, 1997):

**a) En cuanto a la inmunidad natural o innata**, se ha observado un descenso en la capacidad bactericida, mediante alteraciones en la actividad de la lisozima y en la actividad hemolítica, basada principalmente en la ruta alternativa del complemento, así como de hemoaglutininas del suero (Rotllan *et al.*, 1997; Aranishi *et al.*, 1998; Ruane *et al.*, 1999). Los resultados referidos a la actividad de la lisozima son algo ambiguos, ya que se puede producir un aumento o un descenso de su actividad dependiendo de la duración y tipo de estrés (Fevolden *et al.*, 2002). A esto hay que sumar un descenso en la actividad citotóxica de leucocitos eosinófilos y de la capacidad fagocítica de macrófagos, asociada a una disminución en estos de la capacidad de producción de radicales de oxígeno tóxicos con función antimicrobiana (Narnaware *et al.*, 1994; Ruane *et al.*, 1999; Vazzana *et al.*, 2002).

**b) Con relación a la inmunidad específica o adquirida**, se ha observado una acción del cortisol provocando un descenso de linfocitos circulantes y células productoras de anticuerpos específicos, lo que se refleja en un descenso de anticuerpos como es el caso de la IgM (Maule *et al.*, 1989; Salonijs e Iwama, 1993; Thompson *et al.*, 1993; Barker *et al.*, 1994; Nagae *et al.*, 1994; Rotllan *et al.*, 1997; Ruane *et al.*, 1999).

Aunque se ha demostrado un efecto inmunomodulador de las catecolaminas, al provocar un descenso en la actividad fagocítica de macrófagos en pocas horas (Narnaware *et al.*, 1994; Harris y Bird, 2000), la mayoría de los estudios realizados se centran en la acción del cortisol. De hecho, en salmónidos, se ha demostrado la presencia de receptores

de glucocorticoides en leucocitos y cómo, ante situaciones de estrés, éstos sufren modificaciones (Maule *et al.*, 1990; Rotllan *et al.*, 1997). De cualquier manera, los efectos del estrés son difíciles de interpretar sólo en términos de estas dos hormonas, ya que existen muchas otras que están implicadas mediante su actuación a lo largo del HHI, con intervención de la CRH y ACTH (Harris y Bird, 2000).

Por último, es interesante destacar que además de facilitar la transmisión de infecciones entre individuos, las altas densidades de cultivo pueden modificar la capacidad de respuesta inmune, como se puso de manifiesto en salmónidos, al observarse una relación directamente proporcional entre la tasa de infección por *Renibacterium salmonidarum* y los valores de densidad de animales (Mazur *et al.*, 1993b). Pickering y Pottinger (1989) también demostraron que el estrés crónico asociado a altas densidades de cultivo provocaba un descenso de linfocitos circulantes que se mantenía aún cuando los títulos de cortisol retornaban a niveles próximos a los basales, lo que puede ser un claro índice del alto grado de sensibilidad de la especie, o consecuencia de los efectos del estrés a largo plazo con una respuesta hormonal ya atenuada.

### 3.3.3. Reproducción

Es bien conocido el efecto del estrés sobre los procesos de maduración reduciendo la tasa de supervivencia de las crías. Existen diversos experimentos, asociados a alteraciones ambientales (pH, contaminantes, etc.) y a estrés por manipulación o confinamiento, que ponen de manifiesto una serie de alteraciones, en dichos procesos, a nivel endocrino y fisiológico (Barton e Iwama, 1991).

Aunque se ha observado una actuación del cortisol en el eje hipófisis-gónadas, dando lugar a una supresión de gonadotropina en la hipófisis de manera indirecta, el cortisol actúa predominantemente y de forma directa inhibiendo la secreción de esteroides en gónadas, provocando un descenso en los niveles plasmáticos de testosterona, estradiol y, en consecuencia, de vitelogenina (Barton e Iwama, 1991; Pankhurst y van der Kraak, 1997). A este respecto, se ha observado un efecto del cortisol inhibiendo la afinidad de los

receptores de estradiol, encargado de promover la síntesis de vitelogenina en hígado (Hobby *et al.*, 2000; Lethimonier *et al.*, 2000).

Como consecuencia de las alteraciones hormonales se van a producir una serie de consecuencias a nivel fisiológico como un descenso en el tamaño del ovario, retrasos en la ovulación y un descenso en el espermatozoides y calidad de gametos. Todo esto repercutirá en el tamaño y viabilidad del huevo, supervivencia y crecimiento de larvas y alevines (Pickering, 1993a; Campbell *et al.*, 1994; Sehgal y Toor, 1995). Es interesante tener en cuenta que, además, existen una serie de efectos indirectos asociados a situaciones de estrés y que se producen como consecuencia de una disminución en la ingesta, disponibilidad de reservas energéticas y aprovechamiento nutricional (Campbell *et al.*, 1994).

Se ha comprobado que existen ciertas diferencias en cuanto a la naturaleza de la respuesta fisiológica y reproductiva ante determinados agentes estresantes y, de hecho, parece una contradicción que periodos de puesta vayan asociados a una activación del eje HHI y una liberación de cortisol, no estando claro, en muchos, casos el papel de esta hormona a este nivel. De esta manera, el tipo de respuesta producida va a depender de muchos factores entre los que encontraríamos el grado de maduración, la especie, influencias hormonales y/o ambientales, etc. (Barton e Iwama, 1991; Schreck *et al.*, 2001).

#### **4. PAPEL DE LOS HUFAS COMO ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES EN LOS PECES**

Los lípidos son uno de los principales componentes de la dieta de los peces ya que tienen un importante papel como fuente de energía y vehículo para el aporte de ácidos grasos esenciales, vitaminas y determinados micronutrientes de carácter liposoluble.

Un ácido graso esencial (AGE) es todo aquel que el animal es incapaz de sintetizar de novo (síntesis endógena) y cuyo aporte en la dieta es necesario para el mantenimiento de

las funciones celulares (Sargent *et al.*, 1989). El ambiente en el que se encuentren los animales va a condicionar la disponibilidad y tipo de alimento lo que, en último extremo, va a estar relacionado con las necesidades esenciales de determinados nutrientes.

De esta manera, en **peces marinos** existe un aporte de ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs) asociado al consumo del fito y zooplacton de este medio. Estos ácidos grasos son del tipo n-3 y n-6 (que indica la posición del carbono con un doble enlace a partir del grupo metilo del ácido graso) y se ha podido comprobar la incapacidad que tienen la mayoría de peces marinos para sintetizarlos de novo (Watanabe, 1987; Webster y Lowell, 1990) al observarse una serie de efectos negativos asociados a su carencia en la dieta, en concreto del 20:5n3 (ácido eicosapentanoico, EPA) y del 22:6n3 (ácido docosahexanoico, DHA). Por otro lado, en ciertos peces marinos como el rodaballo se observó que las carencias de HUFAs n-3 eran suplidas con la administración de ciertos ácidos grasos precursores (Tocher *et al.*, 1989). De hecho, ya en peces de **agua dulce**, y de manera destacada en trucha, se ha observado una capacidad para sintetizar HUFAs n-3 y n-6 a partir de otros ácidos grasos como el 18:2n6 (linoleico) y 18:3n3 (linolénico). El hecho de que estos últimos se encuentren de manera abundante en ciertas plantas y algas de agua dulce, representativas de la base de la cadena alimentaria, podría explicar la presencia de estos ácidos grasos, aunque con sustanciales modificaciones, en niveles tróficos superiores y, en cierto modo, la capacidad de aprovechamiento de estos como fuente precursora de HUFAs en peces dulceacuícolas (Sargent *et al.*, 1989).

#### 4.1. SÍNTESIS Y NECESIDADES DE HUFAS

La **síntesis endógena** a partir del precursor acetil-CoA genera ácidos grasos con un número de 14, 16 y 18 carbonos, saturados y monoinsaturados, que mediante una serie de reacciones de desaturación y elongación van a dar lugar a HUFAs del tipo n-9. Por otro lado, un aporte **exógeno** de 18:2n6 y 18:3n3 favorece la síntesis de HUFAs n-3 y n-6 en aquellos animales que poseen la maquinaria enzimática adecuada, como los peces de agua dulce (Kanazawa, 1985).

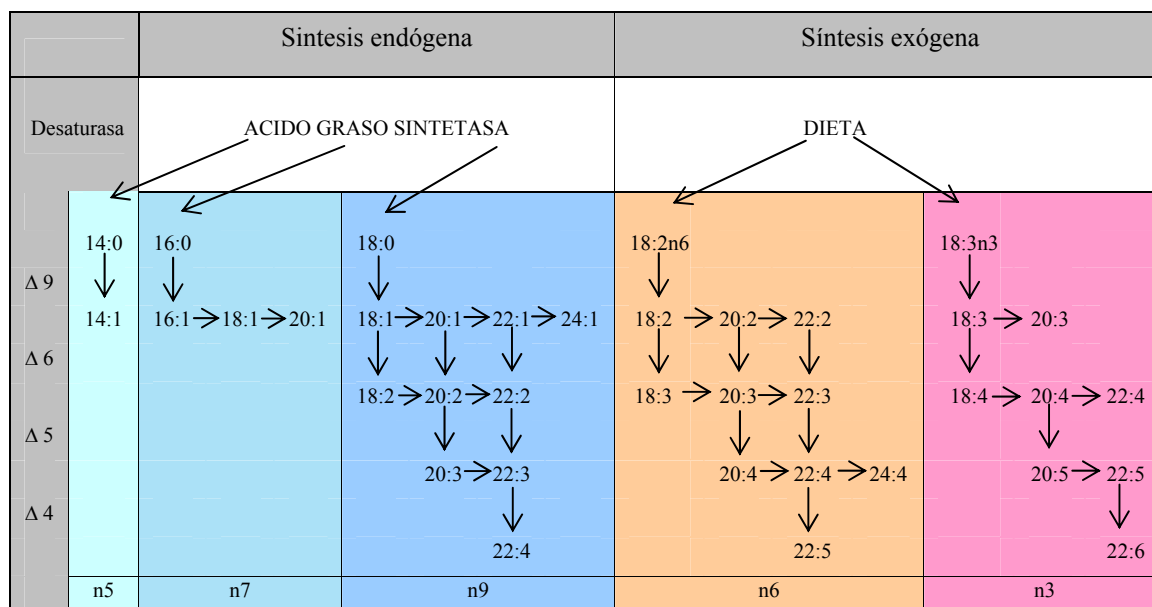


Figura II.5.- Rutas de síntesis de los diferentes ácidos grasos a partir de precursores endógenos y exógenos

Se ha comprobado que existe una afinidad por el sustrato de dichas enzimas en orden decreciente desde el 18:3n3, 18:2n6 hasta el 18:1n9. Esto explicaría una mayor producción de HUFAs n-3 con respecto a los n-6 en presencia de ambos sustratos y de cómo un exceso de 18:2n6 en la dieta puede ser perjudicial para el pez al desviarse la síntesis a HUFAs n-6 por competencia con la  $\Delta 6$ -desaturasa, no cubriéndose las necesidades de n-3. Esto parece indicar que en peces existe una mayor necesidad de los n-3 frente a los n-6, sin menospreciar la importancia de estos últimos (Sargent *et al.*, 1989; Henderson *et al.*, 1996).

Por otro lado, se ha observado que, para satisfacer las necesidades del pez, se requiere el doble de precursores C18 (18:2n6 y 18:3n3) con respecto a los HUFAs, teniendo por tanto estos últimos el doble de eficacia en las fórmulas dietarias. Así, una administración directa de HUFAs n-3 y n-6 frente a precursores C18 resultaría más rentable y beneficiosa para el animal a dos niveles: *a)* supone un ahorro en el pez de los procesos de conversión (Watanabe, 1987; Billar, 1991) y *b)* los niveles de HUFAs no se ven limitados por una tasa insuficiente de síntesis a partir de precursores C18, los

cuales, a su vez, pueden disminuir sus niveles debido a que presentan mayor predisposición a ser oxidados con fines energéticos que los HUFAS C20 y C22 (Ruyter *et al.*, 2000b).

De esto se deduce que las necesidades cualitativas y cuantitativas de ácidos grasos esenciales dependerán de la capacidad del animal para sintetizarlos a partir de precursores (relacionado con el hábitat y la especie) y del grado de esencialidad de los distintos ácidos grasos (Sargent *et al.*, 1989; Billar, 1991) (ver Tabla II.2).

Tabla II.2.- Necesidades de AGEs en trucha arco iris expresadas como % en dieta y % de los lípidos consumidos.

| Ac. Graso                     | % dieta | % lípidos | observaciones  |
|-------------------------------|---------|-----------|--|
| <i>Linoleico</i><br>(18:2n6)  | 1       | 20        | Eficaces en peces de agua dulce  |
| <i>Linolénico</i><br>(18:3n3) | 1       | 20        |  |
| <i>HUFAs n-3 y n-6</i>        | 0.5     | 10        | Indispensables en peces marinos<br>En agua dulce doblemente eficaces con respecto a sus precursores. |

#### 4.2. INFLUENCIA DE LA DIETA EN LA COMPOSICIÓN CORPORAL DE ÁCIDOS GRASOS

Al igual que ya se observó en mamíferos (Ruiz-Gutiérrez *et al.*, 1999; Luostarinen *et al.*, 2001), la composición en ácidos grasos de la dieta de los peces se refleja en sus tejidos corporales. Tras la administración de dietas ricas en HUFAs se observó un depósito de éstos en carcasa (Agrandi *et al.*, 1995), hígado (Mourete *et al.*, 2000) y músculo (Olsen y Henderson, 1997; Huang *et al.*, 1998). Estos efectos explicarían la presencia de 18:2n6 y 18:3n3 así como de 20:5n3 y 22:6n3 en peces de agua dulce, encontrándose en peces marinos sólo estos últimos y en proporciones superiores (Henderson y Sargent, 1985).

La influencia de la dieta en los ácidos grasos corporales se puede analizar desde dos puntos de vista:

**1) Cantidad de dieta ingerida.** A este respecto, se ha observado que un descenso en la ingesta (que puede estar asociado a cambios en la salinidad del medio, saturación de oxígeno, situaciones de estrés por densidad de cultivo, etc.) dio lugar a una menor proporción de ácidos grasos saturados y monoinsaturados (14:0, 18:0, 16:1, 18:1) en músculo, lo que refleja un posible destino catabólico de estos ácidos grasos de reserva con fines energéticos. Los niveles de HUFAs n-3 no se vieron tan afectados (incluso aumentaron), lo que parece indicar la importancia de su función estructural y estabilizadora de membranas frente a los lípidos de reserva (Kiessling *et al.*, 2001).

**2) Variaciones de los niveles relativos de determinados ácidos grasos en la dieta,** generan un desequilibrio a nivel tisular de las proporciones existentes entre ellos, asociado a la activación o desactivación de determinadas vías enzimáticas por efecto de la competencia entre los distintos sustratos.

La carencia de precursores n-3 y n-6 (18:2n6 y 18:3n3) en peces de agua dulce genera, a la larga, un descenso de los HUFAs derivados de ellos y un aumento de ácidos grasos n-9 (18:1n9 y 20:3n9) al eliminarse una posible competencia de los primeros con los 18:1n9 por la  $\Delta 6$ -desaturasa. Esto lleva a que, en ocasiones, se tome un aumento en el índice 20:5n9/22:6n3 como indicativo de carencia de AGEs (Rainuzzo *et al.*, 1997; Ruyter *et al.*, 2000a). En cuanto a los niveles de 20:4n6 (ácido araquidónico), se observó un ligero aumento de éste a costa del 18:2n6 presente en las membranas. Esto pone de manifiesto la esencialidad de este ácido graso aunque no de una manera muy acusada (Ruyter *et al.*, 2000a).

Por otro lado, en juveniles de lenguado, el aporte de HUFAs n-3 aumentó su proporción a nivel tisular a costa de un descenso de 18:2n6 y 18:3n3 (Logue *et al.*, 2000). Es interesante destacar que la suplementación de 18:3n3 en dieta puede ejercer un efecto inhibitorio en la síntesis del 22:6n3 a partir del 20:5n3 (Ruyter *et al.*, 2000b); esto explicaría

ensayos en los que en ausencia del 18:3n3 se producía un mantenimiento de los niveles de 22:6n3 a expensas de una disminución en los niveles de 22:5n3 (Bell *et al.*, 1985).

En cuanto a la distribución de ácidos grasos esenciales entre la fracción neutra y polar de lípidos, las carencias de HUFAs n-3 y n-6 en dieta provocaron, en primer lugar, un descenso de estos ácidos grasos en triglicéridos con el fin de mantener los HUFAs n-3 y n-6 en fosfolípidos de membrana, los cuales, finalmente, ante una situación extrema, llegan también a manifestar un descenso de estos últimos (Ibeas *et al.*, 1996; Ruyter *et al.*, 2000a).

### 4.3. ¿A QUÉ SE DEBE LA IMPORTANCIA DE LOS HUFAS?

Existen numerosos experimentos que ponen de manifiesto la clara esencialidad de estos ácidos grasos, encontrándose que su importancia a nivel fisiológico está asociada a varios aspectos:

#### 1) Regulación del efecto de la temperatura en las membranas celulares

El hecho de que, a diferencia de los animales terrestres, los peces sean poiquiloterms hace que un descenso de la temperatura pueda repercutir negativamente en la fluidez de las membranas celulares y afectar a la funcionalidad de éstas. Una manera de evitar esto es mediante cambios en las proporciones relativas de los ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos de membrana.

Se ha observado que un aumento en el número de dobles enlaces y de carbonos en los ácidos grasos favorece la fluidez de las membranas, lo que explicaría el aumento de HUFAs asociado a un descenso de la temperatura (Sargent *et al.*, 1989; Delgado *et al.*, 1994) incluso en animales alimentados con dietas pobres en HUFAs (Olsen *et al.*, 1999). Aunque, es interesante matizar que, una pérdida de ácidos grasos saturados, asociada a un aumento de los poliinsaturados, influye más en la fluidez de membrana que el incremento



de dobles enlaces en sí (Bell *et al.*, 1986; Cai y Curtis, 1990). Esto explicaría el hecho de que peces de aguas más templadas, como el pez gato y la carpa, tengan necesidades inferiores de precursores HUFAs frente a los de aguas más frías como la trucha (Castell, 1978).

A este respecto, se podría entender una mayor esencialidad de los n-3 con respecto a los n-6, ya que los primeros presentan un punto de fusión más bajo, lo que les confiere mayor fluidez ante temperaturas inferiores (Takama *et al.*, 1999).

## **2) Síntesis de eicosanoides**

El papel de los HUFAs en la síntesis de eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos) es de gran importancia fisiológica ya que estas moléculas están relacionadas, entre otras cosas, con el control de la osmorregulación, respiración, inducción de la reproducción, acumulación de leucocitos en respuesta a tejidos dañados y regulación del flujo de sangre en riñones. A este respecto, hay que destacar el papel de los HUFAs n-6, y en concreto el 20:4n6, como constituyente del fosfolípido fosfatidil inositol (PI) precursor, a su vez, de las prostaglandinas de tipo 2 (Tocher y Dick, 1990). En peces marinos, este ácido graso es requerido de manera esencial en pequeñas cantidades, dada la incapacidad de estos peces para sintetizarlo a partir del 18:2n6 (Sargent *et al.*, 1989).

Aunque los beneficios asociados a la síntesis de prostaglandinas a partir de precursores n-3 no están tan claros, parece ser que las prostaglandinas de tipo 3, sintetizadas a partir del 22:5n3 podrían regular los efectos nocivos de un exceso de producción de prostaglandina de tipo 2. De ahí la importancia de un equilibrio entre n-6/n-3 (Bell *et al.*, 1986).

#### 4.4. SUSCEPTIBILIDAD A LA OXIDACIÓN EN LOS HUFAS

El alto grado de insaturación de este tipo de ácidos grasos los hace más susceptibles a la oxidación a nivel de los carbonos próximos a los dobles enlaces. Esto puede ser perjudicial ya que la oxidación de los lípidos de membrana será más probable al incorporarse en ellas los HUFAs provenientes de la dieta, además de que en algunas ocasiones un enrriamiento de los lípidos de la dieta disminuye la disponibilidad de HUFAs y puede dar lugar a moléculas que favorezcan la oxidación de los lípidos de membrana (Roberts y Bullock, 1989).

Estos efectos pueden ser paliados o evitados con dosis suficientes de antioxidantes. Efectivamente, se ha comprobado que las necesidades de vitamina E en peces guardan una relación directa con los niveles de HUFAs en la dieta (Watanabe, 1987; Sargent *et al.*, 1989) de tal manera que el índice Vit E /HUFAs determina el grado de protección frente a la oxidación (Hamre y Lie, 1995; Stephan *et al.*, 1995). Así, en peces deficientes en esta vitamina los niveles de 22:6n3 en fosfolípidos hepáticos sufrieron un descenso, posiblemente como consecuencia de su oxidación (Bell y Cowey, 1985). De hecho, se ha encontrado que, a bajas temperaturas, donde los HUFAs cobran mayor importancia para mantener la fluidez de membranas, las necesidades de vitamina E aumentan, siendo los animales que habitan en aguas frías más susceptibles de sufrir deficiencias de dicha vitamina (Bell y Cowey, 1985; Choe *et al.*, 1995). De esta manera, la eficacia biológica de los HUFAs puede verse disminuida si no se tiene en cuenta la gran facilidad de oxidación de estos ácidos grasos y el efecto de los antioxidantes en una proporción suficiente para actuar como agentes reparadores o preventivos. Todo ello será tratado más adelante.

#### 4.5. PATOLOGÍAS Y SÍNDROMES ASOCIADOS A LA CARENCIA DE HUFAS

Los efectos asociados a la carencia de AGEs, ya sea por oxidación de éstos o por

un descenso en la disponibilidad dietaria, son amplios y, básicamente, se asocian al deterioro y pérdida de funcionalidad de las membranas (Roberts y Bullock, 1989; Sargent *et al.*, 1989; García-Gallego, 1992):

1) Diversos estudios han puesto de manifiesto que la carencia de HUFAs provoca un descenso en la calidad de la puesta, % de nacimientos y crecimiento larvario, asociado a un aumento de la mortalidad en juveniles (Kowen *et al.*, 1990; Webster y Lowell, 1990; Rainuzzo *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 1998; Bruce *et al.*, 1999; Mourente *et al.*, 1999). Por otro lado, también se observó que niveles muy altos de n-3 podían afectar negativamente al desarrollo larvario (Fernández- Palacios *et al.*, 1995).

2) Se ha podido comprobar la importancia de estos ácidos grasos esenciales para el crecimiento de los peces (Gapasin *et al.*, 1998; Montero *et al.*, 1998). Su deficiencia provoca un descenso en el crecimiento reflejado en valores bajos de TCI e ICA asociado a carencias de n-3, no viéndose tan claro en el caso de n-6 (Cai y Curtis, 1990; Ruyter *et al.* 2000a, b). Dichos efectos podrían estar vinculados a la existencia de una correlación positiva entre el grado de insaturación y una mayor digestibilidad de los ácidos grasos (posiblemente asociada a que estos presentan un punto de fusión más bajo), lo que facilitaría el aprovechamiento energético de los mismos (Billar, 1991; García-Gallego, 1992).

En contraposición, valores excesivos de ácidos grasos precursores de HUFAs pueden tener efectos negativos en la velocidad de crecimiento (Huang *et al.*, 1998), debido a que el pez se encuentra en condiciones de saturación de sus niveles óptimos de estos ácidos grasos, llegando incluso a producirse un descenso en la digestibilidad de estos (Ruyter *et al.*, 2000b). También existen experimentos en los que no se encontró ninguna influencia de los HUFAs sobre el crecimiento (Olsen y Henderson, 1997; Kolkovski *et al.*, 2000; Logue *et al.*, 2000; Varghese y Oommen, 2000).

3) Variaciones en la composición corporal del pez reflejadas en un aumento de la humedad y un descenso en lípidos y proteínas corporales (Sargent *et al.*, 1989).

4) Anemia asociada a un descenso en los niveles de hemoglobina por un posible deterioro de la membrana de los glóbulos rojos (Sargent *et al.*, 1989).

5) Alteraciones en tejidos como el epitelio branquial, aletas y mandíbula inferior, así como alteraciones hepáticas reflejadas en una inflamación con aumento del IHS (índice hepatosomático) y palidez del tejido con depósitos grasos, posiblemente asociadas a un deterioro en la síntesis de lipoproteínas lo que provocaría una inhibición de la salida de lípidos hepáticos. Estas alteraciones pueden desembocar en el “Síndrome de degradación lipídica del hígado” donde infiltraciones de grasas oxidadas pueden generar, en último extremo, un depósito de lipopigmentos ceroides que le confieren un aspecto amarillento al hígado (Moccia *et al.*, 1984; Roberts y Bullock, 1989; Sargent *et al.*, 1989; Hamre *et al.*, 1994).

## **5. IMPORTANCIA DE LAS VITAMINAS E Y C EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LOS PECES**

Es bien sabido el papel de las vitaminas como micronutrientes esenciales que intervienen en un sin fin de procesos metabólicos y fisiológicos fundamentales para los seres vivos. A la hora de evaluar las necesidades vitamínicas en un ser vivo, el mejor indicativo utilizado es la observación de los efectos producidos sobre el crecimiento como consecuencia de suplementación o deficiencia de dichas vitaminas (Woodward, 1994).

### **5.1. VITAMINA E**

Las necesidades de vitamina E van a depender del contenido lipídico de la dieta (Roem *et al.*, 1990), estableciéndose valores en trucha arco iris de 20-30 mg/Kg dieta con un 1% de linolénico, 50 mg/Kg dieta con un 10% de lípidos y 100 mg/Kg dieta con un 15% de lípidos en dieta (Cowey *et al.*, 1983). También cobra gran importancia la

temperatura del medio, ya que existe una relación inversa entre ésta y las necesidades vitamínicas. Esto parece lógico, ya que a bajas temperaturas, como ya se comentó anteriormente, el incremento de los niveles de HUFAs en los lípidos de membrana aumenta la tendencia a la oxidación de estos ácidos grasos (Woodward, 1994).

Con respecto a la ingesta, se ha demostrado que los niveles de vitamina en tejidos (hígado, músculo) y plasma tienen una relación directa con los de la dieta (Gatlin III *et al.*, 1992).

La principal **función** de la vitamina E es antioxidante, previniendo el deterioro de membranas celulares y manteniendo la permeabilidad de capilares y músculo cardíaco así como de la membrana de embriones favoreciendo su viabilidad (Halver, 1972).

En relación a su efecto en el crecimiento, en dietas suplementadas con vitamina E, Tocher *et al.* (2002) demostraron que se producía un aumento de la tasa de crecimiento instantáneo (TCI) y de la supervivencia en doradas. En tilapia (Roem *et al.*, 1990; Thorarinsson *et al.*, 1994) también se comprobó que suplementos o deficiencias de esta vitamina mejoraban o disminuían el crecimiento, respectivamente. Pero existen otros experimentos en los que carencias de esta vitamina no afectaron negativamente al crecimiento, como se observó en trucha (Cowey, 1983, 1986), seriola (*Seriola quinqueradiata*) (Ito *et al.*, 1999), rodaballo (Stéphan *et al.*, 1995) y lubina (Gatta *et al.*, 2000). En cuanto al índice hepatosomático, se ha comprobado que guarda una relación inversa con la vitamina E. Esto podría deberse a un aumento en el peso del hígado asociado a un posible depósito de moléculas grasas oxidadas (Thorarinsson *et al.*, 1994; Tocher *et al.*, 2002).

El mejor indicador clínico de la **carencia** de vitamina E es un aumento en la fragilidad de los eritrocitos, también puede aparecer anemia, xeroftalmia, distrofia muscular, fusión de lamelas en branquias, cataratas y depósitos ceroides en hígado (Halver, 1972; Bell y Cowey, 1985).

## 5.2. VITAMINA C

Las necesidades de esta vitamina en la trucha están en torno a unos 100-1000 mg/Kg dieta y van a depender de muchos factores como la composición de la dieta, contaminantes, agentes estresantes, etc. (Halver, 1985; Woodward, 1994). Algunos peces como la carpa y el esturión (*Acipenser fulvescens*) poseen la maquinaria enzimática necesaria para sintetizar esta vitamina (Moreau *et al.*, 1999), pero los salmónidos dependen de su administración en la dieta (Mæland y Waagbø, 1998). La distribución en tejidos demostró niveles más altos en hígado y riñón en relación al músculo (Alexis *et al.*, 1999).

Además de tener una **función** antioxidante y desintoxicante, la vitamina C interviene en la formación del colágeno, del cartílago y en la reparación y formación de huesos, así como en la cicatrización de heridas y en la maduración de glóbulos rojos (Halver, 1972).

Dietas carentes en vitamina C reflejaron valores bajos de EA, TCI e incremento de peso, viéndose también afectada la tasa de supervivencia (Gatlin III *et al.*, 1986; Chávez de Martínez, 1990; Chien *et al.*, 1999). Por el contrario, otros experimentos no revelaron efecto de la vitamina C en el crecimiento ni en la tasa de mortalidad (Andersen *et al.*, 1998; Sakakura *et al.*, 1998; Alexis *et al.*, 1999; Moreau *et al.*, 1999; Kolkovski *et al.*, 2000). A este respecto Henrique *et al.* (1998) realizaron experimentos en los que, aunque la carencia de vitamina C no afectaba a la tasa de crecimiento instantáneo (TCI), se observó un descenso del ICA (índice de conversión del alimento) y un aumento del CEC (coeficiente de eficacia en el crecimiento) asociado a una mayor ingesta.

Existen casos en los que los niveles de vitamina C son tan bajos que generan una **deficiencia** de esta vitamina, esto viene acompañado de una serie de patologías como: hemorragias, anemia, erosión de piel y aletas, lesiones oculares y exoftalmia, inflamación, alteración en la síntesis de colágeno, escoliosis, etc. (Halver, 1972; Chávez de Martínez, 1990). Gapasin *et al.* (1998) pusieron de manifiesto deformaciones operculares en larvas alimentadas con dietas carentes de vitamina C.

Tanto la vitamina C como la E estimulan la respuesta inmune frente a patógenos, estando esto en relación con su papel protector de membranas de fagocitos, que ven incrementada su actividad (Obach y Laurencin, 1992; Kiron *et al.*, 1995), y en el caso de la vitamina E, también con la activación de las proteínas del complemento (Hardie *et al.*, 1990; Montero *et al.*, 2001b; Pearce *et al.*, 2003).

## **6. EL ESTRÉS OXIDATIVO**

La vida aerobia, tan necesaria para muchos seres vivos, trae consigo la inevitable formación de especies derivadas del oxígeno muy reactivas que pueden ocasionar graves daños en las principales moléculas biológicas. A este respecto, los organismos han desarrollado una serie de mecanismos antioxidantes de defensa, desde el punto de vista enzimático y molecular. Una situación de desequilibrio entre agentes oxidantes y sistemas de protección, a favor de los primeros, va a dar lugar a una situación de **estrés oxidativo** (Sies, 1985). Esto ocurre cuando la tasa de generación de radicales de oxígeno excede a la tasa de descomposición (Hermes-Lima *et al.*, 1998). Estas condiciones pueden estar influenciadas por una serie de factores externos como el contacto con agentes contaminantes y xenobióticos, influencias ambientales y nutricionales e incluso situaciones que generen una respuesta de estrés clásico, sensibilizando al animal y dando lugar a alteraciones en los mecanismos de respuesta antioxidante (Davies, 2000; George *et al.*, 2000b; Martínez-Álvarez *et al.*, 2002). De esta manera, la respuesta de estrés promovería una activación de las vías catabólicas, con fines energéticos, dando lugar un aumento de la tasa metabólica que favorecería la producción de radicales libres y que, en último término, podría desembocar en un desequilibrio de los sistemas antioxidantes (Ross *et al.*, 2001; Guerriero *et al.*, 2002).

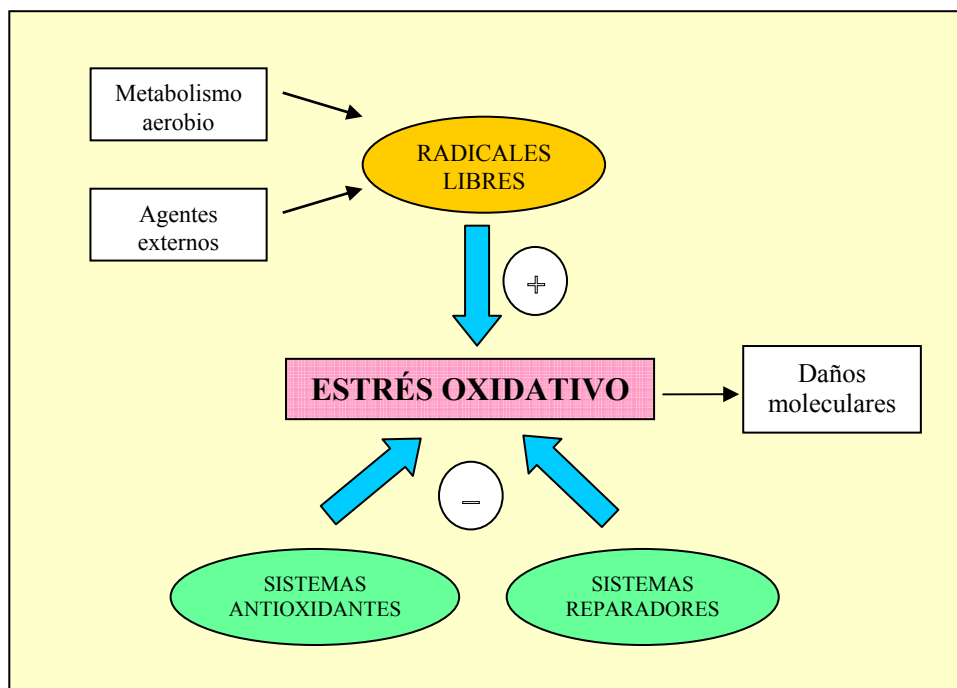


Figura II.6.- Factores implicados en la aparición del estrés oxidativo y sus consecuencias.

## 6.1. ASPECTOS GENERALES

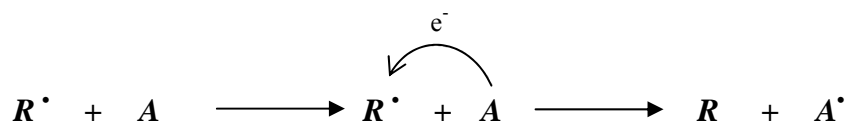
El oxígeno molecular es indispensable en los procesos metabólicos de los seres vivos aerobios. Como consecuencia del metabolismo endógeno y la acción de determinados factores externos se generan una serie de moléculas especialmente reactivas llamadas **radicales libres** y que son las responsables de la toxicidad del oxígeno. De esta manera, se establece la llamada paradoja del oxígeno, ya que éste se presenta como un elemento necesario para la vida que a su vez puede ser el responsable del deterioro de ésta (Ahmad, 1995).

### 6.1.1. Radicales libres

Los radicales libres presentan uno o más electrones desapareados en un orbital atómico o molecular como consecuencia de la pérdida o ganancia de electrones ( $R^{\bullet}$ ). Esto los hace especialmente reactivos, ya que la necesidad de evitar tener electrones



desapareados les confiere una tendencia a captar electrones de otras moléculas (A), las cuales, al perder un electrón ( $A^\bullet$ ), quedarán con una reactividad mayor o menor que los primeros (Halliwell y Gutteridge, 2000).



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. En general, las moléculas reactivas derivadas del oxígeno pueden encuadrarse bajo el título de **especies de oxígeno reactivo** (*ROS*: reactive oxygen species). Por otro lado, aquellas derivadas de compuestos nitrogenados van a ser conocidas como **especies de nitrógeno reactivo** (*RNS*: reactive nitrogen species).

Entre dichas moléculas podemos destacar las siguientes:

-  **$O_2$  (oxígeno molecular)**: Presenta dos electrones desapareados (de ahí que no sería incorrecto expresarlo como  $O_2^{\bullet\bullet}$ ), estando cada uno de ellos en un orbital molecular y en sentido paralelo ( $\uparrow\uparrow$ ). Esto hace que pueda ser considerado como un biradical. Esta especie es muy poco reactiva ya que, siguiendo el principio de exclusión de Pauli, la captación conjunta de dos electrones con orientación antiparalela ( $\uparrow\downarrow$ ) con el fin de llenar el vacío electrónico en los orbitales no sería posible en este caso. De esta manera, la captación de electrones a partir del oxígeno molecular queda restringida a realizarse de uno en uno, dando lugar a otra serie de moléculas.

-  **$O_2^{\bullet-}$  (radical superóxido)**: Se produce por la captación de un electrón por parte del  $O_2$  quedando otro desapareado. Este radical es tanto un débil agente oxidante (captor de electrones) como reductor (cede electrones) en solución acuosa. Su forma protonada es  $HO_2^\bullet$  (hidroperóxido) que es más reactiva pero no muy abundante a pH fisiológico.

- **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno)**: En este caso la captación de otro electrón acaba con los electrones desapareados, de ahí que esta molécula no se considere propiamente un radical. Su importancia se debe a que puede intervenir en reacciones de síntesis de otros radicales debido a la debilidad de su enlace entre los átomos de oxígeno. Se forma a partir de reacciones de dismutación del O<sub>2</sub><sup>·-</sup> y, a diferencia de éste, atraviesa fácilmente las membranas celulares lo que favorece su acción frente a determinadas moléculas.

- **·OH (radical hidroxilo)**: Radical muy activo, presenta un electrón desapareado lo que le confiere una alta reactividad para captar electrones de otras moléculas. Se origina principalmente a partir del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con la intervención de una serie de agentes donadores de electrones como se verá más adelante. Este radical es el principal responsable directo de la oxidación de biomoléculas.

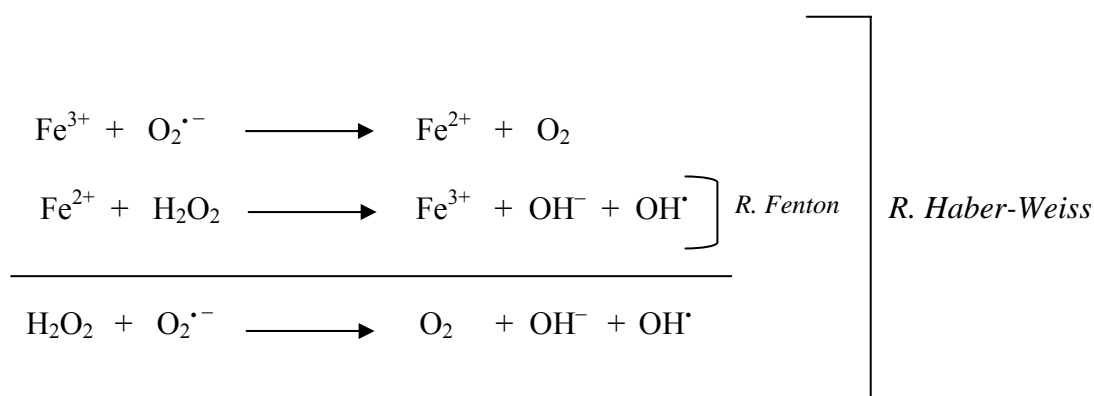
- **<sup>1</sup>O<sub>2</sub> (oxígeno singlete)**: En esta molécula los dos electrones desapareados del oxígeno se juntan en un mismo orbital estableciendo una configuración antiparalela (↑↓). Aunque no sea exactamente un radical libre la capacidad para captar dos electrones antiparalelos (a diferencia del oxígeno molecular) le confiere gran reactividad y carácter oxidante.

- **HOCl/ OCl<sup>-</sup> (ácido hipocloroso / ión hipoclorito)**, puede oxidar protones y generar oxidantes secundarios como las cloraminas. **NO<sub>2</sub><sup>·-</sup> (dióxido de nitrógeno)**, **NO<sup>·</sup> (óxido nítrico)**, **O<sub>3</sub> (ozono)** son también agentes que pueden ejercer una acción oxidante. Muchas de ellas no sólo tienen un origen endógeno sino que están asociadas a contaminantes ambientales (Davies, 2000).

### 6.1.2. Metales de transición

Es interesante destacar su papel en los procesos de oxidación-reducción que darán lugar a radicales libres. Esto es debido a la capacidad que presentan estos elementos para ceder electrones a otras moléculas.

De esta manera, la **reacción de Fenton** permite que, tras la rotura del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se forme <sup>•</sup>OH con intervención de un metal de transición que cede un electrón. Por otro lado el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> facilita que el hierro se acumule en forma Fe<sup>2+</sup>, lo que le confiere una predisposición como donador de electrones. Ambas reacciones en conjunto van a dar lugar a la **reacción de Haber-Weiss** que también podría definirse como la reacción de Fenton asistida por el superóxido. Esta reacción es de gran importancia ya que implica la formación de radicales hidroxilo que, como ya se ha visto, presentan gran reactividad. El cobre también puede ejercer de donador de electrones pasando a una forma más oxidada (de Cu<sup>+</sup> a Cu<sup>2+</sup>) (Halliwell y Gutteridge, 2000).



### 6.1.3. Origen de los radicales libres

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

1) Reacciones electromagnéticas o fotoquímicas pueden dar lugar a <sup>•</sup>OH y <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

2) Reacciones endógenas de dismutación (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y Fenton (<sup>•</sup>OH).

3) Reacciones de otras enzimas como la xantina oxidasa (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) y la urato oxidasa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que intervienen a en las vías de degradación de purinas, o la acil-CoA oxidasa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), asociada a la β-oxidación peroxisomal.

4) Reacciones asociadas a la actividad de células fagocíticas que generan  $O_2^{\cdot -}$  por la acción de la NADPH oxidasa con intervención del NADPH. Shiibashi e Iida (2001) recientemente han puesto de manifiesto en peces la posible intervención del NADH como donador de electrones.

5) En el proceso de unión del  $O_2$  a la hemoglobina se forma un intermediario (oxihemoglobina) que a veces puede liberar  $O_2^{\cdot -}$  quedando la hemoglobina en forma no funcional (metahemoglobina) pero en un estado reversible.

6) Las mitocondrias son uno de los principales puntos de generación de radicales libres y más concretamente de  $O_2^{\cdot -}$  que, posteriormente, por reacciones de dismutación puede formar  $H_2O_2$ .

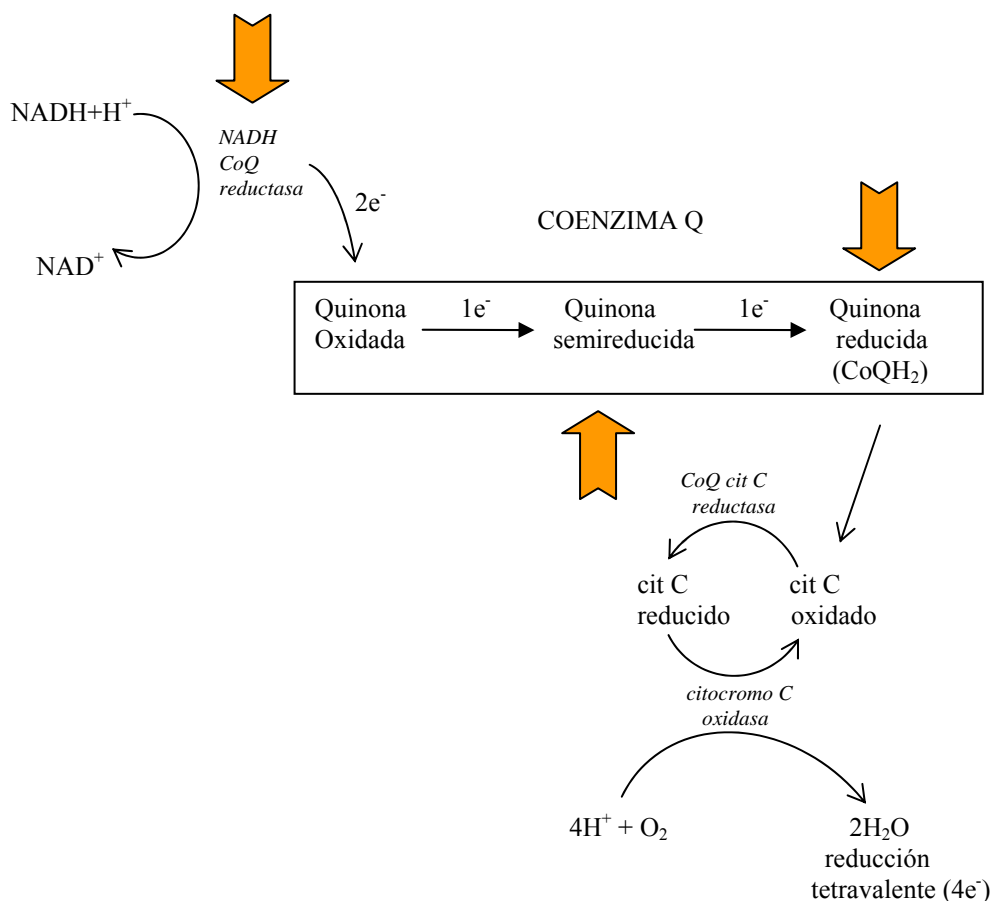


Figura II.7.- Formación de radicales de oxígeno en la CTE mitocondrial.

La cadena de transporte electrónico (CTE) es un proceso destinado a la obtención de energía a partir de coenzimas reducidos ( $\text{NADH}+\text{H}^+$ ,  $\text{FADH}_2$ ) que culmina con la oxidación tetravalente del oxígeno para generar dos moléculas de agua por acción de la citocromo C oxidasa. A veces la reducción del oxígeno no es completa, por la pérdida de electrones en algún punto más susceptible de la cadena (flechas naranja en Figura II.7), lo que lleva a la formación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .

En el núcleo se localiza una CTE en la cual una producción de radicales libres podría ser aún mas nociva debido a su cercanía al ADN.

7) En el retículo endoplasmático se localiza el citocromo P-450, molécula que interviene en la oxidación de un gran número de compuestos (medicamentos, insecticidas, etanol, etc.) a expensas del oxígeno molecular. En estas reacciones de transferencia de electrones pueden producirse captaciones monovalentes por parte del  $\text{O}_2$  generándose radicales libres.

**B) En cuanto al origen de especies de nitrógeno reactivo**, debemos destacar el papel fundamental que juega la enzima NOS (óxido nítrico sintasa).

La NOS cataliza la síntesis de óxido nítrico ( $\text{NO}^{\cdot}$ ) a partir de arginina,  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  y  $\text{O}_2$ , obteniéndose como producto citrulina,  $\text{NADP}^+$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Existen tres isoformas de esta enzima, la *nNOS* (encontrada en tejidos neuronales), la *eNOS* (encontrada en tejidos endoteliales) y la *iNOS* (de carácter inducible, encontrada en diversos tejidos y con función defensiva frente a patógenos). Todas ellas son diméricas y presentan en su estructura calmodulina, siendo la actividad de las dos primeras dependiente de calcio (Laing *et al.*, 1999; Alderton *et al.*, 2001).

Es interesante destacar el papel de la *iNOS* como enzima generadora de radicales libres, utilizados como mecanismo de defensa frente a patógenos. La actividad de esta enzima se ha puesto de manifiesto en diversas especies, existiendo estudios en trucha arco iris en los que se ha detectado su presencia en tejido hepático y renal, asociada a un

incremento de los niveles de óxido nítrico en respuesta a determinados agentes infecciosos (Laing *et al.*, 1999; Barroso *et al.*, 2000). Por otro lado, el NO<sup>•</sup> formado puede favorecer una mayor producción de radicales libres derivados del nitrógeno, al reaccionar con O<sub>2</sub><sup>•-</sup> dando lugar a compuestos de gran reactividad como el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (Wink y Mitchell, 1998).

El estudio de esta enzima ofrece perspectivas en la acuicultura, ya que la producción de NO<sup>•</sup> establecería el papel potencial de la expresión de la iNOS en los mecanismos de defensa de los peces (Barroso *et al.*, 2000). Además, los experimentos de Saeij *et al.* (2002) en trucha arco iris sometidas a estrés diario por manipulación, muestran variaciones en la expresión de esta enzima, las cuales podrían ser un reflejo de alteraciones en los animales, en muchos casos asociadas a una posible situación de estrés.

#### **6.1.4. Defensas antioxidantes**

Los organismos vivos utilizan una variedad de mecanismos antioxidantes para hacer frente a los efectos nocivos de las especies de oxígeno reactivo. De esta manera, existen moléculas exógenas o de síntesis endógena y determinadas enzimas destinadas a interceptar o inactivar los radicales libres (Cadenas, 1995).

##### **6.1.4.1. 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) y que pueden encontrarse tanto en la fracción acuosa como lipídica.

##### **Entre las moléculas hidrosolubles destacamos:**

- **Glutation (GSH):** Molécula que se oxida a la forma GSSG evitando así que esto ocurra en otras moléculas más importantes. Es sustrato de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa y dehidroascorbato reductasa como se verá más adelante. Presenta un papel fundamental como protector de glóbulos rojos regulando el grado de deformidad de

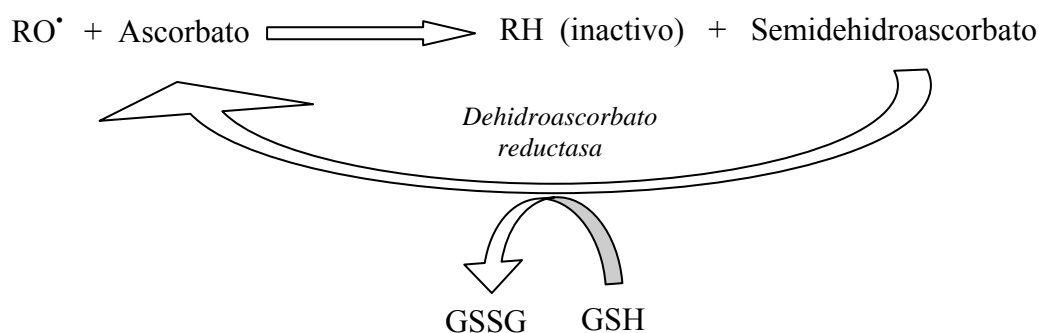
sus membranas (Kurata *et al.*, 1994). Destaca su importancia en la regeneración directa de la vitamina C (Hamre *et al.*, 1997).

- **Ácido úrico:** Producto resultante del metabolismo de purinas. Capta especies de oxígeno reactivo del tipo  $\cdot\text{OH}$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{RO}_2\cdot$  (peroxilo) y  $\text{HOCl}$ . Los productos de su oxidación son menos reactivos y dañinos que los oxidantes.

- **Proteínas captadoras de iones metálicos:** Entre las que se encuentran la **ferritina**, **transferina** (de hierro), **ceruloplasmina**, **albúmina** e **histidina** (de cobre), **metalotioneínas**, estas últimas, como ya se vio, estimuladas por glucocorticoides, catecolaminas y glucagón, que se asocian al mantenimiento de la homeostasis del Cu y Zn, la detoxificación de metales no esenciales como Cd y Hg, así como la captación de  $\cdot\text{OH}$  y  $^1\text{O}_2$ .

- **Vitamina C o ácido ascórbico:** Actúa como agente reductor, inactivando diversas moléculas oxidantes como  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{HO}_2\cdot$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$  dando lugar a semidehidroascorbato (forma oxidada de la vitamina C). Su actividad se puso de manifiesto en experimentos realizados en pez gato sometido a situaciones oxidantes (Parihar y Dubey, 1995).

La recuperación a ascorbato se realiza por la dehidroascorbato reductasa tomando como donador de protones al GSH.



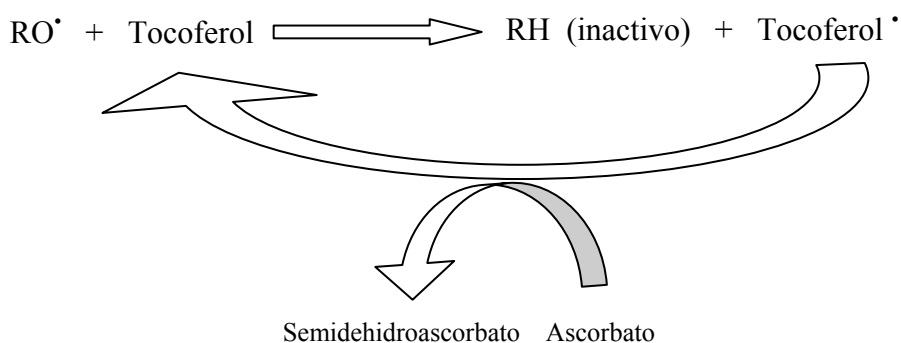
La vitamina C también puede tener, en algunos casos, un papel prooxidante, ya que reduce el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  que, por la reacción de Fenton, puede estimular la formación de  $\cdot\text{OH}$  en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Woodward, 1994).

### **En cuanto a moléculas liposolubles encontramos:**

- **Ubiquinonas y  $\beta$ -carotenos:** Los  $\beta$ -carotenos son derivados de la vitamina A (ácido retinoico) que actúan quelando al oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) y reaccionan con radicales peroxilo ( $\text{RO}_2\cdot$ ) y alcoxilo ( $\text{RO}\cdot$ ) interrumpiendo las reacciones de peroxidación lipídica (Halliwell y Gutteridge, 2000). Diversos estudios han demostrado su papel antioxidante, aunque recientemente se ha puesto en duda sus beneficios como suplemento dietario (Davies, 2000). La ubiquinona o Coenzima Q (UQ), además del papel que ejerce como componente de la CTE mitocondrial, en su forma reducida (ubiquinol;  $\text{UQH}_2$ ) actúa como un importante antioxidante en las membranas (Cadenas, 1995).

- **Vitamina E o tocoferol:** Se conocen varios tocoferoles con diferente actividad; los cuatro más importantes son el  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , siendo el  $\alpha$ -tocopherol el más activo y abundante. Reacciona con grupos  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{HO}_2\cdot$ ,  $\text{O}_2\cdot^-$  y su actividad antioxidante radica en que, como consecuencia de su oxidación, se produce un radical libre mucho menos reactivo ya que el electrón libre queda deslocalizado en el anillo aromático que forma la molécula. Su carácter liposoluble determina que su función antioxidante se ejerza principalmente en los lípidos de membrana evitando la propagación en cadena de la peroxidación de lípidos por la actuación de radicales  $\text{RO}_2\cdot$  y  $\text{RO}\cdot$  (Bell y Cowey, 1985). 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.*, 2000a).





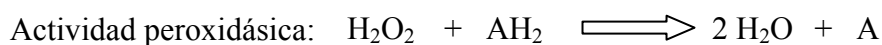
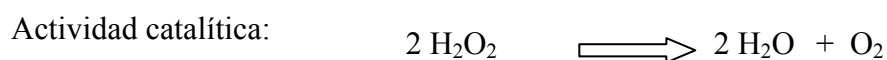
Es interesante destacar el papel del ácido ascórbico en la regeneración del tocoferol oxidado, poniéndose de manifiesto un efecto sinérgico entre ambas vitaminas (Halliwell y Gutteridge, 2000). Esto se reflejó en experimentos realizados con esturión (Moureau., 1999) y seriola (Ito *et al.*, 1999), donde carencias de vitamina C provocaban una acumulación de radicales de vitamina E que podrían ejercer un efecto prooxidante.

#### 6.1.4.2. Enzimas antioxidantes

Estos enzimas son de gran importancia en la vida aerobia, demostrándose un incremento de su actividad asociado a niveles altos de oxígeno ambiental ya que, en estas condiciones, se favorece la formación de especies de oxígeno reactivo (Cadenas, 1995; Felton, 1995; Liebler y Reed, 1997). Los estudios de Rudneva (1997) pusieron de manifiesto la importancia de la aparición de estos sistemas enzimáticos antioxidantes en vertebrados marinos más evolucionados taxonómicamente, cobrando mayor importancia las moléculas antioxidantes en animales más primitivos.

### CATALASA

Esta enzima cataliza dos tipos de reacciones:



La catalasa (CAT) está presente en casi todos los tejidos animales y especialmente en hígado y eritrocitos, presentando baja actividad en cerebro, corazón y músculo. En concreto, se ha encontrado actividad catalasa en peroxisomas, asociada a la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante la  $\beta$ -oxidación, observándose niveles casi inexistentes en mitocondrias y retículo endoplasmático. En su estructura presenta 4 subunidades y en cada una de ellas un grupo hemo con  $\text{Fe}^{3+}$ . La actividad catalasa se inhibe principalmente por cianuro, azida y aminotriazol.

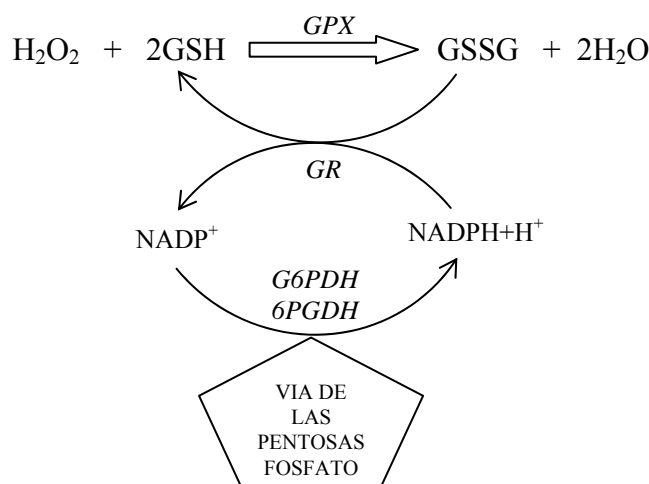
### GLUTATION PEROXIDASA

La glutation peroxidasa (GPX) cataliza la oxidación de GSH a GSSG a expensas de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esta enzima también interviene en la captación de moléculas procedentes de la oxidación de lípidos de membrana (peróxidos lipídicos) que pueden tener un papel oxidante, observándose este efecto en experimentos realizados con extractos hepáticos de trucha arco iris (Nakano *et al.*, 1999).

Esta enzima está presente en casi todos los tejidos, presentando gran actividad en hígado seguido de corazón, pulmón y cerebro y presentando baja actividad en músculo. Se encuentra principalmente en el citosol, aunque también se ha encontrado en mitocondrias. Presenta 4 subunidades con un átomo de selenio en el sitio activo de cada una de ellas.

La regeneración del glutation reducido (GSH) se realiza mediante la enzima glutation reductasa (GR) a expensas del  $\text{NADPH}+\text{H}^+$ . Este último es aportado por la “vía de las pentosas fosfato” (VíaPP) en la que intervienen enzimas que aportan NADPH como la G6PDH y 6PGDH (6-fosfogluconato deshidrogenasa). La actividad de estas enzimas es

estimulada por los niveles de  $\text{NADP}^+$ , los cuales se ven incrementados con la actividad glutatión reductasa y, en último extremo, glutatión peroxidasa.

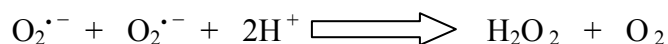


Ante la cuestión de cual de las dos enzimas (catalasa o glutatión peroxidasa) tiene una mayor eficacia antioxidante, la actuación de ambas sobre los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  está relacionada con la ubicación celular de cada una de ellas. Efectivamente, se ha observado en células hepáticas que cada enzima ejerce su función en el orgánulo donde se encuentra, la catalasa degrada  $\text{H}_2\text{O}_2$  de peroxisomas, mientras que la glutatión peroxidasa degrada el producido en citosol, mitocondrias y retículo endoplasmático. De hecho, variaciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en peroxisomas no provocaban cambios de actividad en la glutatión peroxidasa. Existen casos, como los encontrados en eritrocitos de mamíferos, en los que la ausencia de orgánulos podría explicar una actividad glutatión peroxidasa destinada a hacer frente a niveles bajos de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , mientras que la catalasa cobraría más importancia en casos de un aumento de  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracelular (Davies, 2000; Halliwell y Gutteridge, 2000).

## SUPERÓXIDO DISMUTASA

En este grupo se encuentran enzimas que catalizan la dismutación del  $\text{O}_2^{\cdot -}$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Efectivamente, en trucha se observó un aumento de la actividad SOD asociada a la

producción de  $O_2^{\cdot-}$  (Fitzgerald, 1992).



Encontramos tres tipos de enzimas SOD en función de los metales que forman parte de su centro activo:

- **CuZn-SOD:** Presenta dos subunidades, encontrándose en cada centro activo un átomo de  $Cu^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , interviniendo el primero en reacciones de transferencia de electrones y el segundo estabilizando a la enzima. Se encuentra principalmente en citosol, aunque también aparece en lisosomas y mitocondrias. Su actividad se inhibe por cianuro,  $H_2O_2$  y dietiltiocarbamato.

- **Mn-SOD:** En células procariotas presenta 4 subunidades con un átomo de  $Mn^{3+}$  en el centro activo. Es una enzima principalmente de localización mitocondrial y, al contrario que la CuZn, no se inhibe por cianuro,  $H_2O_2$  o dietiltiocarbamato y sí por cloroformo y metanol.

- **Fe-SOD:** Es exclusiva de bacterias, plantas y algas. En general es dimérica y contiene uno o dos átomos de  $Fe^{3+}$  por molécula. No se inhibe por cianuro y sí por  $H_2O_2$ , cloroformo y metanol.

Los niveles de iones metálicos son de gran importancia como cofactores de enzimas antioxidantes, hasta tal punto de que una deficiencia de éstos puede afectar a la efectividad de estas enzimas como veremos más adelante. De hecho, se ha comprobado que niveles bajos de Cu o Mn pueden incrementar la síntesis de Mn-SOD o CuZn-SOD respectivamente.

Las moléculas y enzimas antioxidantes operan en conjunto contra la toxicidad del oxígeno, observándose un efecto regulador entre ellas, ya que un descenso en la actividad

SOD va asociado a una menor GPX y catalasa, lo que podría deberse a una posible inactivación de estas enzimas por parte del  $O_2^{\cdot -}$  acumulado. De igual manera, un incremento de  $H_2O_2$ , asociado a baja actividad catalasa y GPX, también puede ejercer un efecto inhibitor en la actividad SOD (Halliwell y Gutteridge, 2000).

En resumen, en condiciones normales el organismo está generando especies de oxígeno reactivo (ROS) que son eliminadas por la acción de defensas antioxidantes. Las enzimas antioxidantes juegan un papel fundamental en la prevención de los daños oxidativos, y catalizan una serie de reacciones secuenciales con el fin de asegurar la mayor protección frente a las distintas ROS (ver Figura II.9.).

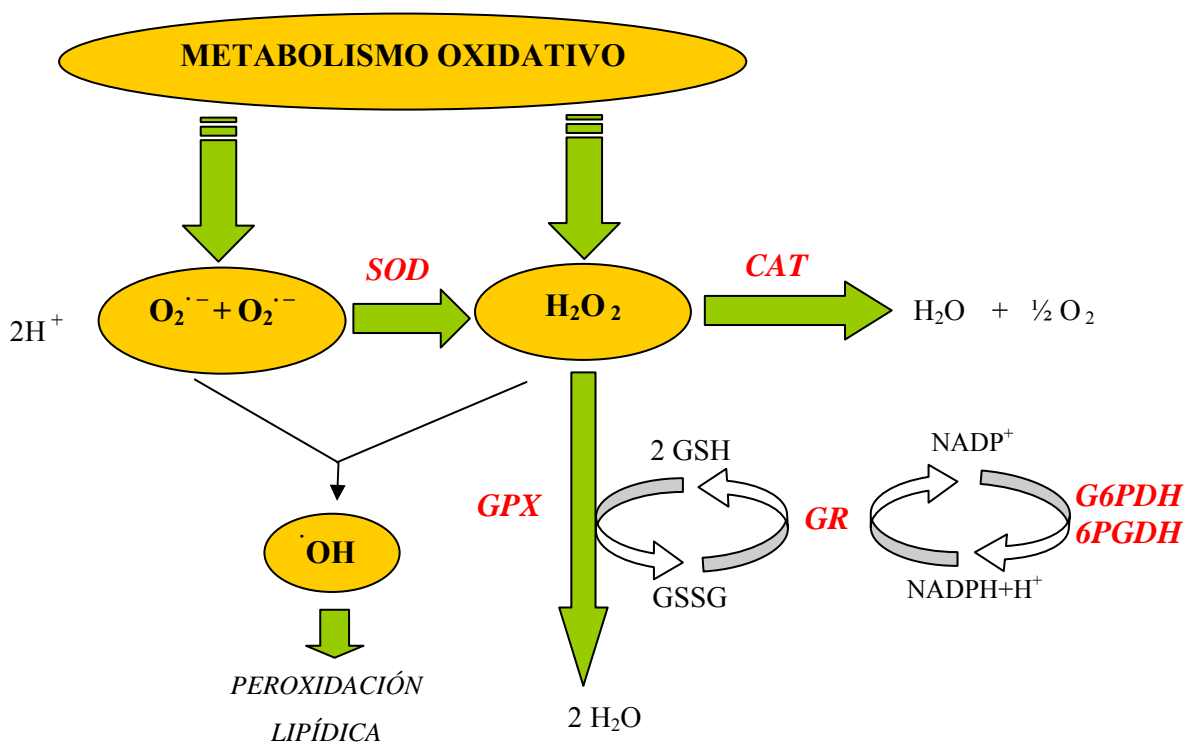


Figura II.9.- Actividad superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa (GR) y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) en la eliminación del ión superóxido y del peróxido de hidrógeno.

### 6.1.5. Peroxidación lipídica

Una de las biomoléculas que pueden verse más afectadas por el ataque de los radicales libres son los fosfolípidos de membrana, y especialmente aquellos que presentan insaturaciones. La peroxidación se produce por el ataque de una molécula lo suficientemente reactiva como para extraer un H de un ácido graso poliinsaturado (PUFA) 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. Los grupos  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{HO}_2\cdot$  son más reactivos que el  $\text{O}_2\cdot^-$ , ya que este último presenta gran dificultad para atravesar membranas lipídicas.

La peroxidación lipídica consta de una *fase de iniciación* en la que, por acción de radicales libres, se forma un radical lipídico ( $\text{R}\cdot$ ) que, en presencia de oxígeno, genera un radical peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ). Este radical es muy susceptible de extraer hidrógenos a otros lípidos generándose, como consecuencia de su acción, un hidroperóxido ( $\text{ROOH}$ ) y, de nuevo, un radical lipídico que iniciaría otra vez la secuencia de reacciones en la *fase de propagación*. Los hidroperóxidos, por una serie de reacciones de fragmentación, generan compuestos como el malondialdehído (MDA) que pueden ejercer un ataque sobre determinadas moléculas (Bell y Cowey, 1985; Halliwell y Gutteridge, 2000). En peces, Tanaka *et al.* (1999) ya pusieron de manifiesto la aparición de peróxidos de lípidos asociados a la oxidación de membranas. La *fase de terminación* ocurriría cuando los radicales interaccionan entre sí o cuando un antioxidante cede el H a un radical peroxilo (Cowey *et al.*, 1986).

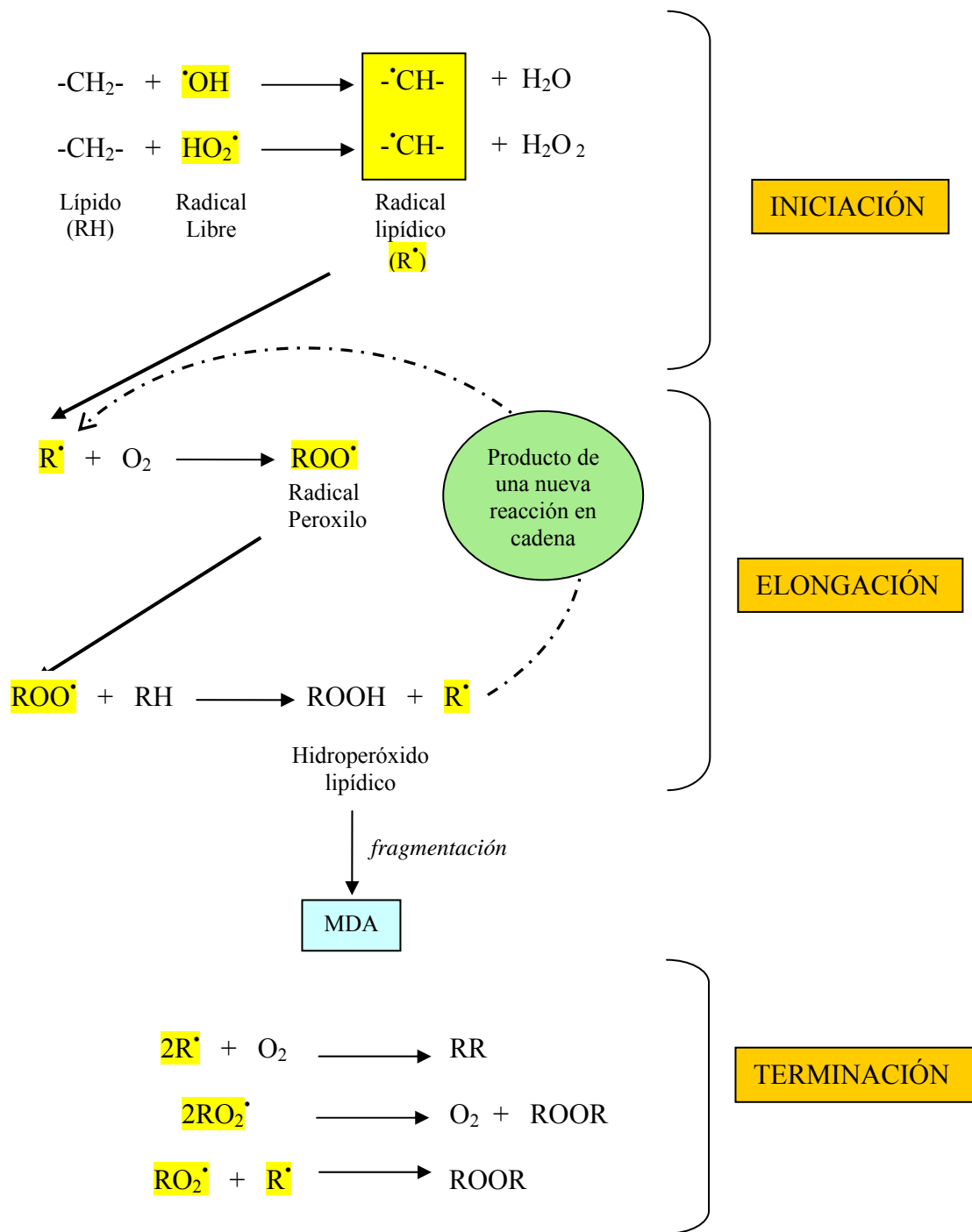
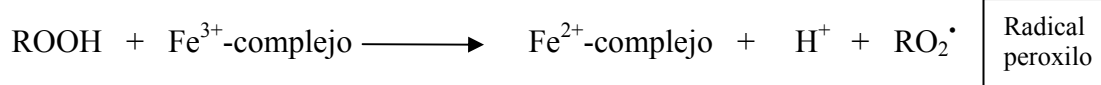
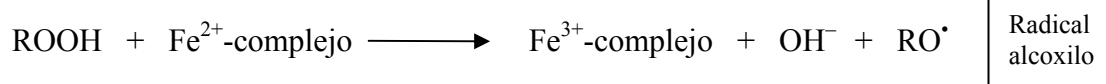


Figura II.8.- Etapas de la peroxidación lipídica

Es interesante destacar que el  $\text{Fe}^{2+/3+}$ , además de intervenir en la producción de  $\cdot\text{OH}$ , puede actuar sobre los peróxidos ( $\text{ROOH}$ ) dando lugar a radicales  $\text{RO}\cdot$  y  $\text{RO}_2\cdot$ . Ambos radicales pueden a su vez estimular la peroxidación lipídica en ausencia de  $\cdot\text{OH}$  y  $\text{HO}_2\cdot$ .



También moléculas de  $^1\text{O}_2$ , producidas en condiciones de iluminación de PUFAs, pueden dar lugar a un desplazamiento de dobles enlaces generando  $\text{ROOH}$ . El  $\text{O}_3$  también puede dar lugar a especies reactivas que estimulen la peroxidación.

**En eritrocitos** se dan circunstancias que los hacen especialmente susceptibles a la oxidación: la presencia de la hemoglobina y el contacto con el oxígeno, membranas celulares ricas en PUFAs, canales iónicos que facilitan la entrada de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , ya que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  pasa fácilmente a través de membranas, presencia de Fe en la hemoglobina que puede intervenir en reacciones de Fenton y peroxidación. Sin embargo, estas células han desarrollado sistemas que las hacen altamente resistentes a la peroxidación, como es una gran riqueza de CAT, SOD, GPX y GR, enzimas proteolíticas que rompen 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).

En resumen, podemos establecer que la **protección de membranas frente a la peroxidación lipídica** va a depender de dos aspectos: la estructura y composición de las membranas y la presencia de antioxidantes, entendiendo por ellos cualquier sustancia que, en proporciones más bajas que otra oxidable, es capaz de inhibir o disminuir la oxidación de la primera (Halliwell y Gutteridge, 2000) (ver Tabla II.3):



Tabla II.3. Aspectos que determinan la predisposición a la peroxidación en membranas.

| ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE MEMBRANAS  | ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE   |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>- Influencia del colesterol.</li><li>-Tipos de fosfolípidos y ácidos grasos. Niveles de PUFAs.</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>- Evitando la reacción de iniciación en la peroxidación (secuestro de <math>\cdot\text{OH}</math>) y reacciones asociadas.</li><li>- Quelando iones metálicos para evitar la formación de radicales libres asociados a ellos (<math>\cdot\text{OH}</math>, <math>\text{RO}\cdot</math> y <math>\text{RO}_2\cdot</math>).</li><li>-Decomponiendo peróxidos para dar lugar a moléculas no radicales.</li></ul> |

### 6.1.6. Daños causados a biomoléculas

Los efectos derivados de la oxidación se ejercen sobre las principales biomoléculas (Halliwell y Gutteridge, 2000; Davies, 2000):

- **Proteínas:** Aparición de enlaces disulfuro (S-S) que las inactivan, insolubilizan, etc.
  
- **ADN/ARN:** Oxidación de bases, enlaces DNA-DNA y DNA-proteínas, mutilación de bases, rotura de filamentos, alteraciones e intercambio de cromátidas. Parte de estos efectos se reflejaron en experimentos con eritrocitos de trucha sometidos a situaciones oxidantes (Villarini *et al.*, 1991; Ploch *et al.*, 1999).
  
- **Lípidos:** Tras la peroxidación se insolubilizan, disminuye la permeabilidad selectiva y pérdida de la integridad de membranas. Los productos de la peroxidación también intervienen en la formación de los enlaces cruzados entre aminoácidos y entre aminoácidos y DNA (Nair *et al.*, 1986).

### 6.1.7. Sistemas reparadores

Es interesante destacar que, como una segunda línea de ataque o defensa, existen una serie de enzimas que, si bien no evitan el ataque de los radicales libres, pueden reparar los daños causados por éstos (Cadenas, 1995).

Existen enzimas que actúan de manera **directa**, reduciendo los puentes S-S (disulfuro reductasa) o reparando la metionina oxidada en las proteínas (metionina sulfóxido reductasa), transformando productos de la peroxidación en conjugados menos tóxicos (glutathion transferasa), reparando los hidroperóxidos en lípidos y DNA (peroxidasas), reparando bases metiladas (DNA metilasa), etc.

Otras enzimas actúan de manera **indirecta** eliminando las moléculas deterioradas como aminoácidos (proteasas), lípidos oxidados (fosfolipasa A<sub>2</sub>) y bases oxidadas (DNA glicosilasas), sustituyéndolas después por otras en buen estado (Davies, 2000).

## 6.2. FACTORES QUE AFECTAN A LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE EN LOS PECES

La respuesta antioxidante es un mecanismo de protección molecular frente a ciertos cambios desencadenados en el organismo. Se podría decir que, en cierto modo, es un proceso de adaptación a aquellas circunstancias que pueden llegar a causar un desequilibrio en los procesos oxidantes/antioxidantes (Otto y Moon, 1996; Rudneva, 1999).

### 6.2.1. Tasa metabólica y consumo de oxígeno

Existen diversos factores como el momento del ciclo de vida, cambios en la actividad natatoria, en el hábitat, en la temperatura (estacionales, migraciones, etc.), de luminosidad o incluso determinadas circunstancias estresantes o de hiperoxia, que pueden

dar lugar a variaciones en la actividad de enzimas antioxidantes (Fitzgerald, 1992; Palace y Klaverkamp, 1993; Wihelm Filho *et al.*, 1993; Rudneva, 1997; Ross *et al.*, 2001) y en los niveles de vitaminas E y C (Hamre *et al.*, 1997). Estas variaciones serían la respuesta a una mayor actividad metabólica o al aumento del consumo de oxígeno, que se asociaría a una mayor tasa de producción de ROS (Rudneva, 1997, 1999).

A lo largo de las etapas del desarrollo embrionario, donde hay un aumento de las necesidades de oxígeno, se puso de manifiesto una puesta en marcha de los mecanismos antioxidantes, inicialmente por medio de moléculas de bajo peso molecular (GSH, vitaminas A, E y K y carotenoides) y que, a lo largo de la embriogénesis, irían cediendo su importancia a los sistemas enzimáticos antioxidantes con un incremento de la actividad SOD, CAT, GPX y GR (Rudneva, 1999). Efectivamente, diversos autores (Merchie *et al.*, 1997; Sakakura *et al.*, 1998) han puesto de manifiesto un incremento en las necesidades de vitamina C en las primeras etapas del desarrollo de los peces. Por otro lado, Otto y Moon (1996) encontraron un efecto de la edad en el debilitamiento de estos sistemas antioxidantes, lo que se traduciría en procesos de envejecimiento asociados a la oxidación molecular.

Existen peces que a lo largo de su vida pasan por grandes cambios en la saturación de oxígeno del medio. Esto les ha llevado a desarrollar mecanismos de protección frente a los daños celulares asociados a los procesos rápidos de reoxigenación que implican una alta producción de radicales libres. A este respecto, se observó en carpas una alta actividad SOD en etapas de carencia de oxígeno, como medida preventiva frente a un posterior aumento en los niveles de oxígeno (Hermes-Lima, 1998). Sin embargo, en el carpín dorado (*Carassius auratus*) no se encontraron variaciones en la SOD aunque sí en la actividad CAT, GPX y G6PDH hepáticas que, si bien no fueron suficientes para evitar la peroxidación en algunos tejidos, permitieron que fuera controlada hasta niveles tolerantes (Lushchak *et al.*, 2001). Esto puede explicar que existan especies con una mejor capacidad de adaptación a cambios de oxígeno ambiental y que presenten cierta resistencia a la peroxidación lipídica, como es el caso del pez gato (Ploch *et al.*, 1999) y la carpa (Hai *et al.*, 1997). Algo similar se observó en animales adaptados a ambientes con mayor

intensidad de radiaciones ultravioleta, en los que se observó un aumento en la actividad SOD (Fitzgerald, 1992).

Se ha comprobado que el ejercicio exhaustivo es una situación de gran demanda de oxígeno que genera un aumento en la actividad GPX, asociado a un descenso de GSH en hígado, debido a su utilización en otros tejidos donde es requerido (Voces *et al.*, 1999). También, asociada al ejercicio, se ha observado una respuesta diferencial entre tejidos, con un aumento en la actividad SOD en sangre, corazón y músculo rojo, en los que se producía un mayor consumo de oxígeno (Wihelm Filho *et al.*, 1993).

En cuanto a descensos en la temperatura asociados a una menor concentración de oxígeno en el medio, Parihar y Dubey (1995) observaron en pez gato un aumento de ROS en aquellos órganos más susceptibles de oxidación como las branquias (con una mayor actividad fagocítica con fines defensivos) o la vejiga natatoria (con una mayor captación de oxígeno para reserva). Esto refleja la idea de que, ante situaciones oxidantes, aquellos tejidos menos preparados (como riñón y branquias) presentarán niveles de peroxidación superiores a otros con más recursos antioxidantes como es el hígado (Fatima *et al.*, 2000). De hecho, se ha comprobado que el hígado, como órgano con una gran actividad generadora de ROS, presenta mayores niveles de moléculas antioxidantes con respecto a otros tejidos (López-Torres *et al.*, 1993).

### **6.2.2. Influencia de agentes contaminantes**

Los metales y xenobióticos pueden estimular la producción de moléculas oxidantes mediante la puesta en marcha de reacciones desintoxicantes que generan a su vez radicales libres. A este respecto, existen numerosos estudios que ponen de manifiesto la importancia de las variaciones en el estatus antioxidante como indicativas de contaminación del medio acuático (Bainy *et al.*, 1996) que, en último extremo, se reflejarían con un aumento en los niveles de peróxidos lipídicos (Rudneva *et al.*, 1997; Ploch *et al.*, 1999).

Estudios realizados en diversas especies de peces pusieron de manifiesto un aumento en los niveles de hidroperóxidos lipídicos asociado a xenobióticos como insecticidas y herbicidas, etc. (Pedrajas *et al.*, 1995; Hai *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 1998 ; Palace *et al.*, 1998). En estos casos, la producción de ROS excede la capacidad de captación y eliminación de éstos pues, aunque haya una mayor actividad de las enzimas antioxidantes, esta, en muchos casos, es insuficiente. Así, la acción de contaminantes provoca un aumento en la actividad GPX, GR, SOD y/o CAT (Palace y Klavercamp, 1993; Lindström-Seppä, 1996; Pedrajas *et al.*, 1996; Hai *et al.*, 1997) que, en algunos casos, lograron evitar un aumento en la peroxidación (Hai *et al.*, 1997; Oruç y Üner, 2000). Por otro lado, truchas sometidas de manera continua a ambientes contaminados y que presentaban altos índices de peroxidación, mostraron niveles bajos de moléculas antioxidantes en los tejidos y no manifestaron un aumento en la actividad enzimática, lo que podría explicar una pérdida de las capacidades antioxidantes (Palace *et al.*, 1998).

En relación al efecto de metales, ya en mamíferos, Russanov *et al.* (1994) pusieron de manifiesto el efecto del vanadio sobre la peroxidación lipídica. Los experimentos realizados en peces también reflejan que metales como Cu y Cd favorecen la síntesis de radicales libres del oxígeno (Palace y Klavercamp, 1993) que pueden inducir un aumento en la actividad de enzimas antioxidantes (Gwoździński *et al.*, 1992; Palace y Klavercamp, 1993; Pedrajas *et al.*, 1996) u otras moléculas como GSH (Tort *et al.*, 1996), que en muchos casos nos son suficientes para evitar la peroxidación (Roméo *et al.*, 2000) provocando un deterioro de membranas como en el caso de los glóbulos rojos (Gwoździński *et al.*, 1992).

Por otro lado, Roméo *et al.* (2000) reflejaron un posible efecto inhibitor del Cd sobre la CAT al unirse a restos SH y de cómo el Cu contribuiría a su inactivación con la producción de radicales superóxido.

Pero también debemos entender que la administración de ciertos metales como el Cu, además de generar ROS puede favorecer la síntesis de enzimas con cofactores metálicos como es el caso de la CuZn-SOD, observándose un aumento de su actividad que

puede ir asociado a la aparición de formas isoenzimáticas, posiblemente por oxidación de los residuos de sus aminoácidos. Estas formas no tienen por qué perder la actividad y su aparición puede ser un buen indicador de estrés oxidativo (Pedrajas *et al.*, 1995).

Por último, metales y xenobióticos como ciertos derivados del arsénico (Schlenk *et al.*, 1997) pueden inducir la síntesis de metalotioneínas como sistemas captadores de metales y ROS (Pedrajas *et al.*, 1995 y Tort *et al.*, 1996) promoviendo un descenso en la peroxidación de tejidos (Fatima *et al.*, 2000).

### **6.2.3. Influencia de la composición de la dieta**

La actividad antioxidante no sólo es modulada por la presencia de ROS o xenobióticos sino que también va a estar influida por los componentes de la dieta, principalmente por los micronutrientes y, como ya se vió anteriormente, por la presencia de lípidos con mayor tendencia a la peroxidación (George *et al.*, 2000b).

Entre los micronutrientes dietarios están aquellas moléculas que tienen que ser aportadas en la dieta, como las vitaminas, carotenos, etc., así como los metales necesarios para la síntesis de enzimas antioxidantes. Los experimentos reflejan que se obtiene una mayor eficacia actuando en las vitaminas de la dieta que en los metales, aunque en el caso del selenio su suplementación daba lugar a un aumento en la actividad GPX (Jackson, 1994). De hecho, en salmónidos se observó un efecto sinérgico entre este metal y la vitamina E aumentando las barreras antioxidantes y estabilizando membranas (Thorarinsson *et al.*, 1994).

Un aspecto interesante es la influencia de los niveles de HUFAs en la dieta y la tendencia a la peroxidación que estos tienen, así como el papel protector que ejerce la vitamina E sobre ellos (Udilova *et al.*, 2003). Como ya se vio anteriormente, la relación Vit E/HUFA es crítica a la hora de considerar el potencial antioxidante que presentan los organismos, el cual aumenta con valores más altos del índice (Hamre y Lie, 1995; Mourente *et al.*, 2000). Numerosos estudios ponen de manifiesto que la ingesta de aceite de pescado rico en HUFAs se asocia a un descenso en los niveles de vitamina E y a un

aumento de la peroxidación que, en algunos casos, se previene por esta vitamina. Estos efectos se han puesto de manifiesto en experimentos realizados en mamíferos (Ibrahim *et al.*, 1999; Ando *et al.*, 2000) y en varias especies de peces como trucha arco iris (Cowey *et al.*, 1983; Cowey, 1986; Frigg *et al.*, 1990), pez gato (Gattlin III *et al.*, 1992), lubina (Gatta *et al.*, 2000), trucha alpina (*Salvelinus alpinus*) (Olsen y Henderson, 1997), rodaballo (Stéphan *et al.*, 1995), salmón Atlántico (Scaife *et al.*, 2000), seriola (Ito *et al.*, 1999) y esciéndidos como la corvina (*Sciaenops ocellatus*) (Craig *et al.*, 1999).

Por otro lado, se ha demostrado en mamíferos una posible estimulación de las enzimas antioxidantes por parte de los HUFAs (Venkatraman *et al.*, 1998; Ruiz-Gutiérrez, 1999). En peces, se ha observado que los HUFAs, asociados a un aumento de radicales lipídicos, daban lugar a una activación de las enzimas implicadas en la actividad desintoxicante del Citocromo 450 (Craig *et al.*, 1999), y que la suplementación con ácidos grasos saturados, monoinsaturados o poliinsaturados incrementaba el potencial antioxidante al aumentar la actividad de la SOD, CAT y GPX que, en el caso de los PUFAs, no fue suficiente para prevenir la peroxidación lipídica (Varghese y Oommen, 2000).

Experimentos con diversas especies de teleósteos como dorada, rodaballo, seriola, y halibut, demostraron que un descenso en los niveles de vitamina E en tejidos (ya sea por dietas carenciales o debido a su consumo como molécula antioxidante) provocaba una inducción en la actividad SOD, CAT y GPX con el fin de cubrir las necesidades de protección en aquellos tejidos más susceptibles de ser oxidados (Ito *et al.*, 1999; Tocher *et al.*, 2002). Esto explicaría el descenso en la actividad de enzimas antioxidantes observado en mamíferos alimentados con dietas con altos niveles de vitamina E (Atalay *et al.*, 2000). Por el contrario, en eritrocitos de ratas sometidas a los efectos oxidantes de pesticidas, se puso de manifiesto que la presencia de vitamina E en dieta favorecía el incremento de actividad SOD y catalasa asociado a un descenso en los niveles de peróxidos en estas células (John *et al.*, 2001).

Por otro lado, otros autores no encontraron una estimulación enzimática por parte de los HUFAs (Ibrahim *et al.*, 1997, 1999), lo que podría deberse a que la cantidad aportada en

dieta no fue suficiente para provocar este efecto (Luostarinen *et al.*, 2001). También, dietas ricas en HUFAs y carentes en vitamina E, que provocaron altos niveles de peróxidos en tejidos, no indujeron una activación de estas enzimas. En estos casos la actividad enzimática no se afectó por la dieta, lo que posiblemente fuera debido a que no se alcanzaron niveles tan severos en la relación Vit.E/HUFA como para promover su inducción (Mourente *et al.*, 1999, 2000).

Con respecto a la vitamina C, en mamíferos se ha demostrado su importante función antioxidante, observándose que, en situaciones de carencia de vitamina C, la presencia de vitamina E, GSH y de actividad SOD, CAT y GPX no prevenía un aumento en la peroxidación (Chakraborty *et al.*, 1994). Con relación a esto, se observó que suplementos de vitamina C y hierro aumentan la actividad catalasa en riñón de salmónidos (Andersen *et al.*, 1998).

Los experimentos de Nakano *et al.* (1999) en trucha arco iris, revelaron que el efecto de la suplementación de carotenoides en la dieta disminuía los niveles de peróxidos en hígado, lo que se explica como un posible efecto sinérgico entre carotenoides y vitamina E, ya que la presencia de los primeros reduce la pérdida de vitamina E por oxidación.

Por otro lado, niveles supraóptimos de HUFAs en la dieta pueden llegar a tener un efecto prooxidante en esos casos en los que la vitamina E sea insuficiente para evitar la peroxidación (Huang *et al.*, 1998; Olsen *et al.*, 1999; Oarada *et al.*, 2000). También un exceso en los niveles de vitamina E y/o C puede ser pernicioso al ejercer un efecto prooxidante, que puede dar lugar a un aumento en los niveles de peróxidos (Ito *et al.*, 1999; Moureau *et al.*, 1999). En seriola se ha comprobado que bajas concentraciones de vitamina C no permiten la total regeneración del radical  $\alpha$ -tocoferil a  $\alpha$ -tocoferol, lo que da lugar a la acumulación de este radical y que la vitamina E ejerza un efecto prooxidante (Ito *et al.*, 1999).



La oxidación de los HUFAs puede provocar variaciones en las proporciones de los distintos tipos de ácidos grasos, al producirse un descenso de estos asociado a un aumento de SAFAs (ácidos grasos saturados) y MUFAs (ácidos grasos monoinsaturados). Este efecto se previene en parte por la vitamina E (Stéphan *et al.*, 1995; Sant'Ana y Mancini-Filho, 2000; Tocher *et al.*, 2002). Por otro lado existen otros experimentos que no demostraron el efecto de la vitaminas E o C en la variación de los contenidos de ácidos grasos individuales en tejidos como músculo e hígado (Frigg *et al.*, 1990; Ito *et al.* 1999; Moreau *et al.*, 1999). En cuanto a la composición corporal, no se encontró influencia alguna del tipo de fuente grasa o de los niveles de vitamina E en experimentos realizados con rodaballo (Stéphan *et al.*, 1995) y lubina (Gatta *et al.*, 2000).

Con respecto a la influencia de los componentes de la dieta sobre los glóbulos rojos, el efecto es muy similar al observado en otros tejidos. En mamíferos se ha observado que el aporte en dieta de aceite de pescado rico en HUFAs, con respecto a los aceites vegetales, aumentaba la susceptibilidad de los glóbulos rojos a la oxidación. Este efecto era prevenido por la vitamina E (Ando *et al.*, 1998), aunque hay experimentos en los que dicha vitamina no evitó la senescencia de los glóbulos rojos y un mayor nivel de peroxidación, en aquellos animales alimentados con aceite de pescado con respecto a los alimentados con aceite de soja (Oarada *et al.*, 2000). Por el contrario, Olsen y Henderson (1997), observaron en salmónidos un efecto del 18:3n3 del aceite de soja sobre una mayor fragilidad y peroxidación de glóbulos rojos, similar al observado en dietas con altos niveles de HUFAs.

Es evidente que la carencia de vitamina E va a aumentar la fragilidad de los glóbulos rojos, como se observó en trucha y tilapia (Cowey *et al.*, 1983; Roem *et al.*, 1990) pero, en muchos casos, estos efectos no se asociaron a un descenso en los niveles de hematocrito y hemoglobina (Hardie *et al.*, 1990; Roem *et al.*, 1990) lo que podría deberse a que los glóbulos rojos maduros lisados eran compensados con un aumento de los inmaduros (Thorarinsson *et al.*, 1994). En cuanto a la vitamina C, Andersen *et al.* (1998) no encontraron en salmónidos ningún efecto sobre parámetros hematológicos como hematocrito, hemoglobina, recuento de glóbulos rojos, HCM, VCM y CCMH.

## **7. ESTRATEGIAS QUE TIENDEN A PALIAR LOS EFECTOS DE LOS AGENTES ESTRESANTES EN EL CULTIVO INTENSIVO**

Como hemos visto, en la práctica de la acuicultura existen ciertos factores inevitables que resultan estresantes de forma aguda (manipulación, vacunas, transporte, etc.) o crónica (deterioro de la calidad del agua, altas densidades de cultivo). Es bien sabido que una exposición repetida o continuada a estas situaciones determina que la respuesta de estrés pase de tener un carácter adaptativo a maladaptativo, repercutiendo en el buen desarrollo de los animales (crecimiento, capacidad de respuesta inmune, función reproductora) y, en último término, en la calidad de la carne.

Existen una serie de líneas de investigación encaminadas a buscar soluciones o estrategias que, si bien no eliminen totalmente los efectos negativos del estrés, al menos, minimicen sus posibles consecuencias sobre el buen desarrollo del animal. A este respecto, una actuación podría realizarse sobre el eje HHI, lo cual requiere un buen conocimiento del proceso endocrino en situaciones de estrés, localizando aquellos puntos en los que una intervención podría modificar la respuesta hormonal primaria. Por otro lado, otra vertiente iría dirigida a la utilización de dietas enriquecidas en determinados componentes que favorecieran una predisposición del animal para hacer frente a los posibles efectos negativos del estrés (Pickering, 1993a; Jackson, 1994).

### **7.1. SELECCIÓN GENÉTICA DE RAZAS CON UNA RESPUESTA DE ESTRÉS ATENUADA**

Existen diversos estudios dirigidos a considerar la magnitud de la respuesta de estrés como un rasgo determinado genéticamente, lo que posibilitaría hacer una selección de aquellos individuos con una baja intensidad de respuesta de estrés.

Los cultivos selectivos son una poderosa herramienta para incrementar la producción animal, mediante la selección de razas y subfamilias con diferente fenotipo, reforzando después el cultivo de los más adecuados (Refstie, 1990). Existen antecedentes en cuanto a la selección de determinados rasgos relacionados con el crecimiento, la eficacia alimentaria e índice de conversión del alimento, la maduración y eficacia reproductora, la resistencia a enfermedades e incluso la calidad de la carne. En algunos casos, las respuestas no fueron tan satisfactorias como en otros en los que sí se consiguió incrementar determinados aspectos (Gjedrem, 1992; Pottinger y Pickering, 1997).

Con relación a esto, cobran especial atención aquellos estudios dirigidos a seleccionar razas con mayor resistencia a enfermedades (Gjedrem *et al.*, 1991) ya que es una de las principales causas del descenso en la producción de las piscifactorías. Es en este contexto donde la respuesta de estrés es considerada como un rasgo de gran importancia en la selección de cultivos, debido a la clara relación existente entre estrés e inmunosupresión, lo que permitiría disponer de un criterio indirecto de selección de animales con más resistencia a las enfermedades. Este criterio de selección proporcionaría altos beneficios, ya que englobaría una mejora en aspectos como el crecimiento, reproducción y respuesta inmune (Pottinger y Pickering, 1997).

Los estudios de Mc.Geer *et al.* (1991) ya pusieron de manifiesto que al someter a seis cepas de salmón a diferentes tipos de estrés (alteraciones de pH, temperatura, salinidad, presencia de agentes infecciosos y manipulación) se producían diferencias entre ellas en cuanto a la capacidad para hacer frente a un determinado tipo de agente estresante. Como todos los animales se encontraban en las mismas condiciones ambientales, se presupone la existencia de un componente genético responsable de las diferencias observadas entre cepas.

Es bien conocido que la persistencia de una situación estresante va a repercutir en el buen desarrollo del animal. De esta manera, la alteración de los niveles de cortisol sería, en principio, un rasgo determinante a la hora de evaluar la intensidad de respuesta de estrés, donde estarían favorecidos aquellos individuos con una elevación de cortisol atenuada

(Pottinger *et al.*, 1992). Fevolden *et al.* (1993b) pusieron de manifiesto en trucha arco iris y salmón Atlántico la existencia de cierta heredabilidad en este carácter, estableciéndose un posible control genético con relación a la velocidad de respuesta del sistema endocrino, la concentración máxima de la hormona, su tasa de degradación o bien una combinación de todas estas variables (Heath y Bernier, 1993).

Mediante la selección de animales con una respuesta de cortisol atenuada (low response, LR) se podría llegar a pensar que se está favoreciendo una mayor capacidad de respuesta inmune frente a cualquier patógeno en general. Esto no parece confirmarse, ya que Fevolden *et al.*, (1992) demostraron que los animales seleccionados por su alta respuesta al estrés (high response, HR) eran más susceptibles a contraer furunculosis por *Aeromonas salmonicida*, frente a los LR que lo eran a contraer vibriosis por *Vibrio anguillarum*. Aunque experimentos posteriores (Fevolden *et al.*, 1993a) reflejaron una mayor tasa de mortalidad en los HR frente a ambos patógenos, no se encontró diferencia entre las dos líneas frente a *Renibacterium salmonidarum*, lo que nos da a entender que la selección no asegura una capacidad de respuesta inmune de manera inespecífica.

Si tenemos en cuenta la relación entre inmunosupresión y estrés, parece lógico pensar que la selección, en función de la intensidad de respuesta de estrés, debe afectar a algunos parámetros inmunológicos. A este respecto existen numerosos experimentos que establecen una correlación entre una mayor secreción de cortisol (HR) y un descenso en la actividad hemolítica del suero, número de anticuerpos específicos, activación del complemento, linfocitos y actividad de la lisozima (Fevolden *et al.*, 1991, 1993c; Pottinger *et al.*, 1994). En cuanto a los niveles de lisozima, también considerada rasgo válido para una selección genética, los resultados son algo ambiguos, ya que se observó una correlación negativa con la secreción de cortisol, que recientemente se ha puesto de manifiesto al comprobar que truchas seleccionadas por su alta secreción de lisozima tras estrés por confinamiento eran las que tenían más atenuados los niveles de cortisol y viceversa (Fevolden *et al.*, 2002).

La influencia de este tipo de selección en el comportamiento hiperglucemiante propio de la respuesta de estrés no parece mostrar una correspondencia entre individuos seleccionados por su alta o baja secreción de cortisol y los seleccionados en función de los niveles alcanzados de glucosa plasmática tras situaciones de estrés. Esta aparente contradicción podría explicarse, en parte, debido a que la glucogenolisis está principalmente mediada por las catecolaminas (Pottinger y Carrick, 1999a). Por otra parte, un aumento en la tasa metabólica podría explicar la correlación positiva observada entre los niveles de glucosa post-estrés y valores más altos de tasa de crecimiento instantánea (TCI) (Heath y Bernier, 1993).

La selección de una respuesta atenuada de estrés evitaría parcialmente los efectos negativos sobre el crecimiento (Pickering, 1993a). Efectivamente, en algunos casos se ha demostrado la relación existente entre valores de incremento de peso y animales seleccionados por su baja respuesta de estrés (LR) (Fevolden *et al.*, 1992, 2002). Por el contrario, otros experimentos no revelaron ninguna correlación entre los niveles de cortisol y el peso (Pottinger *et al.*, 1992) e incluso, inesperadamente, reflejaron valores más altos de longitud y tasa de conversión instantánea (TCI) en los grupos HR, lo que podría deberse a una mejor adaptación de este grupo al medio desde el inicio del periodo experimental (Pottinger y Carrick, 1999a). Otra posible explicación a estos resultados podría estar en que los LR presentaron, aunque con niveles inferiores, una elevación más sostenida de cortisol a lo largo de un período de confinamiento de 14 días con respecto a los HR, que tuvieron una rápida recuperación (Pottinger *et al.*, 1994b). Según Weil *et al.* (2001), esta elevación sostenida de los niveles de cortisol va a influir más sobre el crecimiento que los picos de cortisol alcanzados a corto plazo.

Es interesante destacar la influencia de esta selección en el comportamiento de los animales, comprobándose que los LR tomaban una posición dominante frente a los HR que presentaban una baja actividad locomotora y un descenso en la ingesta (Pottinger y Carrick, 2001a; Overly *et al.*, 2002). Esto parece confirmarse por las diferencias encontradas entre LR y HR en los distintos niveles de neurotransmisores monoaminérgicos con relación al sistema nervioso (Overly *et al.*, 2001) que, como se sabe, van a ser en parte responsables de la relaciones de dominancia-subordinación.

En ausencia de estrés, los niveles basales de cortisol entre grupos LR y HR no presentan diferencias (Pottinger *et al.*, 1992; Pottinger y Carrick, 1999b), lo que lleva a pensar que la selección se llevó a nivel de la capacidad de respuesta del tejido interrenal, cosa que se confirmó al no observarse diferencias en los niveles de ACTH entre líneas LR y HR tras ser sometidas a estrés por confinamiento (Pottinger y Carrick, 2001b).

A la hora de hacer una selección de razas, basada en la intensidad de respuesta de estrés, el proceso se puede mejorar unificando las condiciones de cultivo, estandarizando los agentes estresantes y usando individuos, con una clara diferenciación de rasgos, como parentales de la siguiente generación. La selección de razas con diferente grado de respuesta al estrés, tomando los niveles de cortisol como rasgo selectivo, parece ser efectiva, ya que los valores de heredabilidad para este rasgo han sido de 0.41 (Pottinger y Carrick, 1999b) y 0.5 (Fevolden *et al.*, 2002). Otro aspecto positivo es el mantenimiento de los resultados a lo largo de varios meses, lo que parece indicar que la selección en función del cortisol es bastante estable, llegando incluso a comprobar en segundas generaciones (Fevolden *et al.*, 1993c).

Con este tipo de selección, hemos presupuesto que una baja respuesta de estrés es una ventaja con relación a una respuesta más pronunciada. Si embargo, también sería posible considerar que la capacidad de adaptación de un pez, con una mayor habilidad para responder al estrés sería una ventaja. Quizás esta visión sólo sería aplicable a peces en estado salvaje ya que, en condiciones de acuicultura, los aspectos beneficiosos del estrés se verían superados por las repercusiones negativas en el desarrollo de los animales a largo plazo (Pottinger y Pickering, 1997; Fevolden *et al.*, 2002).

## 7.2. ELABORACIÓN DE DIETAS SUPLEMENTADAS CON HUFAS Y VITAMINAS E Y C

En la respuesta de estrés clásico es interesante tener en cuenta dos aspectos: 1) el animal se encuentra haciendo frente a una situación que, a la larga, puede repercutir en su buen

desarrollo (Ellis *et al.*, 2002) y 2) normalmente una activación de las vías catabólicas con fines energéticos va a determinar que el aumento de la tasa metabólica favorezca la producción de radicales libres que pueden alterar el equilibrio de los sistemas antioxidantes (Ross *et al.*, 2001).

Con relación a este último aspecto, se ha podido comprobar que diferentes tipos de estrés (ayuno, cambios de salinidad en el medio, metales pesados, incrementos en el flujo del agua), en ocasiones asociados a claros aumentos de cortisol (Tort *et al.*, 1996; Martínez-Álvarez *et al.*, 2002), provocan, por lo general, una estimulación de los sistemas antioxidantes, manifestada por altos niveles de GSH, metalotioneínas, actividad SOD, CAT o GPX, en respuesta a un posible aumento de los procesos oxidativos que se asociaron, en algunos casos, a valores altos de peróxidos (Hidalgo *et al.*, 1988; Lindström-Seppä *et al.*, 1996; Tort *et al.*, 1996; Kolayli y Keha, 1999; Ross *et al.*, 2001; Martínez-Álvarez *et al.*, 2002).

Teniendo en cuenta esto, sería interesante estudiar, en situaciones de estrés, el efecto de la manipulación de los niveles de determinados nutrientes y micronutrientes esenciales en la dieta, no sólo con relación a su importancia para el crecimiento y buen desarrollo del ser vivo, sino también al papel que representan en los sistemas de respuesta antioxidante.

Es bien conocido que las necesidades de vitamina C aumentan en situaciones estresantes (Halver, 1972). Esto se puso de manifiesto en lubinas sometidas a estrés por manipulación, en las que se observó un descenso de los niveles de vitamina en sus tejidos (Alexis *et al.*, 1999). Un efecto similar ha sido demostrado por Chien *et al.* (1999) en situaciones de estrés térmico. Efectivamente, parece que la vitamina C podría intervenir en la respuesta de estrés regulando la secreción y producción del cortisol, de ahí que los niveles de esta vitamina sean importantes en el riñón anterior, próximo al tejido interrenal (Halver, 1972). Esto explicaría que en situaciones de hipoxia la carencia de vitamina C en la dieta provoque variaciones bruscas de cortisol asociadas a títulos de glucemia más altos con respecto a dietas control (Henrique *et al.*, 1998). Un buen aporte de vitamina C aumenta la resistencia al estrés ya que disminuye la sensibilidad de los peces y, además, presenta efectos inmunoestimuladores (Merchie *et al.*, 1997). En relación a esto, se ha puesto de manifiesto el efecto de la vitamina C incrementando la tasa de supervivencia en

larvas sometidas a estrés por cambios de salinidad, al provocar en ellas un descenso de la sensibilidad al estrés (Kolkovski *et al.*, 2000). Pero, este efecto no fue tan claro en experimentos de confinamiento en salmónidos, donde los niveles de vitamina C no ejercieron ninguna influencia en la regulación de los efectos inmunosupresores, lo que podría apoyar la teoría de que la vitamina C no juega un papel fundamental en la regulación de la respuesta primaria de estrés (Thompson *et al.*, 1993). Por otro lado, se puso de manifiesto el papel de las vitaminas E y C manteniendo la estabilidad y funcionalidad de las membranas de fagocitos lo que confería una mayor capacidad de respuesta inmune frente a determinados patógenos (Obach y Laurencin, 1992).

La importancia de la vitamina E en situaciones de estrés podría estar asociada, junto a la de HUFAs, con la regulación de la respuesta primaria de estrés, dando lugar a la deficiencia de ambos nutrientes a valores altos de cortisol y, en situaciones de estrés agudo, a una respuesta más brusca y breve con respecto a las dietas control. Parece ser que el efecto combinado de las dietas carenciales (que ya son en sí una situación de estrés crónico) y el estrés físico va a disminuir la potencial resistencia del pez (Montero *et al.*, 1998). Por otro lado, se ha comprobado que la vitamina E y los HUFAs podrían intervenir en la regulación de ciertos procesos asociados a situaciones estresantes, como la excreción de amonio (aumentada por el catabolismo de tejidos) tras ejercicio exhaustivo (Agrandi *et al.*, 1995). En contraposición, no se encontró influencia de la vitamina E en la tasa de supervivencia de larvas sometidas a cambios de salinidad (Kolkovski *et al.*, 2000).

Por otro lado, en relación a la influencia conjunta que varios factores pueden ejercer sobre el desarrollo del pez, el efecto de la densidad de cultivo en pez gato alimentado con dietas suplementadas y carentes de vitamina E, no reflejó ninguna diferencia en los niveles de cortisol entre dietas, es decir, la densidad de peces no agravó los efectos de la carencia de vitamina E. Con respecto a la vitamina C ocurrió algo similar, su carencia tampoco afectó a la severidad de la deficiencia de vitamina E (Gatlin III *et al.*, 1986).

En cuanto a los HUFAs, parece que existe una correlación positiva entre su carencia y la aparición de un fenotipo de susceptibilidad al estrés (por hipoxia, cambios de



temperatura o de salinidad) asociado a un aumento de la tasa de mortalidad, lo que demuestra el efecto positivo de estos ácidos grasos en la capacidad de respuesta al estrés (Kraul *et al.*, 1993; Kanazawa *et al.*, 1997; Gapasin *et al.*, 1998; Sakakura *et al.*, 1998; Tago *et al.*, 1999; Montero *et al.*, 2003). Curiosamente, se observó que esta tendencia era reversible con la suplementación de HUFAs n-3 en la dieta (Logue *et al.*, 2000).

Es bien conocida la importancia de los HUFAs para el mantenimiento de la funcionalidad de membranas, sobre todo en las primeras etapas del crecimiento de peces, pero a esto habría que añadir la síntesis de prostaglandinas derivadas de los HUFAs n-3 que, en cierto modo, van a ejercer un papel muy positivo en la regulación de procesos patológicos. De ahí que numerosos experimentos pongan de manifiesto la importancia de los n-3 con respecto a los n-6 y otro tipo de HUFAs, los cuales en ausencia de los n-3 no consiguen mejorar la respuesta de estrés (Kraul *et al.*, 1993; Logue *et al.*, 2000). También, cabe destacar el papel que presentan como reguladores de la respuesta inmune, bien por la síntesis de eicosanoides, que pueden actuar como inmunomoduladores, o bien manteniendo la estabilidad de membranas de macrófagos, así como la funcionalidad de sus receptores, ya que existen experimentos en los que la sustitución de aceite de pescado (rico en n-3 HUFAs) por aceite de soja dio lugar a un descenso en la actividad del complemento posiblemente asociado a que los receptores de membrana se vieron afectados por un aporte elevado de ácido graso linoleico, abundante en el aceite de soja (Montero *et al.*, 2003).

Un último aspecto a considerar sería la influencia de los niveles de vitamina C en el sistema nervioso. Se ha comprobado que el ácido ascórbico puede influir en la acción de determinados neurotransmisores que regularían el comportamiento y el establecimiento de relaciones de subordinación en aquellos animales deficientes en vitamina C. Experimentos realizados con trucha arco iris demostraron que aquellos animales alimentados con dietas carentes de vitamina C, ocupaban peores posiciones en los tanques de experimentación, posiblemente por relaciones de sometimiento, lo que les podría suponer mayor dificultad para la obtención del alimento. En este caso, estas diferencias comportamentales no fueron suficientes como para establecer diferencias en la tasa de mortalidad y de crecimiento entre grupos control y deficientes en vitamina C (Blom *et al.*, 1999).



### **III.- MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 1.1. ENSAYO 1.- EFECTO DE LA DENSIDAD DE PECES EN TRUCHAS ARCO IRIS CON DIFERENTE GRADO DE RESPUESTA DE ESTRÉS

#### *Animales, diseño experimental y alimentación:*

Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) con un peso medio de 34 gramos. Por cada raza seleccionada (ver apartado 2.), se establecieron seis lotes experimentales, de los cuales tres se mantuvieron en condiciones de alta densidad (100 g/l) y los otros tres a baja densidad de peces (20 g/l), existiendo un total de dieciocho grupos experimentales (3 líneas x 2 densidades x 3 réplicas).

Los animales se alimentaron *ad libitum* dos veces al día (10:00 y 17:00 horas) utilizándose pienso comercial (DIBAQ / 2mm) de composición y diámetro de grano similares a los utilizados en piscifactoría para animales de ese tamaño.

Tras una semana de adaptación de los animales a las condiciones del acuario experimental, el experimento tuvo una duración de cuatro semanas.

#### 1.1. Efecto sobre el crecimiento, conversión del alimento y composición corporal

#### *Parámetros e índices determinados:*

Los parámetros que se controlaron fueron la ingesta diaria del alimento así como la ganancia de peso durante el período experimental.

Al inicio y final del experimento se tomaron muestras de peces de cada lote con el fin de analizar su composición corporal.

Asimismo se valoraron los índices de eficacia alimentaria (EA), tasa de crecimiento instantáneo (TCI), coeficiente de eficacia en crecimiento (CEC) y valor productivo de la proteína (VPP), así como la longitud estándar, factor de condición (FC) e índice hepatosomático (IHS).

### ***1.2. Efecto sobre determinados parámetros hematológicos y el metabolismo intermediario***

#### ***Parámetros e índices determinados:***

Se tomaron muestras de sangre para determinación de hematocrito, hemoglobina y glucosa plasmática.

Asimismo, se tomaron muestras de hígado para la determinación de la actividad de enzimas del metabolismo intermediario: Alanina aminotransferasa (AAT), Fructosa 1,6-bisfosfatasa (FBPasa), Piruvato quinasa (PK) y Fosfofructo quinasa (PFK), así como para el análisis de los niveles de glucógeno.

### **1.2. ENSAYO 2.- EFECTO DE LA DENSIDAD DE PECES EN TRUCHAS ARCO IRIS CON DIFERENTE DISPONIBILIDAD DE HUFAS Y DE VITAMINAS E Y C EN LA DIETA**

#### ***Animales, diseño experimental y alimentación:***

Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) de un peso medio de 50 gramos. Se establecieron cinco grupos experimentales, cada uno de ellos alimentado con un tipo de dieta (ver apartado 3.1). Los animales alimentados con cada tipo de dieta fueron

mantenidos a dos densidades de peces diferentes, baja (20 g/l) y alta (100 g/l). Cada una de las diez situaciones experimentales se ensayó en lotes triplicados, lo que dio lugar a un total de 30 grupos experimentales (5 dietas x 2 densidades x 3 réplicas).

Los animales fueron alimentados *ad libitum* dos veces al día (10:00 y 17:00) con su correspondiente dieta. Tras una semana de adaptación a las condiciones del acuario experimental, el ensayo tuvo una duración de seis semanas.

### 2.1. Efecto sobre el crecimiento, conversión del alimento y composición corporal

#### ***Parámetros e índices determinados:***

Los parámetros que se controlaron fueron la ingesta diaria del alimento, la ganancia de peso a los 21 días (subperíodo 1) y a los 42 días (subperíodo 2), así como el número de bajas a lo largo de todo el período experimental.

Al inicio, 21 y 42 días del ensayo, se tomaron muestras de peces de cada lote con el fin de analizar su composición corporal. Al final del experimento se tomaron muestras de músculo e hígado para análisis del perfil de ácidos grasos en estos tejidos.

Asimismo, se realizó una valoración de los índices de eficacia alimentaria (EA), tasa de crecimiento instantáneo (TCI), coeficiente de eficacia en crecimiento (CEC), valor productivo de la proteína (VPP) así como de la longitud estándar, factor de condición (FC) e índice hepatosomático (IHS).

### 2.2. Estudio histológico sobre el efecto de las diferentes dietas experimentales en hígado y branquias de trucha arco iris

Al final del experimento, se tomaron muestras de hígado y branquias de los distintos grupos de animales que consumieron cada una de las dietas experimentales en

condiciones de baja densidad, ya que se presupone que en estas condiciones los efectos de la dieta sobre los tejidos son más acusados, al establecerse una situación de densidad “normal” que en principio no afectaría negativamente a la ingesta.

### 2.3. Efecto sobre determinados parámetros e índices hematológicos, glucógeno tisular y niveles de cortisol y metabolitos plasmáticos

#### ***Parámetros e índices determinados:***

A los 21 y 42 días se tomaron muestras de sangre para análisis de hematocrito, hemoglobina, recuento de glóbulos rojos, y cálculo de CCMH, HCM, y VCM, realizándose también análisis de cortisol, glucosa y lípidos plasmáticos. Se tomaron muestras de hígado y músculo para análisis de glucógeno.

### 2.4. Efecto sobre el metabolismo de especies de oxígeno y nitrógeno reactivo

#### ***Parámetros e índices determinados:***

A los 21 y 42 día se tomaron muestras de sangre, hígado y riñón para análisis de la actividad de las enzimas antioxidantes: catalasa (CAT), glutathion peroxidasa (GPX), glutathion reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD), así como de la actividad glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), indirectamente ligada al sistema antioxidante enzimático celular. En el caso de la SOD, también se realizaron análisis de las distintas formas isoenzimáticas en geles de poliacrilamida. También se realizaron análisis de peroxidación lipídica a los 21 y 42 días en sangre, hígado y riñón. Con respecto al metabolismo de especies de nitrógeno reactivo, al final del experimento se tomaron muestras de hígado para el análisis inmunoelectroforético de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).



## **2. ANIMALES Y MANTENIMIENTO**

En el Ensayo 1, los animales utilizados pertenecían a una primera generación de truchas obtenidas a partir de progenitores seleccionados en función del grado de respuesta a una situación de estrés, que fue determinado por los niveles de cortisol plasmático. Esta selección se llevó a cabo por la empresa AKVAFORSK (Sunndabsora, NORUEGA) estableciéndose tres grupos de progenitores: HR (alta respuesta al estrés), LR (baja respuesta al estrés) y un grupo C (control) de animales no seleccionados.

De cada uno de estos dos grupos se obtuvo una primera generación (F<sub>1</sub>) cuyos huevos fueron enviados a Granada. Estos huevos fueron mantenidos hasta completar su incubación y posterior crecimiento en instalaciones de una piscifactoría local (Piscifactorías Andaluzas, S.A, Loja, Granada) a una densidad no estresante. Una vez alcanzado un peso en torno a 30-35 g los animales se trasladaron a las instalaciones de la Universidad de Granada donde se procedió al diseño del experimento.

En el Ensayo 2, los animales utilizados presentaron un peso en torno a 45-50 g y procedían de una piscifactoría local (Piscifactorías Andaluzas, S.A, Loja, Granada).

En ambos ensayos, una vez que los animales se trasladaron a las instalaciones experimentales, se mantuvieron durante siete días en cubas de fibra de vidrio de una capacidad de 360 litros para que se recuperaran del traslado. Pasado este tiempo, los peces fueron anestesiados por inmersión en una solución de etilenglicol monofenil eter (1.5 ml / 10 litros de agua) y se distribuyeron en lotes que fueron alojados en los tanques experimentales (ver apartado 2.1.).

Para la renovación del medio se estableció un flujo continuo de agua (1 litro / Kg pez / minuto) previamente declorada mediante un filtro de carbón activo.

La temperatura del agua se mantuvo constante a lo largo de todo el período experimental por medio de un termostato introducido en los tanques y conectado a una válvula de tres vías que mezclaba automáticamente el agua procedente del sistema de calefacción y refrigeración. En el Ensayo 1 fue de  $15 \pm 0.5$  °C, siendo en el Ensayo 2 de  $12 \pm 0.5$  °C para evitar una posible proliferación bacteriana en los animales sometidos a estados carenciales de vitaminas.

La oxigenación del agua se realizó mediante un soplante de aire (SIEMENS) que, por un sistema de tubos de PVC, distribuía el aire hacia los difusores situados en cada una de las cubas, los cuales estaban provistos de una llave que permitía un flujo de salida de aire tal que hacía posible mantener una concentración de oxígeno próxima a la saturación.

Para establecer el fotoperíodo adecuado al ensayo (12 horas luz / 12 horas oscuridad), se utilizó un temporizador conectado al sistema de iluminación artificial.

Semanalmente se procedía a la desinfección de los acuarios experimentales con cloramina en proporciones 0.75 g / 50 litros. Diariamente se realizaba un control de la saturación de oxígeno y de los niveles de cloro del agua de los acuarios.

## 2.1. ACUARIO EXPERIMENTAL

Los tanques de fibra de vidrio y con capacidad de 50 litros, estaban agrupados de tres en tres y presentaban cierta inclinación con el fin de facilitar la recogida de heces a un tubo común de drenaje con ranuras que las recorría por el interior. Este tubo presentaba una llave en uno de sus extremos desembocando el otro en una columna de sedimentación cuya salida se controlaba mediante otra llave. Cada día las unidades se limpiaron dos horas después de la última comida introduciendo una escobilla en la columna de sedimentación y en el tubo con ranuras tras abrir las llaves que cierran los extremos de ambos.

La renovación del agua se realizó por un tubo conectado en la parte superior de la columna de sedimentación en sentido ascendente, cuya altura determinaba el nivel de agua dentro de las cubas.

### 3. ALIMENTACIÓN

#### 3.1. DIETAS EXPERIMENTALES

En el primer ensayo se utilizó una dieta comercial con un grosor de grano apropiado al tamaño de los peces (DIBAQ / 2 mm). Los resultados obtenidos tras realizar el análisis de composición de dicho pienso se muestran en la Tabla III.1.

**Tabla III.1.-** Análisis de composición de la dieta utilizada en el ensayo 1 (% ss)

| <b>Humedad</b> | <b>MELN</b> | <b>Lípidos</b> | <b>Proteína</b> | <b>Cenizas</b> |
|----------------|-------------|----------------|-----------------|----------------|
| 8.7            | 21.1        | 14.6           | 46.7            | 17.6           |

Las dietas experimentales del Ensayo 2, fueron formuladas de acuerdo con los datos disponibles en bibliografía en cuanto a necesidades y criterios generales de nutrición, y fabricadas íntegramente en el laboratorio.

Para conseguir un tamaño de partícula adecuado para la mezcla (no superior a 50 µm), los componentes de la dieta fueron procesados haciéndolos pasar por un molino eléctrico de cuchillas y por una serie de tamices.

Como fuente proteica se utilizó harina de pescado suministrada por la empresa ALIMAR (Sur Chile) de la que se realizaron análisis de humedad (5.7% ss), lípidos (11.41 % ss) y proteínas (73.28 % ss) necesarios para la posterior formulación de la dieta.

Además de la grasa aportada por la harina de pescado, como fuente lipídica principal se utilizó aceite de pescado (Sildemel Industries; Noruega) para aquellas dietas con alta dosis de HUFAs empleándose aceite de soja (Solnatural, Barcelona) para las que tenían un bajo contenido en HUFAs (ver Tabla III.2). El buen estado de los ácidos grasos de las fuentes lipídicas se confirmó mediante análisis de índices de peróxidos (Labs. AINPROT, S.A), encontrándose trazas inapreciables en todos los casos.

**Tabla III.2.-** Porcentaje de ácidos grasos en aceite de pescado y de soja utilizados en la formulación de las dietas empleadas en el Ensayo 2.

| <b>Ácido graso</b> | <b>Ac. Pescado</b> | <b>Ac. Soja</b> |
|--------------------|--------------------|-----------------|
| <b>14:0</b>        | 6.51               | 0.08            |
| <b>16:0</b>        | 17.28              | 11.02           |
| <b>16:1n7</b>      | 7.05               | 0.14            |
| <b>18:0</b>        | 3.94               | 3.84            |
| <b>18:1n7</b>      | 0.29               | 0.00            |
| <b>18:1n9</b>      | 22.69              | 25.20           |
| <b>18:2n6</b>      | 10.05              | 52.96           |
| <b>18:3n3</b>      | 0.97               | 6.76            |
| <b>20:0</b>        | 0.00               | 0.00            |
| <b>20:1n7</b>      | 0.00               | 0.00            |
| <b>20:1n9</b>      | 5.30               | 0.00            |
| <b>20:2n6</b>      | 0.00               | 0.00            |
| <b>20:3n3</b>      | 0.00               | 0.00            |
| <b>20:4n6</b>      | 0.67               | 0.00            |
| <b>20:5n3</b>      | 9.48               | 0.00            |
| <b>20:6n3</b>      | 0.00               | 0.00            |
| <b>22:1n9</b>      | 5.58               | 0.00            |
| <b>22:4n6</b>      | 0.00               | 0.00            |
| <b>22:6n3</b>      | 10.21              | 0.00            |
| <b>24:1n9</b>      | 0.00               | 0.00            |
| <i>% Saturados</i> | <i>27.72</i>       | <i>14.94</i>    |
| <i>% MUFA</i>      | <i>40.90</i>       | <i>25.34</i>    |
| <i>% PUFA</i>      | <i>31.38</i>       | <i>59.72</i>    |
| <i>% HUFA</i>      | <i>20.36</i>       | <i>0.00</i>     |
| <i>% HUFA n3</i>   | <i>19.69</i>       | <i>0.00</i>     |

Para poder establecer dietas con dos niveles de vitamina E se realizó el análisis de la proporción de esta vitamina (Labs. AINPRONT, S.A.) en la harina de pescado y las distintas fuentes lipídicas utilizadas en las dietas (ver Tabla III.3).

**Tabla III.3.-** Niveles de vitamina E en los componentes de la dieta con contenido lipídico.

| <b>Fuente</b>     | <b>Vitamina E<br/>(mg/Kg)</b> |
|-------------------|-------------------------------|
| Harina de Pescado | 16                            |
| Aceite Pescado    | 74                            |
| Aceite Soja       | 16                            |

**Tabla III.4.** Formulación general de las 5 dietas experimentales.

| <b>COMPONENTES</b>      | <b>Peso<br/>(gr SF)</b> |
|-------------------------|-------------------------|
| Harina de Pescado       | 600                     |
| Aceite (pescado o soja) | 100                     |
| Almidón                 | 150                     |
| Dextrina                | 50                      |
| Corrector mineral       | 50                      |
| Corrector vitamínico    | 20                      |
| Carboximetilcelulosa    | 10                      |
| Betaína                 | 10                      |
| Celulosa                | 10                      |
| <b>TOTAL</b>            | <b>1000</b>             |

Como fuente hidrocarbonada se utilizó almidón pregelatinizado y dextrina, ambos suministrados por MUSAL & CHEMICAL S.A.

Como aglutinante dietario se utilizó carboximetil celulosa al 10% y como saborizante se empleó betaína (1%). Ambos componentes fueron suministrados por MUSAL & CHEMICAL, S.A

Los componentes dietarios minerales (Panreac Química, S. A.) y vitamínicos (Roche, S. A.) fueron preparados en el laboratorio según lo establecido por de la Higuera et al., (1988) (ver Tabla III.5). En el caso del corrector vitamínico se eliminaron las proporciones de vitamina E o C en aquellas dietas deficientes en alguna de estas vitaminas.

En función de su porcentaje de inclusión en la dieta, los ingredientes se fueron mezclando de menor a mayor proporción hasta obtener una mezcla homogénea, añadiéndose posteriormente agua en unas proporciones que permitieran su posterior granulado. Todo esto se realizó con una mezcladora durante unos 30 minutos. La masa obtenida pasó a una granuladora industrial utilizándose una matriz perforada de 1.9 mm o de 3 mm de diámetro con el fin de obtener dos tipos de grano diferentes y adecuarlos al tamaño alcanzado por los peces durante el experimento. La dieta húmeda granulada se situó sobre unas bandejas de malla de plástico en el interior de una secadora industrial a una temperatura de 20-30 °C durante 16 horas hasta reducir su humedad al 8-10%.

La formulación y composición química de los cinco tipos de dietas obtenidos combinando los niveles de vitamina E y C y de HUFA se refleja en la Tablas III.5, III.6 y III.7.

**Tabla III.5.-** Componentes del corrector vitamínico y mineral utilizado en las cinco dietas experimentales del Ensayo 2.

| VITAMINA              | mg/Kg dieta      | MINERAL  | g/Kg dieta             |
|-----------------------|------------------|--|------------------------|
| B1 (Tiamina)          | 40               | $(\text{PO}_4\text{H}_2)_2 \text{Ca} \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 30                     |
| B2 (Riboflavina)      | 60               | $\text{CO}_3 \text{Ca}$  | 6.5                    |
| B6 (Piridoxina)       | 30               | ClK  | 2.5                    |
| Ac. Pantoténico       | 150              | ClNa   | 4                      |
| Niacina               | 250              | $\text{SO}_4 \text{Mn} \cdot \text{H}_2\text{O}$               | 0.2                    |
| Ac. Fólico            | 15               | $\text{SO}_4 \text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$              | 1.5                    |
| Inositol              | 1000             | $\text{SO}_4 \text{Mg}$  | 4.6                    |
| Colina                | 5000             | IK   | 0.02                   |
| H2 (Biotina)          | 3                | $\text{SO}_4 \text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$             | 0.05                   |
| B12 (cianocobalamina) | 0.05             | $\text{SO}_4 \text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$              | 0.2                    |
| C (Ac. Ascórbico) †   | 1000             | $\text{SO}_4 \text{Co} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$              | 0.05                   |
| A*                    | 5000 (U.I)       | $\text{SeO}_3 \text{Na}_2$                                     | $0.218 \times 10^{-2}$ |
| D*                    | 3000 (U.I)       | $(\text{SO}_4)_3 \text{Al}_2 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$       | $1 \times 10^{-2}$     |
| E (tocoferol) †       | 250              | Celulosa   | 0.37                   |
| K (menadiona)         | 25               |  |                        |
| Celulosa              | hasta peso final |  |                        |
| <b>TOTAL</b>          | <b>20</b>        | <b>TOTAL</b>   | <b>50</b>              |

\* Cantidad expresada en unidades internacionales (U.I), sabiendo que en el caso de la Vitamina A y D hay 5000 UI / g vitamina.

† En el caso de dietas carentes estas vitaminas no fueron añadidas.

**Tabla III.6.** Niveles de HUFAs y Vitaminas E y C aproximados en las distintas dietas experimentales.

| <b>Dieta</b>     | <b>Vitamina E<br/>(mg/Kg dieta)</b> | <b>Vitamina C<br/>(mg/Kg dieta)</b> | <b>HUFAS<br/>(g/Kg dieta)</b> |
|------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| <b>-E-HUFA</b>   | 25.6                                | 1000                                | 12.5                          |
| <b>-E+HUFA</b>   | 25.6                                | 1000                                | 30.5                          |
| <b>+E-HUFA</b>   | 275.6                               | 1000                                | 12.5                          |
| <b>+E+HUFA</b>   | 275.6                               | 1000                                | 30.5                          |
| <b>-C+E+HUFA</b> | 275.6                               | 0                                   | 30.5                          |

**Tabla III.7.** Análisis de composición de las dietas experimentales.

| <b>Dieta</b>     | <b>HUMEDAD<br/>(%)</b> | <b>PROTEÍNA (ss)<br/>(%)</b> | <b>LÍPIDOS (ss)<br/>(%)</b> | <b>CENIZAS (ss)<br/>(%)</b> | <b>MELN (ss)<br/>(%)</b> |
|------------------|------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| <b>-E-HUFA</b>   | 10.48                  | 50.18                        | 18.39                       | 12.25                       | 19.18                    |
| <b>-E+HUFA</b>   | 10.93                  | 50.10                        | 17.02                       | 12.64                       | 20.24                    |
| <b>+E-HUFA</b>   | 5.29                   | 49.41                        | 16.79                       | 11.92                       | 21.88                    |
| <b>+E+HUFA</b>   | 11.98                  | 49.81                        | 17.57                       | 11.65                       | 20.79                    |
| <b>-C+E+HUFA</b> | 11.37                  | 49.18                        | 18.56                       | 12.69                       | 19.57                    |



## **4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

### **4.1. CONTROL DE PESO E INGESTA**

La ingesta de los animales durante el período experimental fue controlada diariamente en cada lote.

Al inicio de cada experimento los animales se pesaron individualmente, para favorecer la homogeneidad de los lotes, en una balanza monoplato con un error de  $\pm 0.1\text{g}$ .

En el Ensayo 1, los controles de peso se realizaron al inicio, a los 15 días, y al final del experimento. En el Ensayo 2, los controles de peso se realizaron a los 21 días y al final del experimento (42 días).

Al inicio del experimento la densidad de peces establecida fue algo menor (75 g/l y 15 g/l), para compensar posibles excesos sobre los valores prefijados y que la densidad media a lo largo del período experimental se asemejara bastante a éstos (100 g/l y 20 g/l). Además, para controlar el crecimiento de los animales y adecuar la densidad de peces establecida a cada lote, en los controles de peso se eliminó el número de peces necesario con el fin de mantener la densidad de peces prefijada.

Para los controles de peso se introdujo cada lote en un recipiente con agua y anestésico (etilenglicol monofenil eter: 1.5 ml /10 litros), provisto de aireación, que presentaba una canastilla perforada que permitía extraer del recipiente el lote de peces y escurrir toda el agua presente. En todos los casos los animales estuvieron en ayuno durante las 24 horas previas al control de peso.

## 4.2. TOMA DE MUESTRAS

### 4.2.1. Análisis de composición

Para realizar el análisis químico de dietas y animales fue necesario un procesado previo que se describe a continuación.

#### 1.- Dietas

Se tomó una muestra seca al azar de cada una de ellas y se trituro en un molinillo de cuchillas hasta obtener una harina homogénea.

#### 2. – Animales

Las muestras tomadas al inicio de los ensayos y a lo largo del experimento fueron sometidas al siguiente protocolo:

1. Peso del animal
2. Disección para la limpieza del intestino y extracción de vísceras del animal.
3. Troceado de éste.
4. Desecación en estufa a 105 °C hasta peso constante
5. Triturado en molinillo de cuchillas hasta obtener una harina homogénea.
6. Conservación en frío hasta posteriores análisis

### 4.2.2. Preparaciones histológicas

Para la realización del estudio histológico en hígado y branquias (Ensayo 2), tras la disección de los animales, las muestras se extrajeron y se fijaron en formol salino al 10% para su posterior preparación histológica.

### **4.2.3. Toma de muestras de sangre**

La toma de muestras se realizó en los animales previamente anestesiados y pesados. La sangre se extrajo de la vena caudal con jeringas heparinizadas de 2.5 ml.

Tras tomar las muestras correspondientes para hematocrito y hemoglobina se procedió a la extracción del plasma y glóbulos rojos.

#### **1.- Extracción del plasma**

Se centrifugó la sangre a 3000 r.p.m. durante 10 minutos. Separado el sobrenadante correspondiente a la fracción plasmática de la sangre se guardó en viales de plástico herméticos que se congelaron a -80 °C para asegurar los resultados de análisis posteriores.

#### **2.- Extracción del contenido de glóbulos rojos**

En el proceso de obtención del plasma, el sedimento obtenido correspondiente a los glóbulos rojos se resuspendió en solución salina al 9 ‰ en proporción 1:3 con el fin de lavar la muestra; para ello, se agitó todo “suavemente” por inversión (para no lisar los glóbulos rojos). Posteriormente, se centrifugó a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos, retirando el sobrenadante obtenido. Esta operación se repitió dos veces más.

A continuación, el precipitado formado por los glóbulos rojos se resuspendió en proporción 1:3 con tampón Tris-Cl (20 mM, pH 8) que contenía glicerol al 10% (v/v) y Tritón X-100 al 0.1% (v/v) y se congeló a -20 °C durante 12 horas con el fin de lisar las células. Posteriormente, se descongeló la muestra y se centrifugó a 4 °C a 5.000 g (6900 r.p.m) durante 10 minutos. El sobrenadante recogido corresponde al contenido de glóbulos rojos, el cual se congeló a -80 °C para posteriores análisis.

### **4.2.3. Toma de muestras de tejidos**

Tras la disección de los animales, se extrajo (según el ensayo) el hígado, riñón y/o parte del músculo y se sumergieron directamente en nitrógeno líquido, guardándose después a -80 °C. Las muestras no permanecieron más de una semana congeladas, para evitar la posible pérdida de actividad de algunas de las enzimas.

Previamente a los análisis, los tejidos congelados se sumergieron en solución salina (0.9 ‰) en crisoles situados sobre hielo picado y se procedió al procesado de muestras de tejido para los distintos análisis.

#### **1.- Análisis de glucógeno**

Se tomó una muestra de hígado o músculo en torno a 500 mg que se homogenizó con agua destilada fría en proporciones 1:5 (p/v). Las muestras, sin ser centrifugadas, se utilizaron inmediatamente o bien se congelaron para posteriores análisis.

#### **2.- Enzimas del metabolismo intermediario**

Las muestras de hígado se homogeneizaron con tampón Tris-sacarosa 100 mM / 250 mM pH 7.6 en proporción 1:10 (p/v).

El homogenado se centrifugó a una temperatura de 4 °C a 16.000 r.p.m. durante 30 minutos. Posteriormente, se tomó el sobrenadante con pipeta Pasteur, manteniéndose en un baño de hielo durante todo el tiempo previo a la medida de las actividades enzimáticas FBPasa, PK, PFK, AAT y G6PDH.

#### **3.- Metabolismo de especies de oxígeno y nitrógeno reactivo**

Los tejidos se homogeneizaron con tampón Tris-HCl, 100 mM, pH 8 con Tritón X-100 0.1% y EDTA (ácido etilen diamino tetracético) 0.1 mM, en unas proporciones 1:9 (p/v).

El homogenado se centrifugó a 4 °C a 16.000 r.p.m. durante 30 minutos. El sobrenadante obtenido se utilizó para la determinación de las actividades enzimáticas catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y superóxido dismutasa, así como el grado de peroxidación lipídica y análisis de formas isoenzimáticas de las enzimas SOD e iNOS.

## **5. MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **5.1. COMPOSICIÓN**

Los análisis de composición de las materias primas, dietas y animales, se realizaron de acuerdo con los métodos establecidos por la AOAC (1990), salvo que se especifique otra referencia.

#### **5.1.1. Humedad**

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

#### **5.1.2. Cenizas**

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

#### **5.1.3. 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  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  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.

#### **5.1.4. Proteína**

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 destilada. Tras la destilación de un volumen de muestra junto con hidróxido sódico al 40 %, el amoníaco formado se recogió en un matraz que contenía 30 ml de indicador Buchi, tomándose 150 ml para asegurar la recogida de la totalidad del nitrógeno. Posteriormente, la cantidad de nitrógeno en forma de amoníaco presente en el destilado se valoró con ácido clorhídrico 0.01 N.

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

#### **5.1.5. 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:

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

### **5.2. TRATAMIENTO HISTOLÓGICO DE LAS MUESTRAS**

Las muestras permanecieron fijadas en una solución de formol salino durante cinco días; posteriormente, el tejido fue deshidratado con alcoholes de graduación creciente, incluido en parafina y seccionado con un microtomo Leica RM 2135. Las secciones de 5 µm de espesor fueron desparafinadas en xilol, hidratadas y teñidas con hematoxilina-eosina (H-E) para su posterior observación al microscopio óptico.

### 5.3. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Para la determinación de los distintos ácidos grasos en músculo e hígado, primero se procedió a la extracción de la fracción lipídica. Para ello se pesaron aproximadamente 600 mg de tejido que se homogenizaron en un potter de vidrio con 4 ml de **mezcla extractora** (cloroformo (200): metanol (100): ácido clorhídrico 0.1 N (1)). Al homogenado resultante se le añadieron 3 ml de HCl 0.1 N y, tras agitar vigorosamente, se centrifugó durante 10 minutos a 2000 r. p.m.

En los tubos centrifugados aparecieron tres fases: una fase superior acuosa, un anillo central formado por restos de tejidos y una fase clorofórmica con la fracción lipídica en disolución. La fase superior se eliminó, la fase clorofórmica se extrajo con sumo cuidado reservándose en otro tubo y con el resto se volvió a repetir el proceso dos veces más añadiendo esta vez 2 ml de mezcla extractora y 1 ml de HCl. Toda la fase clorofórmica extraída en las sucesivas centrifugaciones fue desecada a 40 °C con una corriente de nitrógeno para evitar su oxidación.

Una vez secada la fracción lipídica, se procedió a la hidrólisis-metilación de los lípidos mediante el reactivo METH-PREP-II (Alltech). Se procedió de igual manera para los análisis de los aceites (soja y pescado) utilizados en la fabricación de las dietas experimentales.

Para la identificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos individuales se inyectaron 2µl de la muestra en un cromatógrafo de gases CARLO ERBA serie 8000, modelo 8060 (Thermo Quest Instruments) acoplado a un espectrómetro de masas PLATFORM II (Micromass Instruments, Manchester, U.K.). En el sistema cromatográfico se empleó una columna capilar de fase apolar y una división de flujo de 1:75. Todos los análisis se realizaron en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (CICUG).

Las condiciones del programa fueron:

|                             |                |
|-----------------------------|----------------|
| Temperatura inicial.....    | 70 °C          |
| Tiempo inicial.....         | 1 minuto       |
| Rampa 1.....                | 12 °C / minuto |
| Temperatura intermedia..... | 200 °C         |
| Rampa 2.....                | 3 °C / minuto  |
| Temperatura final.....      | 300 °C         |
| Tiempo final.....           | 6 minutos      |

#### 5.4. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

Se determinaron en la fracción sanguínea separada para la realización de estos análisis.

##### **5.4.1. Hematocrito**

Por centrifugación de la sangre a 3.000 r.p.m. 10 minutos, en microcapilares heparinizados (Blaxhall y Daisley, 1973) y posteriormente estableciendo la relación entre la longitud de la banda de glóbulos rojos separada de la fracción plasmática y el total de la sangre en el capilar.

##### **5.4.2. Hemoglobina**

Se empleó el método colorimétrico de la cianmetahemoglobina utilizando el reactivo Drabkin (Dipal; 28.105). La determinación se realizó a 540 nm (Larsen y Snieskzo, 1961).



### 5.4.3. Recuento de glóbulos rojos

Tras realizar una dilución de la sangre en proporción 1:200 con una solución diluyente isotónica (reactivo de Hendrick), se situó la muestra en una cámara de recuento de Neubauer contabilizando el número de glóbulos rojos por unidad de superficie.

Para el cálculo se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{n}^\circ \text{ células/mm}^3 \text{ sangre} = \frac{A}{v \cdot n} \cdot f$$

Siendo:

*A*: n° células contadas

*v*: volumen del cuadro de la cámara de recuento ( $2.5 \cdot 10^{-4} \text{ mm}^3$ )

*n*: n° cuadros contados (128)

*f*: factor de dilución (200)

### 5.4.4. Índices hematológicos

Para el cálculo de los índices hematológicos se emplearon las siguientes fórmulas:

• **Concentración corpuscular media de hemoglobina:**

$$\text{CCMH (g / 100 ml)} = (\text{Hb (g / 100 ml)} / \text{Hcto (\%)}) \times 100$$

- ***Hemoglobina corpuscular media:***

$$\text{HCM (pg)} = (\text{Hb (g / 100 ml)} / \text{recuento (n}^\circ \text{ células / mm}^3)) \times 10^7$$

- ***Volumen corpuscular medio:***

$$\text{VCM (micras}^3) = (\text{Hcto (\%)} / \text{recuento (n}^\circ \text{ células / mm}^3)) \times 10^7$$

## 5.5. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTISOL PLASMÁTICO

Para la determinación del cortisol plasmático se utilizó el test IMMULITE® (Diagnostic Products Corporation, Los Ángeles, Estados Unidos) basado en el análisis enzimoinmunométrico por quimioluminiscencia en fase sólida. Las medidas se realizaron en un Analizador Automático IMMULITE®.

El principio del test consiste en el inmunoensayo competitivo para el cual se utilizaron anticuerpos policlonales anticortisol de conejo.

Los resultados obtenidos se expresaron en ng cortisol / ml plasma.

## 5.6. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA PLASMÁTICA

La determinación de glucosa se realizó mediante un kit de diagnóstico comercial (Sigma; 16-20) basado en la reacción acoplada de la hexoquinasa (HK) y la glucosa 6- fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

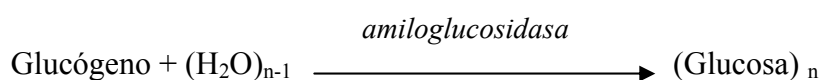
Los resultados se expresaron en mg glucosa / 100 ml plasma.

## 5.7. DETERMINACIÓN DEL GLUCÓGENO TISULAR

### Fundamento

Se realiza una hidrólisis enzimática con amiloglucosidasa según el método de Roehrig y Allred (1974) determinándose después el glucógeno que pasa a estado de glucosa libre.

La actividad hidrolítica del enzima es a la altura de las uniones  $\alpha$ -D (1  $\rightarrow$  4) y  $\alpha$ -D (1  $\rightarrow$  6) del glucógeno, liberándose glucosa. Esta enzima es específica y por tanto no es necesario aislar el glucógeno para llevar a cabo la hidrólisis.



### Reactivos

- Amiloglucosidasa comercial (E. C. 3.2.1.3)
- Tampón acetato 0.05 M, pH 4.5
- Glucógeno comercial (Sigma)

### Procedimiento

#### *a) Hidrólisis del glucógeno*

A 25  $\mu$ l de homogenado de cada muestra junto con 425  $\mu$ l de agua destilada se añaden 50  $\mu$ l de una solución de amiloglucosidasa en tampón acetato (35 U / ml). Se mezcla todo y se incuba a 55  $^{\circ}$ C durante 10 minutos.

El mismo tratamiento enzimático y de incubación se aplicó a las muestras de la curva patrón con concentraciones conocidas de glucógeno, elaboradas a partir de una solución estándar de 800  $\mu\text{g}$  glucógeno / 400  $\mu\text{l}$  de agua destilada.

| <b>[Glucógeno]</b><br>$\mu\text{g} / 400 \mu\text{l}$ | <b>0</b> | <b>25</b> | <b>50</b> | <b>100</b> | <b>200</b> | <b>300</b> | <b>400</b> |
|---|----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| Agua destilada ( $\mu\text{l}$ )                      | 400      | 387.5     | 375       | 350        | 300        | 250        | 200        |
| Solución estándar ( $\mu\text{l}$ )                   | 0        | 12.5      | 25        | 50         | 100        | 150        | 200        |

*b) Determinación de glucógeno en estado de glucosa libre*

Pasado el período de tiempo señalado las muestras incubadas se mezclan y se utilizan 10  $\mu\text{l}$  para análisis del contenido de glucosa según el método descrito en el apartado 5.6.

La concentración de glucógeno en las muestras se calculó a partir de la recta obtenida con la curva patrón en la que se asocian concentraciones de glucógeno conocidas con la D.O. obtenida al medir la glucosa libre. Los resultados se expresaron en mg glucógeno / g tejido.

## 5.8. CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SOLUBLES

El contenido proteico de las muestras se determinó por el método de Lowry *et al.* (1951).

### Fundamento

El método se basa en la reacción de las proteínas con el reactivo Folin-Ciocalteu, la cual ocurre en dos fases:

- **Biuret:** Reacción de las proteínas de la solución con el cobre alcalino.
- **Folin:** La tiroxina y el triptófano de la muestra reducen el fosfomolibdato del reactivo.

Reactivos

- Solución alcalina de cobre (Biuret): 50 ml de una solución al 2 % de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  en NaOH 0.1 N y 1 ml de solución de  $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 0.5 % en tartrato sódico.
- Reactivo Folin-Ciocalteu: Reactivo comercial (Analema) que se usa diluido a la mitad con agua destilada.
- Solución de albúmina bovina (Sigma) al 0.05 % (50 mg / 100 ml) en agua destilada.

Procedimiento

Se preparó una curva patrón con la solución de albúmina bovina a concentraciones de 50-100-150-200 y 250  $\mu\text{g}$  / ml.

|                                      | <b>Blanco</b> | <b>P1</b> | <b>P2</b> | <b>P3</b> | <b>P4</b> | <b>P5</b> | <b>Muestra</b> |
|--------------------------------------|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------------|
| <b>Albúmina</b> (ml)                 | —             | 0.1       | 0.2       | 0.3       | 0.4       | 0.5       | —              |
| <b>H<sub>2</sub>O destilada</b> (ml) | 1             | 0.9       | 0.8       | 0.7       | 0.6       | 0.5       | 0.95           |
| <b>Muestra</b> (ml)                  | —             | —         | —         | —         | —         | —         | 0.05           |
| <b>R. Alcalino</b> (ml)              | 5             | 5         | 5         | 5         | 5         | 5         | 5              |

Se agitó todo y tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente se añadieron 0.5 ml de reactivo Folin. Se agitó y tras 20 minutos se realizó la lectura de la muestra a 640 nm.

### Cálculos

Se hizo una recta con los valores de D.O. correspondientes a las distintas concentraciones de albúmina, a partir de la cual se obtuvieron los valores de concentración de proteínas de cada muestra, teniendo en cuenta las diluciones de éstas. Los resultados se expresaron en mg proteína / ml extracto.

## 5.9. DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS PLASMÁTICOS

### **5.9.1. Lípidos totales**

Se utilizó un kit comercial (Dipal, 28.215) compuesto de dos reactivos (ácido sulfúrico y fosfovainillina) y una solución estándar de concentración lipídica conocida (750 mg lípidos totales / ml).

Al tratar con ácido sulfúrico y, posteriormente, con fosfovainillina los lípidos totales dan una coloración rosada proporcional a su concentración en la muestra.

Los resultados se expresaron en mg de lípidos totales / 100 ml plasma.

### **5.9.2. Triglicéridos**

Se utilizó un kit comercial de diagnóstico (Dipal, 28.762). Los triglicéridos presentes en la muestra se hidrolizan mediante una lipasa a ácidos grasos y glicerol. Este último, por una serie de reacciones, genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que por medio de una peroxidasa, en presencia de animofenazona y p-Clorofenol da lugar a agua y una quinona que aporta la coloración.

Los resultados se expresaron en mg de triglicéridos / 100 ml plasma.

### 5.9.3. Colesterol total

Se utilizó un kit comercial de diagnóstico (Dipal, 28.600). La enzima colesterol esterasa escinde los ésteres de colesterol en ácidos grasos y colesterol. La enzima colesterol oxidasa transforma el colesterol en colest-3-ona con producción de agua oxigenada que se determina cuantitativamente según el principio de trinder con peroxidasa, fenol y 4 animofenazona.

Los resultados se expresaron en mg de colesterol total / 100 ml plasma.

### 5.9.4. Colesterol HDL y LDL

Se utilizó un kit de diagnóstico comercial (Dipal, 28.625). Mediante un reactivo precipitante de proteínas, se logra precipitar las lipoproteínas de baja densidad (LDL y VLDL) quedándose en el sobrenadante las lipoproteínas de alta densidad (HDL), de las cuales se determina el colesterol que hay ligado a las mismas por el mismo procedimiento visto para los análisis de colesterol total.

Los resultados se expresaron en mg de colesterol HDL / 100 ml plasma.

**Para el cálculo de colesterol LDL se utilizó la fórmula de Friedewald:**

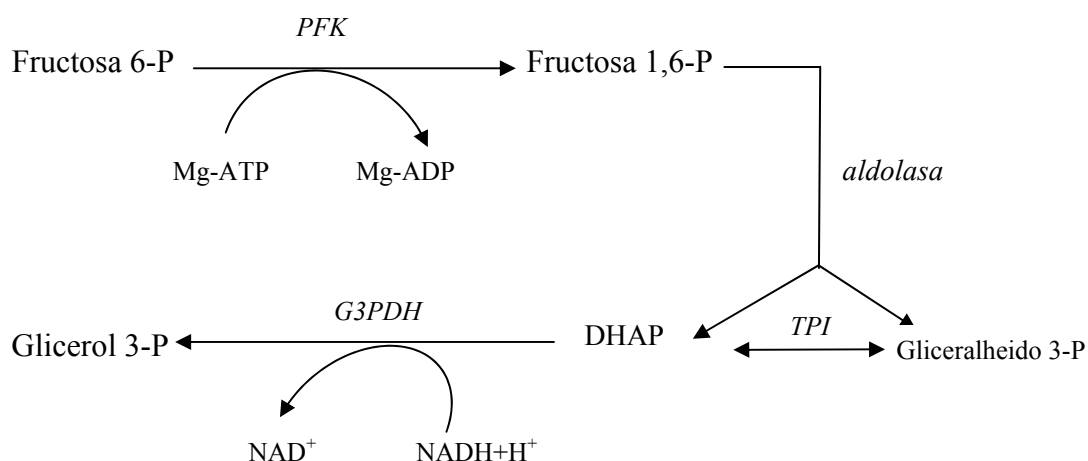
Colesterol LDL (mg / 100ml) = Colesterol total – (Triglicéridos / 5) – C. HDL

## 5.10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS PERTENECIENTES AL METABOLISMO INTERMEDIARIO

### 5.10.1. Fosfofructoquinasa (PFK)

#### Fundamento

La medida de la actividad PFK (E.C. 2.7.1.11.) se basa en la desaparición de NADH, determinada espectrofotométricamente, según el método de Crabtree y Newsholme (1972) modificado, de acuerdo con la siguiente reacción:



#### Reactivos

- Tampón Tris-HCl 170 mM, pH 8
- Solución extemporánea de NADH 1.5 mM
- Solución de KCl 2 M
- Solución de MgCl<sub>2</sub> 100 mM
- Solución de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM
- Solución de NH<sub>4</sub>Cl 10 mM
- Solución extemporánea de Mg-ATP 15 mM
- Solución extemporánea de AMP 1 mM



- Triosafosfato isomerasa comercial (E.C. 5.3.1.1.)
- Aldolasa comercial (E.C. 4.1.2.13.)
- Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa comercial (E. C. 1.1.1.8.)
- Fosfoglucosa isomerasa comercial (E.C. 5.3.1.9.)
- Fructosa 6-fosfato 50 mM
- Glucosa 6-fosfato 150 mM

Mg-ATP, AMP y NADH se disolvieron en tampón Tris-ClH 170 mM, pH 8 quedando éste en cubeta a una concentración 51 mM.

### Procedimiento

La medida de la actividad enzimática se realizó en cubetas de 1 ml cuya composición fue la siguiente:

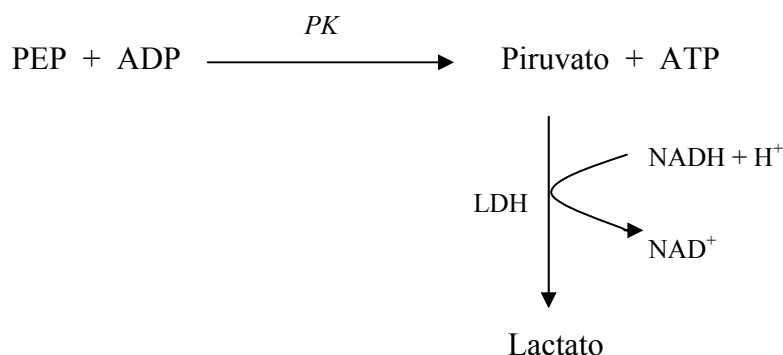
| <b>Solución</b>                 | <b>Volumen cubeta</b> | <b>Concentración cubeta</b> |
|---------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| NADH                            | 0.10 ml               | 0.15 mM                     |
| KCl                             | 0.05 ml               | 100 mM                      |
| MgCl <sub>2</sub>               | 0.05 ml               | 5 mM                        |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0.05 ml               | 5 mM                        |
| NH <sub>4</sub> Cl              | 0.10 ml               | 0.1 mM                      |
| Mg-ATP                          | 0.10 ml               | 1.5 mM                      |
| AMP                             | 0.10 ml               | 0.1 mM                      |
| TPI                             | 0.10 µl               | 5 U/ml                      |
| Aldolasa                        | 5.50 µl               | 0.5 U/ml                    |
| αGPDH                           | 0.30 µl               | 0.5 U/ml                    |
| PGI                             | 0.30 µl               | 1 U/ml                      |
| F6P                             | 0.10 ml               | 5 Mm                        |
| G6P                             | 0.10 ml               | 15 mM                       |
| <b>Extracto</b>                 | 0.25 ml               |                             |

La reacción se inició con la adición del extracto, y la lectura se realizó a 340 nm a una temperatura de 25°C.

### 5.10.2. Piruvato quinasa (PK)

#### Fundamento

La actividad PK (E.C. 2.7.1.40.) se determinó siguiendo el método descrito por Carbonell *et al.* (1973) modificado, ya que se comprobó que se podía prescindir de la reacción inicial de la Enolasa sin interferir en los resultados de la actividad PK. La reacción se basa en el descenso de D.O. debido a la oxidación del NADH, en una reacción acoplada a la actividad Lactato deshidrogenasa.



#### Reactivos

- Tampón Imidazol-ClH 77 mM, pH 7
- Solución de ClK 2 M
- Solución de Cl<sub>2</sub>Mg 100 mM
- Solución extemporánea de NADH 1.5 mM
- Solución extemporánea de ADP 10 mM
- Lactato deshidrogenasa comercial (E.C. 1.1.1.27.)
- Fosfoenol piruvato 20 mM

### Procedimiento

La reacción se llevó a cabo en cubetas de 1 ml, cuya composición fue la siguiente:

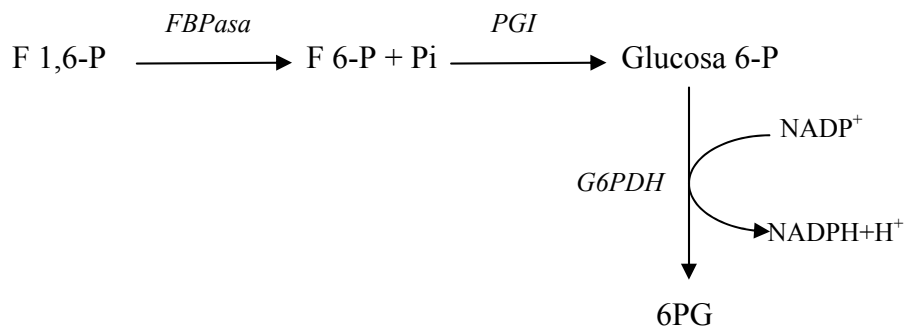
| <b>Solución</b>   | <b>Volumen cubeta</b> | <b>Concentración cubeta</b> |
|-------------------|-----------------------|-----------------------------|
| T. Inmidazol      | 0.45 ml               | 50 mM                       |
| KCl               | 0.05 ml               | 100 mM                      |
| MgCl <sub>2</sub> | 0.05 ml               | 5 mM                        |
| NADH              | 0.10 ml               | 0.15 mM                     |
| ADP               | 0.10 ml               | 1 mM                        |
| LDH               | 0.73 µl               | 2 U/ml                      |
| PEP               | 0.10 ml               | 2 mM                        |
| <b>Extracto</b>   | 0.05 ml               |                             |

La reacción se inició con la adición del extracto, y la lectura se realizó a 340 nm a una temperatura de 25 °C.

### **5.10.3. Fructosa 1,6- bifosfatasa (FBPasa)**

#### Fundamento

En la medida de la actividad FBPasa (E.C. 3.1.3.11.) se utilizó una modificación del método seguido por Latzko y Gibbs (1970). Se basa en la medida espectrofotométrica de la aparición de NADPH después de tres reacciones en cadena iniciadas con la actuación de la FBPasa.



La aparición de NADPH provoca un incremento de D.O. que es proporcional a la actividad de la enzima.

#### Reactivos

- Tampón Tris-HCl 66.6 mM, pH 7.7
- Solución de  $\text{Cl}_2 \text{ Mg}$  100 mM
- Solución extemporánea de  $\text{NADP}^+$  10 Mm
- Solución extemporánea de  $\beta$ -mercaptoetanol 200 mM
- Fosfoglucosa isomerasa comercial (E. C. 5.3.1.9.)
- Glucosa 6-P deshidrogenasa comercial (E. C. 1.1.1.49.)
- Agua destilada
- Fructosa 1,6-bisfosfato 0.1 mM

#### Procedimiento

La reacción se llevó a cabo en cubetas de 1 ml, cuya composición fue la siguiente:

| <b>Solución</b>            | <b>Volumen cubeta</b> | <b>Concentración</b> |
|----------------------------|-----------------------|----------------------|
| T. Tris-HCl                | 0.60 ml               | 40 mM                |
| MgCl <sub>2</sub>          | 0.05 ml               | 5 mM                 |
| NADP <sup>+</sup>          | 0.05 ml               | 0.5 mM               |
| β-mercaptoetanol           | 0.06 ml               | 12 mM                |
| PGI                        | 0.50 µl               | 2 U/ml               |
| G6PDH                      | 0.30 µl               | 2 U/ml               |
| H <sub>2</sub> O destilada | 0.09 ml               |                      |
| FBP                        | 0.10 ml               | 0.01 mM              |
| <b>Extracto</b>            | 0.05 ml               |                      |

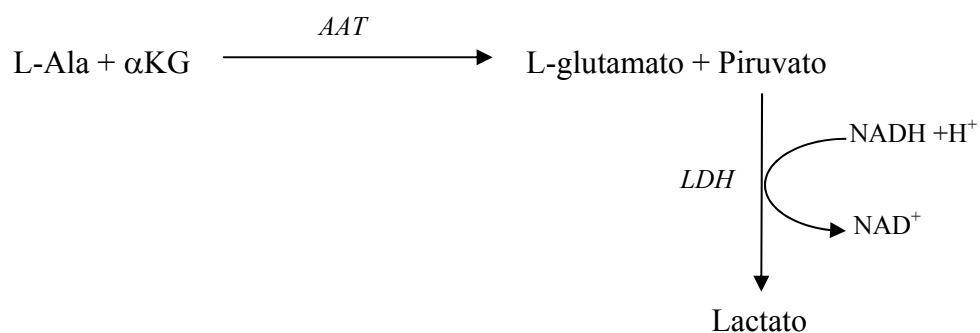
La reacción se inició con la adición del extracto y la lectura se realizó a 340 nm a una temperatura de 25 °C.

#### **5.10.4. Alanina aminotransferasa (AAT)**

##### Fundamento

El método seguido para la determinación de la actividad AAT (E.C. 2.6.1.2.) es el descrito por D'Apollonia y Anderson (1980) modificado. La actividad enzimática se cuantificó siguiendo espectrofotométricamente la disminución de D.O. causada por la desaparición de NADH.

Las reacciones que se producen son:



### Reactivos

- Tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4
- Solución extemporánea neutra de  $\alpha$ KG 10 mM
- Solución extemporánea neutra de NADH 5 mM
- Lactato deshidrogenasa comercial (E.C. 1.1.1.27.)
- L-Alanina 500 Mm

### Procedimiento

La reacción se llevó a cabo en cubetas de 1 ml, cuya composición fue la siguiente:

| <b>Solución</b> | <b>Volumen cubeta</b> | <b>Concentración cubeta</b> |
|-----------------|-----------------------|-----------------------------|
| T. Fosfato      | 0.74 ml               | 74 mM                       |
| NADH            | 0.03 ml               | 0.15 mM                     |
| LDH             | 0.73 $\mu$ l          | 2 U/ml                      |
| $\alpha$ KG     | 0.08 ml               | 0.8 mM                      |
| L-Ala           | 0.10 ml               | 50 mM                       |
| <b>Extracto</b> | 0.05 ml               |                             |

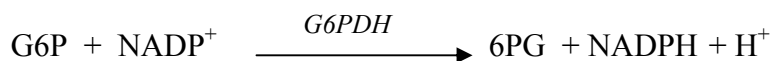
La reacción se inició con la adición del extracto, y la lectura se realizó a 340 nm a una temperatura de 25 °C.

### 5.10.5 Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)

#### Fundamento

La determinación de la actividad Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.49.) se realizó siguiendo el método descrito por Löhr y Waller (1960) modificado, y se basa en la variación de la D.O. asociada a la aparición de NADPH, seguida espectrofotométricamente a 340 nm, como consecuencia de la actividad de esta enzima. Cabe destacar que, la actividad medida corresponde a la suma de la actividad G6PDH y 6PGDH (6-fosfogluconato deshidrogenasa).

La reacción es la siguiente:



#### Reactivos

- Tampón Trietanolamina 50 mM, pH 7.5
- Solución de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  119 mM
- Solución extemporánea de NADP 20 mM en  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  119 mM
- Glucosa 6-P 10 mM

#### Procedimiento

La reacción se llevó a cabo en cubetas de 1 ml, cuya composición fue la siguiente:

| Solución          | Volumen cubeta | Concentración |
|-------------------|----------------|---------------|
| T. Trietanolamina | 0.75 ml        | 37.5 mM       |
| NADP              | 0.1 ml         | 2 mM          |
| G6P               | 0.1 ml         | 1 mM          |
| <b>Extracto</b>   | 0.05 ml        |               |

La reacción se inició con la adición del extracto, y la lectura se realizó a 340 nm a una temperatura de 25 °C.

### 5.10.6. Cálculo de las actividades enzimáticas

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 según la siguiente fórmula:

$$\text{nmoles/min/mg prot} = \frac{(\Delta D.O. / \Delta t) \cdot V}{10^3 \cdot \epsilon \cdot 10^{-9} \cdot d \cdot v \cdot P}$$

**Donde:**

$\Delta D.O.$ : incremento de densidad óptica

$\Delta t$ : incremento de tiempo de medida

V: volumen total de la cubeta (1 ml)

v: volumen del extracto en ml

$\epsilon$ : coeficiente extinción molar NADH / NADPH a 340 nm ( $6.22 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ )

d: espesor de la cubeta (1 cm)

P: mg de proteína por ml

$10^{-9}$ : factor de conversión a nM

$10^3$ : conversión de litros a mililitros



## 5.11. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ASOCIADAS AL METABOLISMO DE ESPECIES DE OXÍGENO Y NITRÓGENO REACTIVO

### 5.11.1. Catalasa (CAT)

#### Fundamento

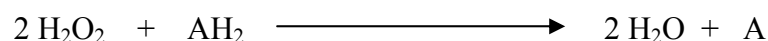
La técnica utilizada para la medida de la actividad catalasa (E.C. 1.11.1.6.) se basó en el método de Aebi (1984).

La catalasa ejerce una doble acción:

a) Actividad catalítica



b) Actividad peroxidásica, en la que se produce la oxidación de compuestos reducidos como metanol, etanol, ácido fórmico y fenoles. Se realiza a pHs alcalinos.



La actividad catalítica se determinó midiendo espectrofotométricamente la disminución de D.O. debida a la desaparición de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

#### Reactivos

- Tampón fosfato 50 mM, pH 7
- Solución extemporánea de peróxido de hidrógeno 10.6 mM en tampón fosfato 52 mM, pH 7

### Procedimiento

\* Como *sustrato* se utilizó una solución extemporánea de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10.6 mM que se obtuvo al mezclar 0.12 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% en 100 ml de tampón fosfato.

Posteriormente, la medida se realizó en cubetas de cuarzo de 1 ml que contenían 870 µl de sustrato y 30 µl de extracto.

La lectura en el espectrofotómetro se realizó durante dos minutos a 240 nm (lámpara de Deuterio) y a una temperatura de 25 °C.

### Cálculos

Para el cálculo de la actividad catalasa en µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / min / mg prot se utilizó la fórmula:

$$\mu\text{moles/min/mg prot} = \frac{(\Delta\text{D.O.} / \Delta t) \cdot V}{10^3 \cdot \epsilon \cdot 10^{-6} \cdot d \cdot v \cdot P}$$

#### **Donde:**

ε = coeficiente extinción molar del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm (39.58 · M<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup>)

10<sup>-6</sup>: factor de conversión a µM

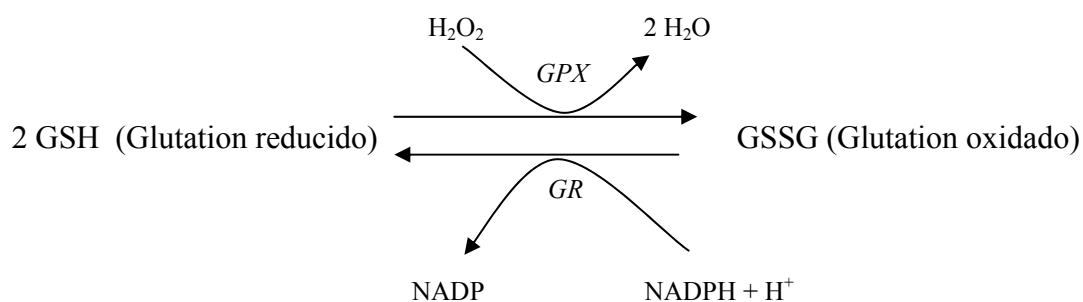
10<sup>3</sup>: conversión de litros a mililitros

### **5.11.2. Glutation peroxidasa (GPX)**

#### Fundamento

El método utilizado en la medida de la actividad GPX (E.C. 1.11.1.9.) es el de Paglia y Valentine (1967), en el que se usa agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como sustrato.

La actividad enzimática se cuantificó midiendo la variación de D.O. debida a la degradación de NADPH utilizado para regenerar el glutatión reducido a partir del glutatión oxidado obtenido por la acción de la glutatión peroxidasa.



### Reactivos

\* Solución reactiva extemporánea en tampón fosfato 50 mM pH 7.2 de:

- Azida sódica 4.3 mM
- EDTA (etilén diamino tetracético) 1mM
- GSH 4 mM
- NADPH 0.2 mM
- Glutatión reductasa 1.1 U / ml

\* Solución extemporánea de peróxido de hidrógeno 36.2 mM en tampón fosfato 52 mM, pH 7.2.

### Procedimiento

Para la medida de actividad se utilizaron cubetas de cristal de 1 ml a las que se añadieron 930  $\mu$ l de solución reactiva y 35  $\mu$ l de extracto, después se añadieron 35  $\mu$ l de sustrato (solución de peróxido de hidrógeno), y tras agitarlas se midió el descenso de absorbancia a 340 nm durante tres minutos a una temperatura de 25 °C.

### Cálculos

La actividad se expresa como nmoles de NADPH oxidados a NADP / min / mg proteína según la fórmula descrita en el apartado 5.10.6.

### **5.11.3. Glutation reductasa (GR)**

#### Fundamento

La actividad enzimática de la GR (E.C. 1.6.4.2.) se determinó según el método de Carlberg y Mannervik (1975) con algunas modificaciones, midiéndose el descenso de absorbancia a 340 nm debido a la oxidación de NADPH utilizado por la glutatión reductasa en el paso de GSSG a GSH.

#### Reactivos

- Tampón fosfato sódico 0.1 M pH 7.5, EDTA 0.1 M
- Solución extemporánea de glutatión oxidado (GSSG) 3.25 mM en tampón fosfato sódico
- Solución extemporánea de NADPH 1.05 mM en tampón fosfato sódico

#### Procedimiento

Para la reacción se utilizaron cubetas de cristal de 1 ml, añadiéndose 600 µl de NADPH, 250 µl de extracto y 150 µl de GSSG, como sustrato para iniciar la reacción, tras agitarlas se midió el descenso de absorbancia a 340 nm durante dos minutos a una temperatura de 25 °C.

### Cálculos

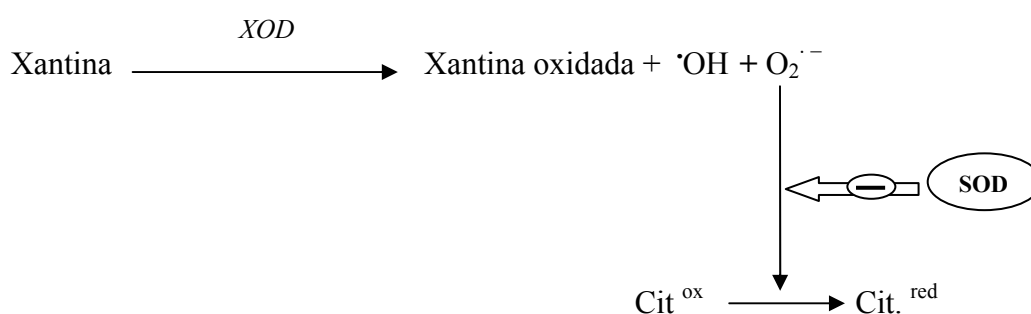
La actividad se expresó como nmoles de NADPH oxidados a NADP / min / mg proteína según la fórmula descrita en el apartado 5.10.6.

### 5.11.4. Superóxido dismutasa (SOD)

#### 1) MEDIDA CUANTITATIVA

##### Fundamento

El cálculo de la actividad SOD (E.C. 1.15.1.1) se utilizó según el método de Mc. Cord y Fridovich, (1969), basado en la medida de la tasa de inhibición, por parte de la superóxido dismutasa, en el proceso de reducción del citocromo C por radicales libres  $O_2^{\cdot-}$ , generados por el sistema enzimático xantina - xantina oxidasa (XOD).



##### Reactivos

- Tampón fosfato 50 mM pH 7.8, EDTA 0.1 mM
- Solución extemporánea de citocromo C 1mM
- Solución extemporánea de xantina 1 mM
- Solución extemporánea de xantina oxidasa comercial (E.C. 1.1.3.22.) 0.8 U / ml
- Ditionito sódico (Hidrosulfito sódico)

##### Procedimiento

Todas las soluciones se prepararon con tampón fosfato 50 mM sin EDTA.

Se preparó un volumen total de solución teniendo en cuenta las siguientes proporciones por cubeta:

| <b>Solución</b> | <b>Volumen Cubeta</b> |
|-----------------|-----------------------|
| Tampón fosfato  | 2.67 ml               |
| Citocromo C     | 40.6 $\mu$ l          |
| Xantina         | 0.29 $\mu$ l          |
| TOTAL           | 3 ml                  |

Esta solución se mantuvo protegida de la luz, con un burbujeo de aire durante 40 minutos. Se realizaron tres tipos de medidas en cubetas de cristal de 3 ml a una temperatura de 25 °C:

- *Comprobación de la solución de reacción:*
  - 3 ml de solución de reacción en cubeta
  - Se ajustó a cero el espectrofotómetro
  - Se añadió una pequeña cantidad (0.05 g) de ditionito sódico (hidrosulfito sódico) suficiente para reducir a todo el citocromo C.
  - Comprobación de la reducción total del citocromo C al obtener valores de lectura de absorbancia a 550 nm, comprendidos entre 0.20 y 0.24.
  
- *Reacción control:*
  - 3 ml de solución de reacción en cubeta
  - Se añadió 20  $\mu$ l de XOD
  - Lectura a 550 nm durante 3 minutos hasta obtener una tasa de reducción del citocromo C entre 0.023-0.028 unidades.
  - Esta reacción se debe de repetir 3-4 veces y hacer una media con los resultados
  
- *Reacción problema*
  - 3 ml de solución de reacción en cubeta

- 20 µl de extracto
- 20 µl de XOD para iniciar la reacción
- Agitación y posterior lectura a 550 nm durante 3 minutos

Cálculos:

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

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

$$U_{\text{SOD}}/\text{ml} = \frac{\% \text{ inhibición}}{50 \%} \cdot \frac{1}{\text{vol. muestra (ml)}} \cdot \text{factor de dilución}$$

2) *ENSAYO EN GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE nativa)*

Fundamento

La existencia de las distintas isoenzimas de la SOD fue detectada por electroforesis en geles de poliacrilamida utilizando el procedimiento vertical de geles en placa, según el método descrito por Ornstein (1964) y Davis (1964).

Reactivos

- Acrilamida 10 % (p/v) y bis-acrilamida 0.45 % (p/v) (gel separador)
- Acrilamida 4 % (p/v) y bis-acrilamida 0.21 % (p/v) (gel concentrador)
- Tampón Tris-HCl 0.375 M pH 8.9 (gel separador)
- Tampón Tris-HCl 0.062 M pH 6.8 (gel concentrador)

### III.- Material y Métodos

---

- TEMED (teramilen-etilen-diamina)
- Solución extemporánea de persulfato amónico 10 % (p/v)
- Tampón Tris 5.8 mM , 32 mM glicina pH 8.3 (tampón electrodos)
- Solución de sacarosa al 40 %, azul de bromofenol 0.005 % (tampón muestra)
- Solución de NBT 2.45 mM en tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8
- Solución de riboflavina 28  $\mu$ M, TEMED 0.4 % (p/v) en el tampón anterior

#### Procedimiento

Se utilizó un equipo Mini Protean II de Bio Rad, en el que se prepararon dos tipos de geles de 0.75 mm de espesor: primero el **separador** y, posteriormente, se dispuso sobre éste una capa del gel **concentrador**.

Las proporciones de los componentes de cada uno de ellos son las siguientes:

|  | <b>Gel separador</b> | <b>Gel concentrador</b> |
|--|----------------------|-------------------------|
| Acrilamida   | 5.055 g              | 1 g                     |
| Bis-acrilamida   | 0.2275 g             | 0.053 g                 |
| Tampón gel separador   | hasta 50 ml          | —                       |
| Tampón gel concentrador  | —                    | hasta 25 ml             |
| <i>Desgasar durante 5-10 minutos</i><br><i>Poner sobre baño de hielo 5 minutos</i> |                      |                         |
| TEMED  | 100 $\mu$ l          | 100 $\mu$ l             |
| Persulfato amónico   | 1 ml                 | 1 ml                    |

Una vez preparados los geles y cargadas cada una de las muestras previamente preparadas con el tampón de la muestra, se preparó el soporte de geles y la cubeta conteniendo el tampón de electrodos para la electroforesis.



Los primeros 10 minutos se iniciaron con un amperaje constante de 20 mA / gel y posteriormente a 40 mA / gel hasta que el frente se situó a 1 cm del extremo anódico (aproximadamente 40 minutos). Todo el proceso se llevó a cabo a 4 °C. Concluida la electroforesis se procedió al revelado de los geles para la SOD, según el método fotoquímico descrito por Beauchamp y Fridovich en 1971.

Este método se basa en la reducción del nitro blue tetrazolium (NBT) por los radicales superóxido, generados por una solución de riboflavina y TEMED al incidir sobre ésta la luz. En este caso, la aparición de bandas acromáticas puso de manifiesto la actividad SOD ya que debido a su actividad no se llevó a cabo la reducción del NBT por los radicales superóxido (Weisiger y Fridovich, 1973).

El proceso detallado es el siguiente:

- Se incubaron los geles a 25 °C durante 20 minutos en la solución de NBT
- Se retiró el NBT y se incubó a 25 °C durante 15 minutos en la solución de riboflavina.
- Se retiró la solución anterior y se lavó dos veces con tampón fosfato 50 mM, pH 7.8. Los geles se iluminaron, parándose la reacción cuando se consiguió un buen contraste de bandas.

Para poner de manifiesto los distintos tipos de SOD, previamente a todo el proceso descrito se procedió a incubar los geles a 25 °C durante 30 minutos con inhibidores específicos de la enzima:

- CuZn-SOD: incubación en una solución de CNK 2 mM en tampón fosfato 50 mM pH 7.8
- Fe-SOD: incubación en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM en el tampón anterior.

El CNK inhibe la CuZn-SOD, mientras que no afecta a la Fe-SOD ni a la Mn-SOD. Por otro lado, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibe la CuZn-SOD y la Fe-SOD y no la Mn-SOD que es resistente a dicho inhibidor (Fridovich, 1986). Transcurrido el tiempo de

incubación, se lavaron los geles con tampón y se realizó el revelado fotoquímico anteriormente descrito.

### **5.11.5. Niveles de peroxidación lipídica**

#### Fundamento

La técnica está basada en la formación de malondialdehido (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 una especie roja que absorbe la luz a 535 nm (Buege y Aust, 1978).

#### Reactivos

- Ac. Tricloroacético (TCA) 15 % (p/v)
- Ac. Tiobarbitúrico (TBA) 0.375 % (p/v)
- HCl 0.25 N
- Hidroxitolueno butilado 0.01 % (p/v)
- Malondialdehido (MDA) 0.1 M

#### Procedimiento

*\*Reactivo extemporáneo:* 15 g de TCA en 80 ml de HCl, una vez disuelto se añaden 0.375 g 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 dos horas y calentando ligeramente.

En la técnica es fundamental que todo el material que se utilice esté previamente lavado con agua miliQ.

Se realizó una curva patrón a partir de la solución madre de MDA con las siguientes concentraciones: 0.1, 0.25, 1, 5, 10, 15, y 20  $\mu\text{M}$ .

| [MDA] ( $\mu\text{M}$ ) | Sol. Madre (ml) | H <sub>2</sub> O miliQ (ml) | Vol. Total (ml) |
|-------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------|
| <b>0.1</b>              | 0.01            | 9.99                        | 10              |
| <b>0.25</b>             | 0.025           | 9.975                       | 10              |
| <b>1</b>                | 0.1             | 9.9                         | 10              |
| <b>5</b>                | 0.5             | 9.5                         | 10              |
| <b>10</b>               | 1               | 9                           | 10              |
| <b>15</b>               | 1.5             | 8.5                         | 10              |
| <b>20</b>               | 2               | 8                           | 10              |

Para llevar a cabo la reacción, se mezclaron 0.2 ml de muestra (extractos o patrones) y 1 ml de reactivo. A continuación se agitó vigorosamente y se incubó a 100 °C durante 15 minutos. Se dejó enfriar y se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se llevó a cubetas de cristal de 1 ml y se realizó la lectura de D.O. a 535 nm a una temperatura de 25 °C, frente a un blanco de reactivo.

#### Cálculos

A partir de los datos de absorbancia obtenidos en la curva patrón, se construyó una recta de regresión. Los valores de las muestras se calcularon por interpolación obteniéndose las concentraciones de MDA de éstas.

Los niveles de peroxidación lipídica se expresaron como:

$$\mu\text{M MDA} = \text{nmol MDA} / \text{g tejido}$$

### **5.11.6. Detección inmunoelectroforética de proteínas asociadas a la enzima Óxido nítrico sintasa (NOS)**

El procedimiento se realizó según el método descrito por Barroso *et al.* (2000). Para ello se utilizó un volumen de cada muestra conteniendo 30 µg de proteína que se calentó a 95 °C durante cinco minutos con tampón Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, conteniendo SDS al 2%, glicerol al 10%, y DTT 10mM.

Los polipéptidos de cada muestra se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en un equipo Mini Protean II de Bio Rad, siendo posteriormente transferidos a una membrana de polivinil difluoruro (PVDF) (Immobilon P, Millipore, Bedford, MA).

Para la inmunodetección, las membranas fueron incubadas a 4 °C con un anticuerpo primario de conejo frente a la proteína iNOS, volviéndose posteriormente a incubar con un anticuerpo secundario obtenido en cabra el cual se unirá sólo a los anticuerpos primarios. El anticuerpo secundario está acoplado a una peroxidasa, que tras realizar la descomposición de peróxido de hidrógeno durante el proceso de revelado, en presencia de luminol, va a dar lugar a una reacción de quimioluminiscencia en aquellas zonas donde se encuentren las proteínas inicialmente unidas al anticuerpo primario. Tras la impresión en membranas radiológicas, el posterior revelado en cámara oscura mostrará la presencia de la proteína en aquellas zonas donde se encuentren bandas oscuras.

Para la cuantificación de las bandas obtenidas en las membranas se utilizó un densitómetro (Shimadzu, CS-9000), realizándose la lectura de éstas a una longitud de onda de 620 nm. Los valores de área obtenidos se expresaron como unidades arbitrarias.

Los reactivos utilizados en los todos los análisis bioquímicos descritos anteriormente proceden de Roche Diagnostics, Sigma Chemical y Bio-Rad. El resto de los productos químicos fueron suministrados por Merk y Sharlau.

## 5.12. ÍNDICES BIOLÓGICOS

### 5.12.1. Crecimiento y eficacia alimentaria

El incremento de peso se expresó como porcentaje del peso medio inicial en cada caso:

$$\Delta\text{Peso} = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

Otra índice de crecimiento es la Tasa de Crecimiento Instantáneo (TCI) que expresa el porcentaje de crecimiento diario en los animales y que viene dado por la siguiente expresión:

$$TCI = \frac{\ln(\text{Peso final}) - \ln(\text{Peso inicial})}{n^\circ \text{ días}} \times 100$$

Uno de los índices que reflejan la eficacia de la dieta ingerida, así como la capacidad de aprovechamiento de ésta por parte del animal, es el de Eficacia Alimentaria (EA), el cual viene dado por la siguiente expresión:

$$EA = \frac{\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)}}{\text{alimento ingerido (g)}}$$

En este caso el peso del animal viene reflejado en gramos de sustancia fresca y el del alimento ingerido en todo el período de crecimiento, en gramos de sustancia seca.

### **5.12.2. Utilización de la proteína**

Uno de los principales componentes de la dieta es la fuente proteica ya que el aprovechamiento más beneficioso que el animal puede hacer de ésta es que tenga un destino estructural que se traducirá en un incremento de peso.

Existen una serie de índices que reflejan este aprovechamiento de la proteína en función de los valores de nitrógeno ingeridos y retenidos. Así, el índice referido al Valor Productivo de la Proteína (VPP) establece una relación porcentual entre la ganancia de nitrógeno corporal y el nitrógeno ingerido en un determinado espacio de tiempo, y viene expresado de la siguiente forma:

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

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

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

### 5.12.3. Índices biométricos

En este caso se calculó el Factor de Condición (también conocido como Índice de nutrición), en el que se relaciona el peso y la longitud de los animales siguiendo la siguiente expresión:

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

La relación porcentual entre el peso del hígado y el peso corporal está definida por el Índice Hepatosomático (IHS). Variaciones anormales de sus valores pueden poner de manifiesto algunas alteraciones fisiológicas o metabólicas. Se expresa de la siguiente forma:

$$IHS = \left[ \frac{\text{Peso hígado (g)}}{\text{Peso pez (g)}} \right] \times 100$$

### 5.13. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete estadístico CSS: STATISTICA de Statsoft Inc. Tulsa (USA) y SPSS 10.0 para Windows, 1999.

Para la estimación de posibles diferencias dentro de un grupo de tratamientos se utilizó el Análisis de la Varianza de una vía (ANOVA). En caso de existir diferencias significativas asociadas a una variable, se aplicó el test de Rango Múltiple de Duncan

(1955). Para poner de manifiesto el efecto general y combinado de las variables sobre los parámetros medidos se aplicó el Análisis de la Varianza de dos vías.

En todos los casos, salvo que se especifique otro valor, el margen de confianza considerado en las comparaciones fue del 95 % ( $P < 0.05$ ). Todos los resultados se expresaron como la medida  $\pm$  error estándar.

En el cálculo de la dispersión de peso entre animales se realizaron histogramas de frecuencia en los que se mostró la aproximación a la curva normal y los valores del coeficiente de variación y de la desviación típica para cada situación experimental.

Para el análisis de dependencia entre variables se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. Se realizó la representación gráfica de la recta de regresión entre ambas variables estableciéndose un intervalo de predicción de la media de un 95% de confianza.



## **IV.- RESULTADOS**



## **1. ENSAYO 1.- EFECTO DE LA DENSIDAD DE PECES EN TRUCHAS ARCO IRIS CON DIFERENTE GRADO DE RESPUESTA DE ESTRÉS**

Como ya se indicó anteriormente (Material y métodos, apartados 1.1. y 2.), las truchas utilizadas en este ensayo pertenecían a una primera generación de animales obtenida a partir de progenitores seleccionados en función del grado de respuesta a una situación de estrés, establecido según los niveles plasmáticos de cortisol. De esta manera, truchas LR (baja respuesta), HR (alta respuesta) y un grupo control de animales no seleccionados, con un peso medio inicial de 30-35 g, fueron mantenidas durante cuatro semanas a dos densidades diferentes: una considerada estresante (100 g/l) y otra asociada a condiciones normales (20 g/l), lo que dio lugar a un total de seis situaciones experimentales.

### **1.1. CRECIMIENTO, INGESTA E ÍNDICES NUTRICIONALES**

Los resultados de incremento de peso, tasa de crecimiento instantáneo (TCI) e ingesta (Tabla IV.1) reflejan un claro efecto de la densidad de peces, mostrando valores significativamente inferiores en los animales sometidos a alta densidad. En cuanto a los índices de eficacia alimentaria (EA), coeficiente de eficacia en crecimiento (CEC) y valor productivo de la proteína (VPP) (Tabla IV.1.) no se observó ningún efecto de la densidad de peces sobre sus valores.

En relación al efecto de la selección, con independencia de la densidad de peces, se observa que los animales HR presentan valores inferiores de incremento de peso, TCI e ingesta que los animales LR, siendo en estos últimos incluso superiores a los de los animales control excepto para los valores de ingesta a alta densidad. En cuanto a la EA, CEC y VPP, el patrón de comportamiento en condiciones de baja densidad es similar, observándose valores claramente inferiores en animales HR con respecto a los LR. Una

tendencia similar se observó para estos parámetros en condiciones de alta densidad, aunque la inferioridad de los valores de LR con respecto a HR sólo fue significativa para la EA.

El anexo a la Tabla IV.1. pone de manifiesto el efecto de la densidad, la selección, y de ambos parámetros en conjunto, sobre el crecimiento y la ingesta. La selección tuvo efecto únicamente sobre los índices de utilización del alimento y de la proteína.

**Tabla IV.1.-** Efecto de la densidad de peces y la selección parental sobre la ingesta e índices de crecimiento y de conversión del alimento.

| SELECCIÓN | Densidad de peces (g/l) | $\Delta$ Peso (%)         | Ingesta diaria (g/100 g pez / día) | TCI (%)                   | EA                       | CEC                      | VPP (%)                  |
|-----------|-------------------------|---------------------------|------------------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| LR        | 100                     | 69.58 ± 2.1 <sup>bx</sup> | 1.59 ± 0.01 <sup>bx</sup>          | 1.96 ± 0.05 <sup>bx</sup> | 1.21 ± 0.02 <sup>b</sup> | 2.96 ± 0.06              | 44.31 ± 0.9 <sup>b</sup> |
| HR        | 100                     | 56.42 ± 1.3 <sup>ax</sup> | 1.44 ± 0.01 <sup>ax</sup>          | 1.66 ± 0.03 <sup>ax</sup> | 1.13 ± 0.01 <sup>a</sup> | 2.77 ± 0.01              | 41.51 ± 0.5 <sup>b</sup> |
| C         | 100                     | 66.09 ± 1.4 <sup>b</sup>  | 1.67 ± 0.05 <sup>bx</sup>          | 1.88 ± 0.03 <sup>a</sup>  | 1.11 ± 0.08 <sup>a</sup> | 2.71 ± 0.20              | 37.06 ± 1.0 <sup>a</sup> |
| LR        | 20                      | 119.8 ± 1.2 <sup>b</sup>  | 2.23 ± 0.03 <sup>c</sup>           | 2.92 ± 0.02 <sup>b</sup>  | 1.24 ± 0.04 <sup>c</sup> | 3.05 ± 0.08 <sup>c</sup> | 47.23 ± 1.7 <sup>b</sup> |
| HR        | 20                      | 84.31 ± 3.3 <sup>a</sup>  | 1.99 ± 0.02 <sup>a</sup>           | 2.27 ± 0.07 <sup>a</sup>  | 1.10 ± 0.01 <sup>b</sup> | 2.70 ± 0.03 <sup>b</sup> | 38.96 ± 1.5 <sup>a</sup> |
| C         | 20                      | 78.11 ± 5.8 <sup>a</sup>  | 2.10 ± 0.04 <sup>b</sup>           | 2.14 ± 0.10 <sup>a</sup>  | 0.99 ± 0.02 <sup>a</sup> | 2.42 ± 0.04 <sup>a</sup> | 38.84 ± 1.0 <sup>a</sup> |

<sup>a, b, y c</sup> : Diferencias entre grupos sometidos a una misma densidad. <sup>x</sup>: Diferencias para un mismo grupo a ambas densidades. Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la media de 3 lotes ± error estándar. TCI (tasa de crecimiento instantáneo):  $(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial} / n^\circ \text{ días}) \times 100$ ; EA (eficacia alimentaria): incremento peso (g)/ alimento ingerido (g); CEC (coeficiente de eficacia en crecimiento): incremento peso (g)/ proteína ingerida (g); VPP (valor productivo de la proteína):  $(N \text{ retenido (g)} / N \text{ ingerido (g)}) \times 100$ .

**Anexo Tabla IV.1.-** ANOVA de dos vías para la densidad y la selección en los distintos parámetros medidos.

|                      | <b>ΔPeso</b> | <b>Ingesta diaria</b> | <b>TCI</b> | <b>EA</b> | <b>CEC</b> | <b>VPP</b> |
|----------------------|--------------|-----------------------|------------|-----------|------------|------------|
| DENSIDAD             | 0.001        | 0.001                 | 0.001      | n.s       | n.s        | n.s        |
| SELECCIÓN            | 0.001        | 0.001                 | 0.001      | 0.01      | 0.01       | 0.001      |
| DENSIDAD * SELECCIÓN | 0.01         | 0.05                  | 0.01       | n.s       | n.s        | n.s        |

n.s: no existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

## 1.2. LONGITUD E ÍNDICES BIOMÉTRICOS

Los resultados expuestos en la Tabla IV.2. reflejan una tendencia de los valores de longitud y factor de condición (FC) a disminuir en determinados grupos de peces sometidos a alta densidad de peces. Así, los animales LR presentaron valores de longitud significativamente menores en condiciones de alta densidad, observándose en estas mismas condiciones de densidad, valores de FC significativamente inferiores en animales HR y control. No se detectó influencia alguna sobre el índice hepatosomático, aunque sí cierta tendencia en los animales LR y HR a mostrar valores inferiores en condiciones de alta densidad con respecto a estos mismos grupos a baja densidad.

En cuanto al efecto de la selección (Tabla IV.2.), los valores de longitud son significativamente mayores en los animales LR con respecto a los HR, a baja densidad, observándose una tendencia similar a alta densidad, aunque no significativa. Asimismo, en relación al factor de condición, los animales HR sometidos a alta densidad presentaron los valores significativamente más bajos. Por último, cabe destacar la presencia de valores más altos de índice hepatosomático en los animales HR con respecto a LR a ambas densidades, aunque esta tendencia no fue significativa.

**Tabla IV.2.-** Influencia de la densidad de peces y selección parental sobre la longitud, factor de condición e índice hepatosomático.

| SELECCIÓN | Densidad de peces (g/l) | Longitud estándar (cm)   | FC (g/cm <sup>3</sup> )    | IHS (%)    |
|-----------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|------------|
| LR        | 100                     | 13.90 ± 0.2 <sup>x</sup> | 1.48 ± 0.03 <sup>b</sup>   | 1.52 ± 0.1 |
| HR        | 100                     | 13.53 ± 0.5              | 1.27 ± 0.05 <sup>a x</sup> | 1.60 ± 0.2 |
| C         | 100                     | 13.35 ± 0.3              | 1.42 ± 0.02 <sup>b x</sup> | 1.77 ± 0.1 |
| LR        | 20                      | 14.90 ± 0.2 <sup>b</sup> | 1.48 ± 0.08                | 1.75 ± 0.1 |
| HR        | 20                      | 13.66 ± 0.3 <sup>a</sup> | 1.50 ± 0.03                | 1.96 ± 0.1 |
| C         | 20                      | 13.86 ± 0.2 <sup>a</sup> | 1.58 ± 0.03                | 1.77 ± 0.1 |

<sup>a, b, y c</sup> : Diferencias entre grupos sometidos a una misma densidad. <sup>x</sup>: Diferencias para un mismo grupo a ambas densidades. Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la media de 3 lotes ± error estándar. FC (factor de condición): (peso (g)/ longitud<sup>3</sup> (cm)) x 10<sup>3</sup>; IHS (índice hepatosomático): (peso hígado (g)/ peso pez (g)) x 100.

**Anexo Tabla IV.2.-** ANOVA de dos vías para la densidad y la selección en los distintos parámetros medidos.

|                      | Longitud estándar | FC    | IHS  |
|----------------------|-------------------|-------|------|
| DENSIDAD             | 0.05              | 0.001 | 0.05 |
| SELECCIÓN            | 0.01              | 0.05  | n.s  |
| DENSIDAD * SELECCIÓN | n.s               | 0.05  | n.s  |

n.s: no existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

El análisis global reflejado en el anexo a la Tabla IV.2. revela una influencia significativa de la densidad sobre estos tres parámetros. La selección influyó en la longitud y factor de condición, encontrándose, sólo en éste último, un efecto combinado de ambas variables.

### 1.3. COMPOSICIÓN CORPORAL

Los análisis de composición corporal de los animales al inicio y final del experimento se reflejan en la Tabla IV.3. En general, los resultados muestran un aumento del contenido lipídico en todos los grupos, asociado a un descenso en los niveles de cenizas y proteína, esta última sólo a baja densidad, que fue significativo en la mayoría de los grupos. Cabe destacar que estas variaciones no se pusieron de manifiesto en los grupos HR a alta densidad.

Los animales sometidos a alta densidad mostraron, al final del experimento, valores más altos de cenizas, manifestándose, sin embargo, cierta tendencia general en los lípidos a disminuir a esta densidad, que fue significativa en los animales HR. En cuanto al efecto de la selección, se observa que los animales HR presentan a alta densidad un descenso significativo en los lípidos corporales, con respecto a los otros grupos, que se acompaña de un ligero aumento de la humedad corporal. En relación a las cenizas, los animales HR presentaron valores más altos, siendo estadísticamente significativos a baja densidad.



**Tabla IV.3.-** Influencia de la densidad de peces y selección parental sobre la composición corporal en trucha arco iris al inicio y final del Ensayo 1.

| SELECCIÓN | Densidad de peces (g/l) | HUMEDAD (%)               |                          | PROTEÍNA (ss) (%) |                           | LÍPIDOS (ss) (%)         |                            | CENIZAS (ss) (%) |                            |
|-----------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------|----------------------------|
|           |                         | Inicial                   | Final                    | Inicial           | Final                     | Inicial                  | Final                      | Inicial          | Final                      |
|           |                         | <b>LR</b>                 | <b>100</b>               | 71.01 ± 1.0       | 70.59 ± 0.3 <sup>ab</sup> | 55.98 ± 1.5              | 54.58 ± 0.5                | 34.85 ± 1.4      | 39.83 ± 0.7 <sup>b</sup> * |
| <b>HR</b> | <b>100</b>              | 70.66 ± 0.4               | 71.38 ± 0.2 <sup>b</sup> | 55.22 ± 1.7       | 56.82 ± 0.6 <sup>x</sup>  | 34.06 ± 1.3              | 36.27 ± 0.6 <sup>a</sup> x | 7.38 ± 0.1       | 7.35 ± 0.4                 |
| <b>C</b>  | <b>100</b>              | 69.63 ± 0.7               | 69.84 ± 0.4 <sup>a</sup> | 58.46 ± 3.3       | 47.39 ± 5.5               | 36.22 ± 2.1              | 42.43 ± 1.0 <sup>c</sup> * | 7.39 ± 0.3       | 6.32 ± 0.2 *               |
| <b>LR</b> | <b>20</b>               | 72.44 ± 0.4 <sup>b</sup>  | 70.86 ± 0.4 *            | 58.19 ± 1.1       | 53.73 ± 0.7 *             | 32.88 ± 0.8 <sup>a</sup> | 41.14 ± 0.7 *              | 6.94 ± 0.2       | 5.77 ± 0.1 <sup>a</sup> *  |
| <b>HR</b> | <b>20</b>               | 71.69 ± 0.3 <sup>ab</sup> | 70.76 ± 0.4              | 58.95 ± 1.0       | 54.07 ± 1.1 *             | 33.06 ± 0.8 <sup>a</sup> | 40.48 ± 1.2 *              | 7.22 ± 0.2       | 6.54 ± 0.2 <sup>b</sup> *  |
| <b>C</b>  | <b>20</b>               | 70.75 ± 0.4 <sup>a</sup>  | 70.64 ± 0.6              | 57.23 ± 1.3       | 52.51 ± 0.8 *             | 37.01 ± 0.8 <sup>b</sup> | 42.60 ± 0.7 *              | 6.74 ± 0.3       | 5.83 ± 0.2 <sup>a</sup> *  |

<sup>a, b, y c</sup> : Diferencias entre grupos sometidos a una misma densidad. <sup>x</sup>: Diferencias para un mismo grupo a ambas densidades. Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). \*: diferencias con respecto a valores iniciales de una misma situación experimental. Los valores reflejan la media ± error estándar (Inicial, n = 3 y Final, n = 5).

Los análisis estadísticos revelan un efecto general de la densidad y de la selección en el contenido de lípidos totales y cenizas, observándose también en el caso de los lípidos, un efecto conjunto de ambos parámetros (anexo Tabla IV.3).

**Anexo Tabla IV.3.-** ANOVA de dos vías para la densidad y la selección en los distintos parámetros medidos.

---

|                      | <b>HUMEDAD</b> | <b>PROTEÍNA</b> | <b>LÍPIDOS</b> | <b>CENIZAS</b> |
|----------------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|
| DENSIDAD             | n.s            | n.s             | 0.01           | 0.001          |
| SELECCIÓN            | n.s            | n.s             | 0.001          | 0.01           |
| DENSIDAD * SELECCIÓN | n.s            | n.s             | 0.05           | n.s            |

---

n.s: no existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

#### 1.4. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

La Tabla IV.4. refleja una influencia de la densidad en el hematocrito y hemoglobina de los animales HR, que mostraron valores significativamente superiores de ambos parámetros en condiciones de alta densidad. En cuanto a la influencia de la selección, se observa que en condiciones de alta densidad los valores de los parámetros hematológicos de los animales HR fueron estadísticamente superiores a los LR y control.

**Tabla IV.4.-** Influencia de la densidad de peces y selección parental sobre parámetros hematológicos.

| SELECCIÓN | Densidad de peces (g/l) | Hematocrito (%)             | Hemoglobina (mg/100 ml)     |
|-----------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| LR        | 100                     | 41.99 ± 1.84 <sup>a</sup>   | 8.09 ± 0.23 <sup>a</sup>    |
| HR        | 100                     | 52.44 ± 1.25 <sup>b,x</sup> | 11.10 ± 0.31 <sup>c,x</sup> |
| C         | 100                     | 43.07 ± 3.69 <sup>a</sup>   | 9.83 ± 0.20 <sup>b</sup>    |
| LR        | 20                      | 36.64 ± 1.88                | 9.03 ± 0.07                 |
| HR        | 20                      | 37.55 ± 4.81                | 9.17 ± 0.47                 |
| C         | 20                      | 40.84 ± 2.58                | 9.38 ± 0.14                 |

<sup>a, b, y c</sup> : Diferencias entre grupos sometidos a una misma densidad. <sup>x</sup>: Diferencias para un mismo grupo a ambas densidades. Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la media ± error estándar (n = 9).

### 1.5. GLUCOSA PLASMÁTICA Y GLUCÓGENO HEPÁTICO

Los niveles de glucosa plasmática y de glucógeno hepático, reflejados en la Tabla IV.5., muestran que, a alta densidad, se produce un incremento significativo de la glucemia en los animales HR. En el caso del glucógeno, no se encontraron diferencias estadísticas asociadas a la densidad de peces, aunque sí se observó un ligero descenso de sus niveles en animales LR y HR sometidos a alta densidad. Por otro lado, los análisis encaminados a determinar una posible influencia de la selección, revelan que, con independencia de la densidad, los grupos HR muestran niveles más altos de glucosa plasmática y más bajos de glucógeno con respecto a los LR y, en general, a los grupos control.

**Tabla IV.5.-** Influencia de la densidad de peces y selección parental sobre la glucosa plasmática y glucógeno hepático.

| SELECCIÓN | Densidad de peces (g/l) | Glucosa Plasmática (mg/100 ml) | Glucógeno Hepático (mg/100 gr tejido) |
|-----------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| LR        | 100                     | 73.25 ± 2.14 <sup>a</sup>      | 52.75 ± 4.62 <sup>b</sup>             |
| HR        | 100                     | 90.27 ± 0.57 <sup>b x</sup>    | 32.89 ± 4.42 <sup>a</sup>             |
| C         | 100                     | 77.96 ± 1.22 <sup>a</sup>      | 40.85 ± 2.73 <sup>ab</sup>            |
| LR        | 20                      | 71.86 ± 0.51 <sup>a</sup>      | 62.72 ± 4.62 <sup>b</sup>             |
| HR        | 20                      | 80.98 ± 1.22 <sup>b</sup>      | 39.74 ± 6.95 <sup>a</sup>             |
| C         | 20                      | 80.63 ± 0.72 <sup>b</sup>      | 43.10 ± 4.81 <sup>ab</sup>            |

<sup>a, b, y c</sup>: Diferencias entre grupos sometidos a una misma densidad. <sup>x</sup>: Diferencias para un mismo grupo a ambas densidades. Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la media ± error estándar (n = 9).

## 1.6. METABOLISMO INTERMEDIARIO

El análisis de la actividad de enzimas del metabolismo intermediario (Tabla IV.6.) pone de manifiesto el efecto de la densidad de peces sobre la actividad de algunos enzimas, aunque esta tendencia sólo se manifiesta de manera significativa en determinados grupos. Así, en condiciones de alta densidad, la AAT muestra valores de actividad superiores en los animales LR, la actividad PFK es mayor en los HR, mientras que la actividad PK desciende significativamente en los HR. La actividad FBPasa no presentó diferencia estadística alguna, aunque se observa una tendencia a incrementar su actividad en los animales HR a alta densidad.

Los análisis estadísticos revelan la influencia de la selección sobre las actividades AAT y PK en condiciones de baja densidad, presentando los animales HR valores de actividad superiores con respecto a los LR para ambas enzimas. A alta densidad se observa una tendencia similar, aunque ésta no es significativa. En relación a la actividad PFK, a alta densidad las diferencias estadísticas no se establecen entre los grupos LR y HR, sino entre

estos y los animales control. En cuanto a la FBPasa no se encuentran diferencias estadísticas asociadas a la selección, si bien se observa que, con independencia de la densidad, los HR presenta valores de actividad más bajos con respecto a los otros dos grupos.

**Tabla IV.6.-** Influencia de la densidad de peces y selección parental sobre algunos enzimas del metabolismo intermediario en hígado.

| SELECCIÓN | Densidad de peces (g/l) | FBPasa (nmoles/min/mg prot) | AAT (nmoles/min/mg prot)  | PK (nmoles/min/mg prot)   | PFK (nmoles/min/mg prot)   |
|-----------|-------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| LR        | 100                     | 64.78 ± 5.0                 | 264.2 ± 14.0 <sup>x</sup> | 113.0 ± 6.9               | 42.12 ± 2.6 <sup>b</sup>   |
| HR        | 100                     | 61.33 ± 1.7                 | 275.8 ± 3.7               | 117.9 ± 7.1 <sup>x</sup>  | 40.37 ± 2.0 <sup>b,x</sup> |
| C         | 100                     | 66.60 ± 6.0                 | 273.1 ± 16.9              | 93.20 ± 13.4              | 30.68 ± 2.5 <sup>a</sup>   |
| LR        | 20                      | 63.22 ± 2.3                 | 197.4 ± 9.6 <sup>a</sup>  | 111.8 ± 8.5 <sup>a</sup>  | 32.89 ± 3.2                |
| HR        | 20                      | 58.71 ± 2.9                 | 244.8 ± 12.7 <sup>b</sup> | 150.4 ± 13.3 <sup>b</sup> | 33.90 ± 1.7                |
| C         | 20                      | 68.40 ± 3.2                 | 238.7 ± 9.5 <sup>b</sup>  | 107.4 ± 7.4 <sup>a</sup>  | 30.40 ± 1.03               |

<sup>a, b, y c</sup>: Diferencias entre grupos sometidos a una misma densidad. <sup>x</sup>: Diferencias para un mismo grupo a ambas densidades. Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la media ± error estándar (n = 9).

En líneas generales, los análisis estadísticos (anexo Tabla IV.6.) revelan un efecto de la densidad de peces sobre las actividades AAT y PFK y un efecto de la selección sobre las actividades de las enzimas AAT, PK y PFK.

**Anexo Tabla IV.6.-** ANOVA de dos vías para la densidad y la selección en los distintos parámetros medidos.

|                      | FBPasa | AAT   | PK   | PFK  |
|----------------------|--------|-------|------|------|
| SELECCIÓN            | n.s    | 0.05  | 0.01 | 0.01 |
| DENSIDAD             | n.s    | 0.001 | n.s  | 0.01 |
| SELECCIÓN * DENSIDAD | n.s    | n.s   | n.s  | n.s  |

n.s: no existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

## **2. ENSAYO 2.- EFECTO DE LA DENSIDAD DE PECES EN TRUCHAS ARCO IRIS CON DIFERENTE DISPONIBILIDAD DE HUFAS Y DE VITAMINAS E Y C EN LA DIETA**

En este ensayo, como ya se vio anteriormente (Material y métodos, apartados 1.2 y 3.1.), se utilizaron truchas arco iris de un peso medio de 50 gramos que se alimentaron con cinco tipos de dietas experimentales, las cuales fueron formuladas en función de su diferente contenido en vitaminas E, C y de HUFAs (-E-HUFA, -E+HUFA, +E-HUFA, +E+HUFA, -C+E+HUFA). Para cada grupo de animales se establecieron dos densidades de peces diferentes, baja (20 g/l) y alta (100 g/l), lo que dio lugar a un total de 10 situaciones experimentales.

### **2.1. CRECIMIENTO, INGESTA, ÍNDICES NUTRICIONALES Y MORTALIDAD**

El análisis estadístico global (anexo Tabla IV.7.) revela una clara influencia de la densidad de peces en el incremento de peso y tasa de crecimiento instantáneo (TCI) así como en la ingesta y eficacia alimentaria (EA). Si bien, como se muestra en la Tabla IV.7., estas diferencias no fueron significativas en todos los grupos de animales, la tendencia fue generalizada. En cuanto al coeficiente de eficacia en crecimiento (CEC) y al valor productivo de la proteína (VPP), el análisis estadístico global (anexo Tabla IV.7.) no establece influencia de la variable densidad, aunque en determinados grupos (dietas +E-HUFA y +E+HUFA) sí se observan valores más altos a baja densidad.

La dieta consumida por los animales parece ser un factor que influye en la práctica totalidad de los parámetros estudiados, a excepción del incremento de peso (anexo Tabla IV.7.). Por otro lado, la Tabla IV.7. muestra que, sólo en condiciones de alta densidad los animales que consumieron dietas +E-HUFA presentan valores de incremento de peso y tasa de crecimiento instantáneo significativamente superiores al resto, siendo este mismo

grupo, y en las mismas condiciones de densidad, el que muestra, junto al -C+E+HUFA, los valores más altos de ingesta. Cabe destacar que, el análisis estadístico del efecto conjunto de la densidad y la dieta no mostró influencia alguna sobre el incremento de peso y la ingesta, observándose solamente un efecto conjunto de ambas variables sobre la tasa de crecimiento instantáneo (anexo Tabla IV.7.). En relación a la eficacia alimentaria y coeficiente de eficacia en crecimiento, se observa que a alta densidad los animales alimentados con la dieta +E+HUFA presentan los valores más altos, observándose los más bajos en los grupos -E-HUFA y -C+E+HUFA. Esta tendencia fue similar en el VPP aunque no de manera significativa. A baja densidad los índices de EA y VPP son superiores en los grupos +E+HUFA y +E-HUFA, con valores intermedios para la dieta -E+HUFA y, al igual que en condiciones de alta densidad, los valores más bajos se obtuvieron en los grupos -E-HUFA y -C+E+HUFA. En cuanto al CEC, el patrón de cambios es similar, aunque no significativo. Por otro lado, los análisis estadísticos no revelan la presencia de un efecto combinado de la dieta y la densidad sobre los índices de utilización del alimento (anexo Tabla IV.7.).

La mortalidad reflejada por número de individuos (Tabla IV.7.) fue escasa, aunque cabe destacar que, en condiciones de alta densidad, los animales alimentados con dieta -E+HUFA presentaron los valores más altos. En cuanto a los +E+HUFA fue el único grupo que, con independencia de la densidad, no presentó casos de mortalidad.

**Tabla IV.7.-** Efecto de la densidad de peces y la composición de la dieta sobre el crecimiento, la ingesta e índices de conversión del alimento.

| <b>DIETA</b>       | <b>Densidad de peces (g/l)</b> | <b>ΔPeso (%)</b>            | <b>Ingesta diaria (g /100 g pez/ día)</b> | <b>TCI (%)</b>             | <b>EA</b>                   | <b>CEC</b>                 | <b>VPP (%)</b>             | <b>Mortalidad (n° individuos.)</b> |
|--------------------|--------------------------------|-----------------------------|---|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 117.0 ± 2.30 <sup>a</sup>   | 1.59 ± 0.02 <sup>bc x</sup>               | 1.85 ± 0.02 <sup>a</sup>   | 1.10 ± 0.02 <sup>a</sup>    | 2.20 ± 0.03 <sup>a</sup>   | 41.77 ± 1.00               | 2                                  |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 122.6 ± 3.10 <sup>a</sup>   | 1.55 ± 0.01 <sup>ab x</sup>               | 1.91 ± 0.03 <sup>a x</sup> | 1.17 ± 0.01 <sup>bc</sup>   | 2.33 ± 0.03 <sup>bc</sup>  | 46.32 ± 2.38               | 12                                 |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 134.8 ± 4.03 <sup>b</sup>   | 1.67 ± 0.01 <sup>c</sup>                  | 2.03 ± 0.04 <sup>b</sup>   | 1.15 ± 0.02 <sup>ab x</sup> | 2.32 ± 0.04 <sup>bcx</sup> | 44.00 ± 2.38               | 2                                  |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 122.1 ± 1.20 <sup>a x</sup> | 1.51 ± 0.01 <sup>a</sup>                  | 1.90 ± 0.02 <sup>a x</sup> | 1.20 ± 0.01 <sup>c</sup>    | 2.40 ± 0.01 <sup>c</sup>   | 45.08 ± 0.65               | 0                                  |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>100</b>                     | 124.0 ± 2.90 <sup>a</sup>   | 1.66 ± 0.04 <sup>c</sup>                  | 1.92 ± 0.03 <sup>a</sup>   | 1.10 ± 0.01 <sup>a</sup>    | 2.24 ± 0.03 <sup>ab</sup>  | 42.57 ± 0.76               | 3                                  |
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 137.5 ± 10.70               | 1.79 ± 0.03                               | 2.05 ± 0.10 <sup>a</sup>   | 1.10 ± 0.06 <sup>a</sup>    | 2.15 ± 0.12                | 39.30 ± 2.75 <sup>a</sup>  | 2                                  |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 156.5 ± 18.16               | 1.73 ± 0.06                               | 2.38 ± 0.08 <sup>b</sup>   | 1.20 ± 0.04 <sup>ab</sup>   | 2.39 ± 0.08                | 43.24 ± 1.20 <sup>ab</sup> | 1                                  |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 151.5 ± 18.16               | 1.77 ± 0.10                               | 1.97 ± 0.08 <sup>a</sup>   | 1.28 ± 0.01 <sup>b</sup>    | 2.57 ± 0.02                | 47.47 ± 1.30 <sup>b</sup>  | 1                                  |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 154.7 ± 6.84                | 1.67 ± 0.05                               | 2.23 ± 0.06 <sup>ab</sup>  | 1.27 ± 0.06 <sup>b</sup>    | 2.54 ± 0.12                | 46.91 ± 2.30 <sup>b</sup>  | 0                                  |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>20</b>                      | 131.0 ± 14.50               | 1.76 ± 0.02                               | 2.12 ± 0.07 <sup>ab</sup>  | 1.14 ± 0.03 <sup>ab</sup>   | 2.16 ± 0.16                | 38.72 ± 1.50 <sup>a</sup>  | 1                                  |

<sup>a, b, y c</sup> : Diferencias entre dietas para una misma densidad. <sup>x</sup>: Diferencias para una misma dieta a ambas densidades. Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la media de 3 lotes ± error estándar al final de un período de 42 días. TCI (tasa de crecimiento instantáneo):  $(\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial} / \text{n}^\circ \text{ días}) \times 100$ ; EA (eficacia alimentaria): incremento peso (g)/ alimento ingerido (g); CEC (coeficiente de eficacia en crecimiento): incremento peso (g)/ proteína ingerida (g); VPP (valor productivo de la proteína):  $(N \text{ retenido (g)} / N \text{ ingerido (g)}) \times 100$ .



**Anexo Tabla IV.7.** ANOVA de dos vías para la densidad y la dieta en los distintos parámetros medidos.

|                  | $\Delta$ Peso | Ingesta diaria | TCI   | EA    | CEC  | VPP  |
|------------------|---------------|----------------|-------|-------|------|------|
| DIETA            | n.s           | 0.05           | 0.05  | 0.001 | 0.05 | 0.01 |
| DENSIDAD         | 0.01          | 0.001          | 0.001 | 0.05  | n.s  | n.s  |
| DIETA * DENSIDAD | n.s           | n.s            | 0.01  | n.s   | n.s  | n.s  |

n.s: no existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

## 2.2. LONGITUD E ÍNDICES BIOMÉTRICOS

Los resultados de la Tabla IV.8. revelan un aumento significativo de la longitud de los animales a lo largo del experimento, observándose una tendencia similar en el factor de condición que fue significativa en algunos grupos. En relación al índice hepatosomático, se observó, principalmente a alta densidad, un descenso al final del experimento.

La densidad de peces (Tabla IV.8. y anexo) no tuvo efecto sobre la longitud de los animales. Por el contrario, a los 21 días del experimento se observa que los peces alimentados con dietas suplementadas con vitamina E presentan, a baja densidad, valores significativamente más altos del factor de condición con respecto a los que se encuentran a alta densidad. En cuanto al índice hepatosomático, a los 42 días del experimento los valores tienden a ser algo superiores en condiciones de baja densidad, observándose de manera significativa en el grupo +E-HUFA.

En cuanto a la influencia de la dieta sobre la longitud de los animales, al final del experimento (Tabla IV.8.) se pone de manifiesto un descenso de sus valores en los animales alimentados con dietas carentes de vitamina E (-E-HUFA y -E+HUFA) y sometidos a alta densidad, observándose un comportamiento diferente a baja densidad (a los 21 y 42 días), en donde la dieta +E-HUFA promovió los valores más bajos.

**Tabla IV.8.** Influencia de la densidad de peces y composición de la dieta sobre la longitud, factor de condición e índice hepatosomático.

| DIETA              | Densidad de peces (g/l) | Longitud estándar (cm)     |                              | FC (g/cm <sup>3</sup> )  |               | IHS (%)                   |                            |
|--------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------------|--------------------------|---------------|---------------------------|----------------------------|
|                    |                         | 21 días                    | 42 días                      | 21 días                  | 42 días       | 21 días                   | 42 días                    |
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>100</b>              | 19.33 ± 0.23               | 20.64 ± 0.23 <sup>ab</sup> * | 1.23 ± 0.03              | 1.30 ± 0.05   | 1.95 ± 0.19 <sup>b</sup>  | 1.85 ± 0.23                |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>100</b>              | 18.73 ± 0.16               | 20.08 ± 0.17 <sup>a</sup> *  | 1.25 ± 0.05              | 1.30 ± 0.02   | 2.47 ± 0.14 <sup>c</sup>  | 1.78 ± 0.08 *              |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>100</b>              | 19.12 ± 0.24 <sup>x</sup>  | 21.00 ± 0.28 <sup>bx</sup> * | 1.13 ± 0.05 <sup>x</sup> | 1.25 ± 0.04   | 2.06 ± 0.15 <sup>bc</sup> | 1.64 ± 0.08 <sup>x</sup> * |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>100</b>              | 18.93 ± 0.24               | 21.13 ± 0.24 <sup>b</sup> *  | 1.15 ± 0.02 <sup>x</sup> | 1.35 ± 0.07 * | 1.46 ± 0.13 <sup>a</sup>  | 1.68 ± 0.09 *              |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>100</b>              | 18.78 ± 0.22               | 20.79 ± 0.23 <sup>b</sup> *  | 1.16 ± 0.03 <sup>x</sup> | 1.28 ± 0.03 * | 2.08 ± 0.16 <sup>bc</sup> | 1.93 ± 0.08                |
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>20</b>               | 19.41 ± 0.14 <sup>b</sup>  | 21.19 ± 0.27 <sup>b</sup> *  | 1.23 ± 0.03              | 1.30 ± 0.06   | 2.15 ± 0.19               | 2.00 ± 0.11                |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>20</b>               | 19.16 ± 0.21 <sup>b</sup>  | 20.76 ± 0.31 <sup>b</sup> *  | 1.25 ± 0.02              | 1.36 ± 0.04 * | 2.15 ± 0.25               | 1.97 ± 0.10 *              |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>20</b>               | 18.26 ± 0.29 <sup>a</sup>  | 19.80 ± 0.24 <sup>a</sup> *  | 1.26 ± 0.02              | 1.27 ± 0.07   | 2.10 ± 0.17               | 2.03 ± 0.09                |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>20</b>               | 18.77 ± 0.19 <sup>ab</sup> | 20.48 ± 0.28 <sup>ab</sup> * | 1.28 ± 0.03              | 1.30 ± 0.04   | 1.75 ± 0.11               | 1.92 ± 0.20                |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>20</b>               | 19.14 ± 0.21 <sup>b</sup>  | 20.47 ± 0.31 <sup>ab</sup> * | 1.36 ± 0.06              | 1.35 ± 0.05   | 2.01 ± 0.13               | 2.06 ± 0.13                |

<sup>a, b, y c</sup> : Diferencias entre dietas para una misma densidad. <sup>x</sup>: Diferencias para una misma dieta a ambas densidades. \*: diferencias entre las medidas realizadas a los 21 y 42 días para una misma situación experimental. Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la media ± error estándar (n = 12). FC (factor de condición): (peso (g)/ longitud<sup>3</sup> (cm)) x 10<sup>3</sup>; IHS (índice hepatosomático): (peso hígado (g)/ peso pez (g)) x 100.

En cuanto al factor de condición, no se aprecian diferencias asociadas al tipo de dieta si bien se observa una tendencia en los animales +E-HUFA a presentar valores más bajos en ambas densidades al final del experimento. Con respecto al índice hepatosomático, sólo se aprecian diferencias estadísticas a alta densidad a los 21 días, donde el grupo +E+HUFA presentó los valores más bajos, observándose una tendencia similar, aunque no significativa, a baja densidad. Este patrón tiende a mantenerse al final del experimento aunque no se establecen diferencias estadísticas. La valoración estadística conjunta pone de manifiesto una mayor influencia de la densidad en el factor de condición e índice hepatosomático. El tipo de dieta ingerida influye en el índice hepatosomático y la longitud de los animales. El efecto conjunto de ambas variables sólo se pone de manifiesto, de manera clara, en la longitud (anexo Tabla IV.8).

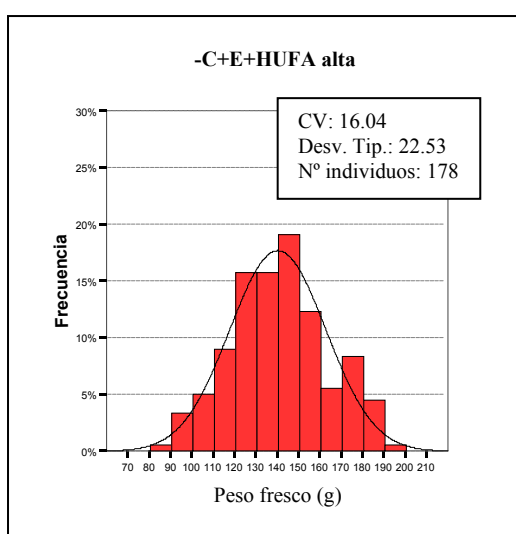
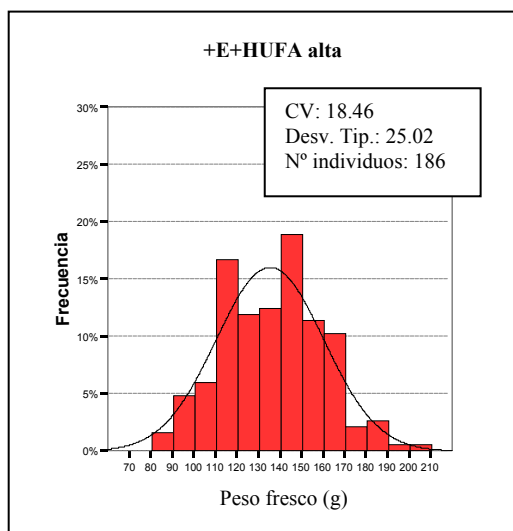
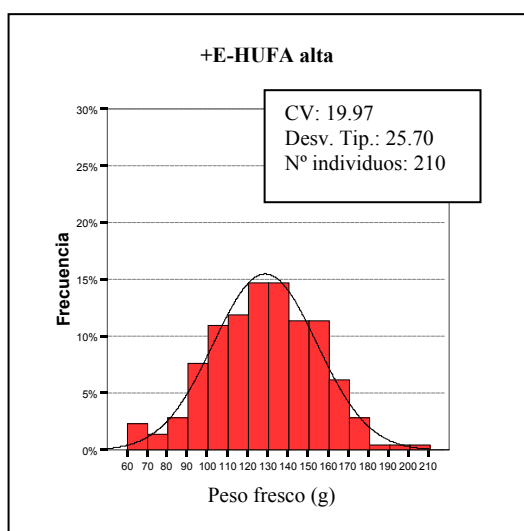
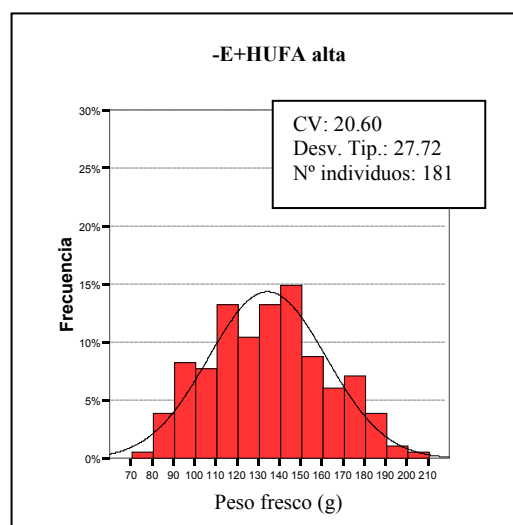
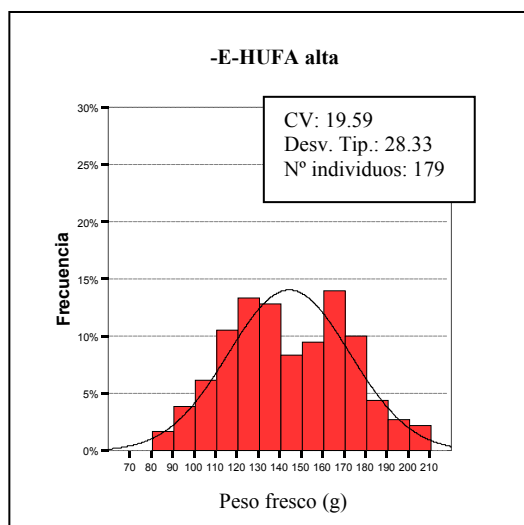
**Anexo Tabla IV.8.-** ANOVA de dos vías para la densidad y la dieta en los distintos parámetros medidos.

|                  | Período experimental (días) | Longitud estándar | FC    | IHS  |
|------------------|-----------------------------|-------------------|-------|------|
| DIETA            | 21                          | 0.05              | n.s   | 0.01 |
|                  | 42                          | n.s               | n.s   | n.s  |
| DENSIDAD         | 21                          | n.s               | 0.001 | n.s  |
|                  | 42                          | n.s               | n.s   | 0.01 |
| DIETA * DENSIDAD | 21                          | 0.05              | 0.05  | n.s  |
|                  | 42                          | 0.001             | n.s   | n.s  |

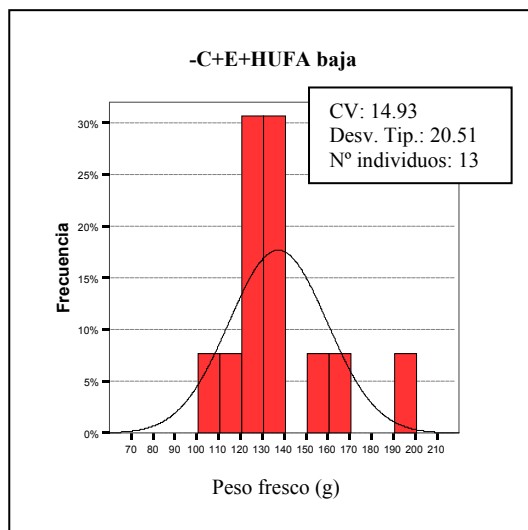
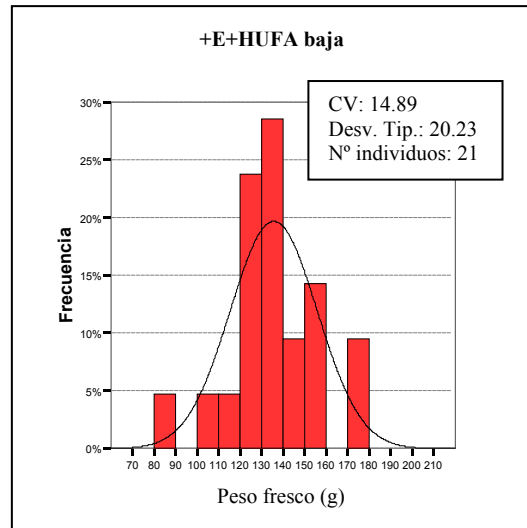
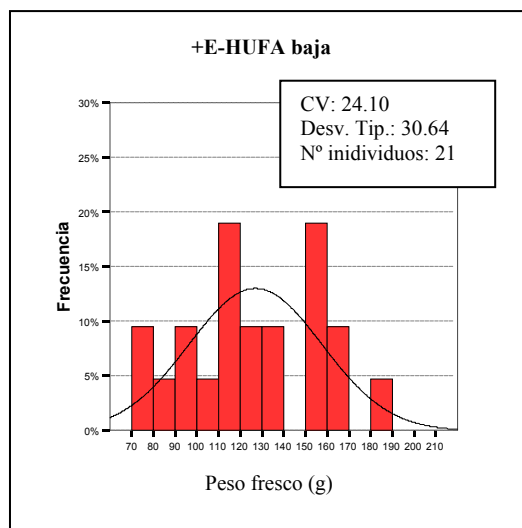
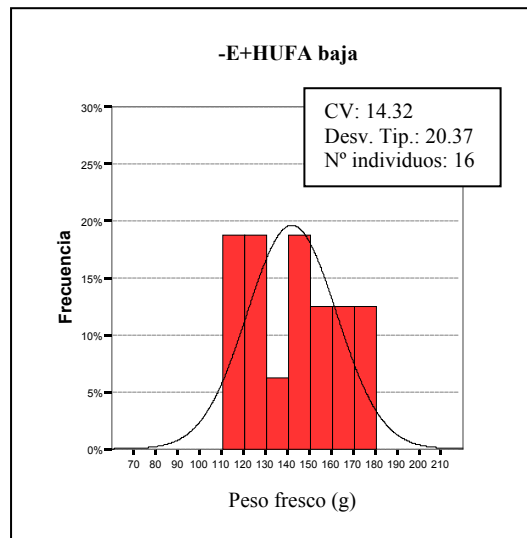
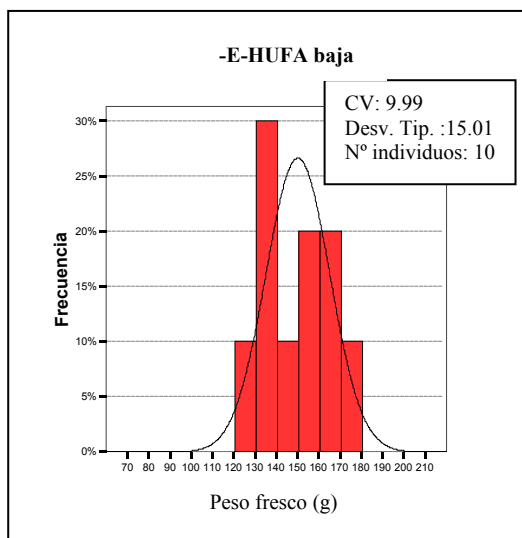
n.s: no existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

### 2.3. DISPERSIÓN DE PESO

Los histogramas de dispersión de peso (Figuras IV.1. y IV.2.) muestran que, en líneas generales, en los animales sometidos a condiciones de alta densidad se observa una mayor dispersión y un coeficiente de variación más elevado con respecto a los de baja. La curva de la campana de Gauss obtenida en los histogramas, donde se representan la frecuencia de animales para cada intervalo de peso, presenta una base mayor a alta densidad, lo que es reflejo de una mayor variabilidad en los pesos de estos animales al final del período experimental.



Figuras IV.1. y IV.2.- Efecto de la composición de la dieta y la densidad de peces en la dispersión de pesos entre individuos sometidos a una misma situación experimental. CV (coeficiente de variación (%)) =  $(100 \times \text{desviación típica}) / \text{peso medio}$ .



## 2.4. COMPOSICIÓN CORPORAL

Los resultados de composición corporal, reflejados en la Tabla IV.9., ponen de manifiesto, en todos los grupos, una disminución del contenido en humedad y cenizas a lo largo del período experimental. A los 21 días se observa una menor concentración de proteína, que luego tiende a recuperarse a los 42 días. En cuanto a los análisis de lípidos, estos revelan una tendencia a incrementar al final del experimento, aunque no de manera significativa en todos los grupos, encontrándose incluso, en el caso de los animales alimentados con dietas -C+E+HUFA a alta densidad, un descenso de sus niveles.

En cuanto al efecto de la densidad de peces, no se observan variaciones en el porcentaje de humedad, ocurriendo algo similar en los valores de proteína y lípidos, excepto en los animales -C+E+HUFA que presentaron un aumento y un descenso del contenido en proteína y lípidos, respectivamente, en condiciones de alta densidad.

Con relación al tipo de dieta, al final del experimento se observa alguna influencia de esta variable en los valores de humedad y lípidos en condiciones de alta densidad, poniéndose de manifiesto que aquellos grupos que presentan valores más altos de humedad se corresponden con los que tienen menos lípidos (+E+HUFA y -C+E+HUFA).

El análisis estadístico global (anexo Tabla IV.9.) revela una influencia de la dieta sobre los parámetros de composición corporal, a excepción de los minerales totales. La densidad tuvo influencias significativas sobre el contenido de proteína y cenizas. El efecto conjunto de la dieta y la densidad de peces sólo tuvo influencia sobre el contenido proteico.

**Tabla IV.9.-** Influencia de la densidad de peces y tipo de dieta sobre la composición corporal a lo largo del período experimental.

| DIETA       | Densidad de peces (g/l) | HUMEDAD (%) |               |                              | PROTEÍNA (ss) (%) |                             |                            | LÍPIDOS (ss) (%) |               |                             | CENIZAS (ss) (%) |              |                           |
|-------------|-------------------------|-------------|---------------|------------------------------|-------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------|---------------|-----------------------------|------------------|--------------|---------------------------|
|             |                         | Inicio      | 21 días       | 42 días                      | Inicio            | 21 días                     | 42 días                    | Inicio           | 21 días       | 42 días                     | Inicio           | 21 días      | 42 días                   |
| -E -HUFA    | 100                     | 72.30 ± 0.3 | 71.50 ± 0.5   | 68.78 ± 0.6 <sup>a</sup> *   | 59.43 ± 0.84      | 55.47 ± 0.7 *               | 57.19 ± 1.4                | 30.69 ± 0.89     | 32.51 ± 1.3   | 34.80 ± 1.6 <sup>b</sup> *  | 9.29 ± 0.14      | 8.86 ± 0.2   | 8.27 ± 0.3 *              |
| -E +HUFA    | 100                     | 72.30 ± 0.3 | 72.02 ± 0.4   | 69.83 ± 0.5 <sup>abc</sup> * | 59.43 ± 0.84      | 55.18 ± 0.8 *               | 60.86 ± 1.0                | 30.69 ± 0.89     | 31.47 ± 0.6   | 31.60 ± 1.1 <sup>ab</sup>   | 9.29 ± 0.14      | 8.95 ± 0.2   | 8.94 ± 0.2 *              |
| +E -HUFA    | 100                     | 72.30 ± 0.3 | 71.47 ± 0.5   | 69.43 ± 0.6 <sup>ab</sup> *  | 59.43 ± 0.84      | 54.50 ± 0.6 *               | 58.64 ± 1.7                | 30.69 ± 0.89     | 32.32 ± 1.4   | 33.56 ± 1.6 <sup>b</sup>    | 9.29 ± 0.14      | 8.98 ± 0.3   | 8.51 ± 0.3 <sup>x</sup> * |
| +E +HUFA    | 100                     | 72.30 ± 0.3 | 71.77 ± 0.4   | 70.63 ± 0.4 <sup>bc</sup> *  | 59.43 ± 0.84      | 56.35 ± 1.0 *               | 60.40 ± 0.8                | 30.69 ± 0.89     | 32.21 ± 1.5   | 30.79 ± 1.2 <sup>ab</sup>   | 9.29 ± 0.14      | 8.74 ± 0.2 * | 8.58 ± 0.2 *              |
| -C +E +HUFA | 100                     | 72.30 ± 0.3 | 71.50 ± 0.3 * | 71.03 ± 0.4 <sup>c</sup> *   | 59.43 ± 0.84      | 56.12 ± 0.7 *               | 61.76 ± 0.7 <sup>x</sup> * | 30.69 ± 0.89     | 32.11 ± 0.9   | 28.31 ± 0.9 <sup>ax</sup> * | 9.29 ± 0.14      | 9.18 ± 0.2   | 8.89 ± 0.2                |
| -E -HUFA    | 20                      | 72.30 ± 0.3 | 71.03 ± 0.2 * | 69.33 ± 0.4 *                | 59.43 ± 0.84      | 53.35 ± 1.0 <sup>a</sup> *  | 57.10 ± 1.4                | 30.69 ± 0.89     | 33.81 ± 0.9 * | 33.99 ± 1.2 *               | 9.29 ± 0.14      | 8.34 ± 0.2 * | 7.93 ± 0.3 *              |
| -E +HUFA    | 20                      | 72.30 ± 0.3 | 71.69 ± 0.6   | 70.19 ± 0.8 *                | 59.43 ± 0.84      | 54.59 ± 1.1 <sup>ab</sup> * | 58.61 ± 1.0                | 30.69 ± 0.89     | 31.10 ± 1.6   | 32.09 ± 0.8                 | 9.29 ± 0.14      | 8.87 ± 0.2 * | 8.20 ± 0.3 *              |
| +E -HUFA    | 20                      | 72.30 ± 0.3 | 70.73 ± 0.3 * | 69.95 ± 0.4 *                | 59.43 ± 0.84      | 57.20 ± 1.1 <sup>bc</sup>   | 57.28 ± 1.3 *              | 30.69 ± 0.89     | 33.16 ± 0.9 * | 34.81 ± 1.5 *               | 9.29 ± 0.14      | 8.52 ± 0.2 * | 8.31 ± 0.3 *              |
| +E +HUFA    | 20                      | 72.30 ± 0.3 | 71.43 ± 0.6   | 70.27 ± 0.4 *                | 59.43 ± 0.84      | 57.86 ± 0.7 <sup>c</sup> *  | 60.07 ± 0.3                | 30.69 ± 0.89     | 31.40 ± 0.9   | 31.39 ± 0.4                 | 9.29 ± 0.14      | 8.73 ± 0.2 * | 8.62 ± 0.2 *              |
| -C +E +HUFA | 20                      | 72.30 ± 0.3 | 71.74 ± 0.1 * | 70.40 ± 0.4 *                | 59.43 ± 0.84      | 54.02 ± 0.9 <sup>a</sup> *  | 58.37 ± 0.9                | 30.69 ± 0.89     | 31.58 ± 0.8   | 34.10 ± 0.6 *               | 9.29 ± 0.14      | 8.86 ± 0.2   | 8.44 ± 0.2 *              |

<sup>a, b y c</sup>: Diferencias entre dietas para una misma densidad. <sup>x</sup>: Diferencias para una misma dieta a ambas densidades. \*: diferencias con respecto a valores iniciales de una misma situación experimental. Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la media ± error estándar (n = 6).

**Anexo Tabla IV.9.-** ANOVA de dos vías para la densidad y la dieta en los distintos parámetros medidos.

|                  | <b>Período<br/>experimental<br/>(días)</b> | <b>HUMEDAD</b> | <b>PROTEÍNA</b> | <b>LÍPIDOS</b> | <b>CENIZAS</b> |
|------------------|--|----------------|-----------------|----------------|----------------|
| DIETA            | 21   | n.s            | 0.05            | n.s            | n.s            |
|                  | 42   | 0.05           | 0.05            | 0.01           | n.s            |
| DENSIDAD         | 21   | n.s            | n.s             | n.s            | 0.05           |
|                  | 42   | n.s            | 0.05            | n.s            | 0.05           |
| DIETA * DENSIDAD | 21   | n.s            | 0.05            | n.s            | n.s            |
|                  | 42   | n.s            | n.s             | n.s            | n.s            |

n.s: no existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

## 2.5. PORCENTAJE DE LÍPIDOS Y ÁCIDOS GRASOS EN HÍGADO Y MÚSCULO

El porcentaje de lípidos en hígado y músculo, mostrado en la Tabla IV.10., no refleja ninguna diferencia significativa que se deba a la densidad de peces o al tipo de dieta consumida, si bien, en la mayoría de los casos, los valores en músculo tienden a ser más bajos.



**Tabla IV.10.** -Influencia de la densidad de peces y composición de la dieta sobre el porcentaje de lípidos en hígado y músculo.

| DIETA       | Densidad de peces (g/l) | Lípidos (sf) (%) |            |
|-------------|-------------------------|------------------|------------|
|             |                         | Hígado           | Músculo    |
| -E -HUFA    | 100                     | 4.43 ± 0.7       | 3.35 ± 0.5 |
| -E +HUFA    | 100                     | 4.72 ± 1.4       | 4.51 ± 0.9 |
| +E -HUFA    | 100                     | 5.17 ± 0.5       | 3.40 ± 0.8 |
| +E +HUFA    | 100                     | 5.56 ± 1.0       | 2.95 ± 0.4 |
| -C +E +HUFA | 100                     | 4.98 ± 0.5       | 4.65 ± 0.6 |
| -E -HUFA    | 20                      | 5.31 ± 0.6       | 4.14 ± 0.6 |
| -E +HUFA    | 20                      | 4.87 ± 0.4       | 5.37 ± 0.1 |
| +E -HUFA    | 20                      | 4.45 ± 0.9       | 4.13 ± 1.0 |
| +E +HUFA    | 20                      | 5.34 ± 0.5       | 3.81 ± 0.6 |
| -C +E +HUFA | 20                      | 5.30 ± 0.4       | 4.20 ± 1.2 |

Los valores reflejan la media ± error estándar (n = 3).

Una vez constatado el perfil de ácidos grasos y, concretamente, el contenido de HUFAs, de los dos tipos de aceites empleados en la fabricación de las distintas dietas experimentales (ver Tabla III.2. en Material y métodos), se analizó el porcentaje de los principales ácidos grasos en hígado y músculo de truchas sometidas a las distintas situaciones experimentales, tal como se muestra en las Tablas IV.11., IV.12., IV.13. y IV.14.

**IV.- Resultados**

**Tabla IV.11.**– Porcentaje de los distintos ácidos grasos en hígado de truchas arco iris alimentadas con cinco tipos de dieta en condiciones de alta densidad de peces.

| HÍGADO (Alta densidad) |                            |                            |                            |                            |                            |
|------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Ácido graso            | -E-HUFA                    | -E+HUFA                    | +E-HUFA                    | +E+HUFA                    | -C+E+HUFA                  |
| <b>14:0</b>            | 4.56 ± 0.27 <sup>b x</sup> | 0.00 ± 0.00 <sup>a x</sup> | 0.47 ± 0.02 <sup>a</sup>   | 1.32 ± 0.64 <sup>a</sup>   | 1.29 ± 0.64 <sup>a</sup>   |
| <b>16:0</b>            | 17.75 ± 2.95               | 28.90 ± 2.90               | 18.70 ± 5.71               | 17.74 ± 3.82               | 23.32 ± 4.75               |
| <b>16:1n7</b>          | 9.55 ± 0.91 <sup>b</sup>   | 11.86 ± 0.41 <sup>b</sup>  | 3.88 ± 1.00 <sup>a</sup>   | 10.53 ± 2.27 <sup>b</sup>  | 9.13 ± 0.96 <sup>b</sup>   |
| <b>18:0</b>            | 5.06 ± 0.52 <sup>b</sup>   | 6.43 ± 0.61 <sup>b</sup>   | 2.73 ± 0.14 <sup>a</sup>   | 6.41 ± 0.70 <sup>b</sup>   | 2.69 ± 0.43 <sup>a</sup>   |
| <b>18:1n7</b>          | 1.97 ± 0.39 <sup>a</sup>   | 4.45 ± 0.06 <sup>b x</sup> | 1.91 ± 0.18 <sup>a x</sup> | 5.65 ± 0.75 <sup>b x</sup> | 4.28 ± 0.57 <sup>b</sup>   |
| <b>18:1n9</b>          | 42.21 ± 6.73               | 35.52 ± 1.86               | 42.80 ± 2.35               | 39.66 ± 3.13               | 33.21 ± 4.11               |
| <b>18:2n6</b>          | 11.46 ± 3.69 <sup>b</sup>  | 0.00 ± 0.00 <sup>a x</sup> | 12.45 ± 1.86 <sup>b</sup>  | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>   | 0.00 ± 0.00 <sup>a x</sup> |
| <b>18:3n3</b>          | 0.00 ± 0.00                | 0.00 ± 0.00                | 0.00 ± 0.00                | 0.00 ± 0.00                | 0.00 ± 0.00                |
| <b>20:0</b>            | 0.00 ± 0.00                | 0.00 ± 0.00                | 0.00 ± 0.00                | 0.00 ± 0.00                | 0.00 ± 0.00                |
| <b>20:1n9</b>          | 0.22 ± 0.04 <sup>a</sup>   | 6.62 ± 0.76 <sup>b x</sup> | 0.63 ± 0.02 <sup>a x</sup> | 1.70 ± 0.23 <sup>a</sup>   | 1.10 ± 0.12 <sup>a</sup>   |
| <b>20:2n6</b>          | 0.22 ± 0.02 <sup>a</sup>   | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>   | 0.97 ± 0.37 <sup>b</sup>   | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>   | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>   |
| <b>20:3n3</b>          | 0.00 ± 0.00 <sup>x</sup>   | 0.00 ± 0.00                | 0.00 ± 0.00                | 0.00 ± 0.00                | 0.00 ± 0.00                |
| <b>20:4n6</b>          | 0.00 ± 0.00 <sup>x</sup>   | 0.00 ± 0.00                | 0.00 ± 0.00 <sup>x</sup>   | 0.00 ± 0.00                | 0.00 ± 0.00                |
| <b>20:5n3</b>          | 0.30 ± 0.05 <sup>a</sup>   | 0.00 ± 0.00 <sup>a x</sup> | 0.36 ± 0.05 <sup>a</sup>   | 0.98 ± 0.27 <sup>b</sup>   | 1.01 ± 0.22 <sup>b</sup>   |
| <b>20:6n3</b>          | 0.23 ± 0.08 <sup>b</sup>   | 0.00 ± 0.00 <sup>a x</sup> | 0.26 ± 0.08 <sup>b</sup>   | 0.31 ± 0.05 <sup>b x</sup> | 0.00 ± 0.00 <sup>a x</sup> |
| <b>22:1n9</b>          | 0.00 ± 0.00 <sup>x</sup>   | 0.00 ± 0.00                | 0.00 ± 0.00                | 0.00 ± 0.00                | 0.00 ± 0.00 <sup>x</sup>   |
| <b>22:4n6</b>          | 0.00 ± 0.00 <sup>x</sup>   | 0.00 ± 0.00                | 0.00 ± 0.00 <sup>x</sup>   | 0.00 ± 0.00 <sup>x</sup>   | 0.00 ± 0.00 <sup>x</sup>   |
| <b>22:6n3</b>          | 7.18 ± 0.80 <sup>a x</sup> | 10.16 ± 2.54 <sup>a</sup>  | 15.50 ± 1.98 <sup>ab</sup> | 16.24 ± 3.38 <sup>ab</sup> | 23.98 ± 4.83 <sup>b</sup>  |
| <b>24:1n9</b>          | 0.00 ± 0.00                | 0.00 ± 0.00                | 0.00 ± 0.00                | 0.00 ± 0.00                | 0.00 ± 0.00                |
| <i>% Saturados</i>     | 27.37 ± 3.18               | 35.33 ± 3.35               | 21.78 ± 5.77               | 25.46 ± 2.91               | 27.29 ± 5.44               |
| <i>% MUFA</i>          | 53.79 ± 6.86               | 54.49 ± 4.18               | 49.01 ± 3.38               | 57.54 ± 4.72               | 47.73 ± 2.79               |
| <i>% PUFA</i>          | 18.84 ± 4.19 <sup>ab</sup> | 10.16 ± 2.54 <sup>a</sup>  | 29.14 ± 3.68 <sup>b</sup>  | 17.00 ± 3.10 <sup>ab</sup> | 24.98 ± 4.69 <sup>b</sup>  |
| <i>% HUFA</i>          | 7.31 ± 0.76 <sup>a x</sup> | 10.16 ± 2.54 <sup>a</sup>  | 15.72 ± 1.82 <sup>ab</sup> | 17.00 ± 3.10 <sup>ab</sup> | 24.98 ± 4.69 <sup>b</sup>  |
| <i>% HUFA n3</i>       | 7.31 ± 0.76 <sup>a x</sup> | 10.16 ± 2.54 <sup>a</sup>  | 15.72 ± 1.82 <sup>ab</sup> | 17.00 ± 3.10 <sup>ab</sup> | 24.98 ± 4.69 <sup>b</sup>  |

<sup>a b y c</sup> : Diferencias entre los niveles de un mismo ácido graso debidas a la dieta. <sup>x</sup>: Diferencias en los niveles de ácidos grasos para una misma dieta debidas a la densidad. Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la media ± error estándar (n = 3).

**Tabla IV.12.** – Porcentaje de los distintos ácidos grasos en hígado de truchas arco iris alimentadas con cinco tipos de dieta en condiciones de baja densidad de peces.

| HÍGADO (Baja densidad) |                           |                           |                           |                           |                            |
|------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Ácido graso            | -E-HUFA                   | -E+HUFA                   | +E-HUFA                   | +E+HUFA                   | -C+E+HUFA                  |
| <b>14:0</b>            | 1.08 ± 0.29               | 2.22 ± 0.15               | 1.93 ± 0.61               | 0.85 ± 0.10               | 2.26 ± 0.10                |
| <b>16:0</b>            | 21.13 ± 4.43              | 29.84 ± 3.31              | 18.74 ± 2.80              | 21.16 ± 1.54              | 23.44 ± 2.88               |
| <b>16:1n7</b>          | 7.43 ± 0.97               | 10.46 ± 2.09              | 4.92 ± 1.39               | 9.74 ± 1.16               | 11.28 ± 0.57               |
| <b>18:0</b>            | 6.31 ± 1.48               | 5.80 ± 0.60               | 4.46 ± 0.73               | 4.97 ± 0.23               | 5.45 ± 1.92                |
| <b>18:1n7</b>          | 1.85 ± 0.17 <sup>a</sup>  | 1.59 ± 0.48 <sup>a</sup>  | 3.01 ± 0.29 <sup>ab</sup> | 2.82 ± 0.17 <sup>ab</sup> | 4.09 ± 0.80 <sup>b</sup>   |
| <b>18:1n9</b>          | 30.42 ± 4.72              | 40.82 ± 6.88              | 35.35 ± 3.21              | 44.47 ± 4.75              | 34.89 ± 4.59               |
| <b>18:2n6</b>          | 8.11 ± 2.51 <sup>b</sup>  | 1.11 ± 0.09 <sup>a</sup>  | 9.16 ± 0.87 <sup>b</sup>  | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>  | 0.24 ± 0.06 <sup>a</sup>   |
| <b>18:3n3</b>          | 0.00 ± 0.00               | 0.00 ± 0.00               | 0.00 ± 0.00               | 0.00 ± 0.00               | 0.00 ± 0.00                |
| <b>20:0</b>            | 0.00 ± 0.00               | 0.00 ± 0.00               | 0.00 ± 0.00               | 0.00 ± 0.00               | 0.00 ± 0.00                |
| <b>20:1n9</b>          | 1.04 ± 0.27               | 1.34 ± 0.04               | 1.34 ± 0.10               | 1.29 ± 0.08               | 1.57 ± 0.23                |
| <b>20:2n6</b>          | 0.94 ± 0.41 <sup>b</sup>  | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>  | 1.05 ± 0.10 <sup>b</sup>  | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>  | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>   |
| <b>20:3n3</b>          | 0.54 ± 0.04 <sup>b</sup>  | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>  | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>  | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>  | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>   |
| <b>20:4n6</b>          | 1.04 ± 0.21 <sup>b</sup>  | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>  | 2.74 ± 0.44 <sup>c</sup>  | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>  | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>   |
| <b>20:5n3</b>          | 0.79 ± 0.33               | 0.92 ± 0.09               | 0.62 ± 0.14               | 1.10 ± 0.10               | 1.39 ± 0.66                |
| <b>20:6n3</b>          | 0.61 ± 0.22 <sup>b</sup>  | 0.56 ± 0.04 <sup>b</sup>  | 0.74 ± 0.15 <sup>b</sup>  | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>  | 0.26 ± 0.02 <sup>ab</sup>  |
| <b>22:1n9</b>          | 0.22 ± 0.01 <sup>b</sup>  | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>  | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>  | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>  | 0.22 ± 0.02 <sup>b</sup>   |
| <b>22:4n6</b>          | 0.20 ± 0.06 <sup>b</sup>  | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>  | 0.18 ± 0.06 <sup>b</sup>  | 0.35 ± 0.10 <sup>b</sup>  | 0.28 ± 0.02 <sup>b</sup>   |
| <b>22:6n3</b>          | 18.94 ± 2.75              | 10.15 ± 2.29              | 16.67 ± 4.21              | 14.53 ± 3.10              | 19.65 ± 4.78               |
| <b>24:1n9</b>          | 0.00 ± 0.00               | 0.00 ± 0.00               | 0.00 ± 0.00               | 0.00 ± 0.0                | 0.00 ± 0.00                |
| <i>% Saturados</i>     | 28.52 ± 5.74              | 35.92 ± 5.19              | 25.13 ± 2.72              | 26.69 ± 1.92              | 30.39 ± 3.89               |
| <i>% MUFA</i>          | 40.82 ± 4.12              | 52.80 ± 7.86              | 44.63 ± 4.77              | 57.89 ± 5.05              | 48.14 ± 9.04               |
| <i>% PUFA</i>          | 30.66 ± 2.98 <sup>b</sup> | 11.28 ± 3.00 <sup>a</sup> | 30.24 ± 4.38 <sup>b</sup> | 15.41 ± 3.24 <sup>a</sup> | 21.47 ± 5.26 <sup>ab</sup> |
| <i>% HUFA</i>          | 21.42 ± 2.47              | 10.94 ± 2.67              | 20.38 ± 4.75              | 15.41 ± 3.24              | 21.31 ± 5.33               |
| <i>% HUFA n3</i>       | 20.33 ± 2.55              | 10.94 ± 2.67              | 17.60 ± 4.28              | 15.26 ± 3.10              | 21.21 ± 5.35               |

<sup>a, b y c</sup> : Diferencias entre los niveles de un mismo ácido graso debidas a la dieta. <sup>x</sup>: Diferencias en los niveles de ácidos grasos para una misma dieta debidas a la densidad. Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la media ± error estándar (n = 3).

Como se puede observar en las Tablas IV.11. y IV.12., los análisis en hígado muestran que en animales alimentados con dietas ricas en aceite de pescado (+HUFA) el porcentaje de PUFAs observado se corresponde prácticamente en su totalidad con el de ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs), mientras que en animales alimentados con dietas en las que se utilizó aceite de soja (-HUFA), el porcentaje de PUFAs es incrementado, observándose, en condiciones de baja densidad, valores significativamente superiores de PUFAs en hígado de animales alimentados con dietas -HUFA. Estas diferencias se deben, en concreto, a los niveles de 18:2n6 y 20:2n6, cuya presencia es detectable de manera significativa en grupos alimentados con dietas -HUFA. Con relación a los niveles de HUFAs, el grupo -E+HUFA tiende a presentar valores más bajos que los otros grupos (+E+HUFA y -C+E+HUFA) alimentados con dietas ricas en aceite de pescado. Estas diferencias fueron significativas en animales sometidos a alta densidad, y se asocian a valores más bajos en los niveles de 20:5n3 y 22:6n3. A alta densidad, los animales que consumieron la dieta -E+HUFA no mostraron evidencia de 20:5n3, y por el contrario, sí un incremento significativo de 20:1n9 con respecto a los otros grupos. Cabe destacar que, incluso en condiciones de baja densidad, los niveles de 22:6n3 son menores a los presentados en dietas -HUFA. Por otro lado, los niveles observados de determinados ácidos grasos saturados (18:0) y monoinsaturados (16:1n7 y 18:1n7) muestran que, en condiciones de alta densidad, los animales alimentados con dietas -C+E+HUFA y +E-HUFA presentaron valores significativamente inferiores del ácido graso 18:0, observándose también en este último grupo un descenso significativo del 16:1n7 con respecto al resto de los grupos, mientras que los animales que consumieron dietas +HUFA presentaron valores significativamente superiores de 18:1n7. Estos valores no dan lugar a diferencias significativas en los porcentajes totales de ácidos grasos saturados y monoinsaturados.

Con relación a los análisis de ácidos grasos en músculo (Tablas IV.13. y IV.14.), con independencia de la densidad, se observa un mayor porcentaje de PUFAs en animales que consumieron dietas donde se utilizó aceite de soja (-E-HUFA y +E-HUFA), asociado a valores significativamente más altos de 18:2n6 y 20:2n6 en estos animales. En estos grupos, también se detecta, de manera significativa, la presencia de 20:4n6 y 20:6n3, aunque en este último ácido graso sólo a alta densidad.

Por otro lado, a ambas densidades, los niveles de HUFAs son significativamente más bajos en dietas donde se utilizó aceite de soja, lo que también se asocia a descensos en 22:6n3, observándose a baja densidad que este comportamiento también se relaciona de manera significativa con descensos en 20:5n3 y 22:4n6. A baja densidad, los MUFAs presentan valores inferiores en los grupos -HUFA, lo que se explicaría por los niveles significativamente más bajos en los ácidos grasos 16:1n7, 20:1n9 y 22:1n9, y que en el caso del 16:1n7 también se pone de manifiesto a alta densidad. En cuanto a los ácidos grasos saturados, no se observa un patrón general claro, aunque con independencia de la densidad se pone de manifiesto la existencia de diferencias estadísticas en el 14:0, con concentraciones más bajas en animales que consumieron dietas elaboradas con aceite de soja. Esto se refleja en que estos grupos muestran un porcentaje significativamente más bajo de ácidos grasos saturados en condiciones de alta densidad. Otras diferencias observadas entre ácidos grasos muestran, a baja densidad, que los niveles de 18:3n3 fueron claramente más altos en +E-HUFA con relación al resto de los grupos.

**IV.- Resultados**

**Tabla IV.13.** – Porcentaje de los distintos ácidos grasos en músculo de truchas arco iris alimentadas con cinco tipos de dieta en condiciones de alta densidad de peces.

| MÚSCULO (Alta densidad) |                             |                             |                            |                             |                            |
|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Ácido graso             | -E-HUFA                     | -E+HUFA                     | +E-HUFA                    | +E+HUFA                     | -C+E+HUFA                  |
| <b>14:0</b>             | 1.25 ± 0.43 <sup>a</sup>    | 4.04 ± 0.48 <sup>b</sup>    | 1.99 ± 0.35 <sup>a</sup>   | 4.99 ± 0.28 <sup>b</sup>    | 6.61 ± 1.21 <sup>b</sup>   |
| <b>16:0</b>             | 18.2 ± 2.13                 | 26.29 ± 3.00                | 20.89 ± 2.57               | 32.64 ± 0.88                | 27.44 ± 6.78               |
| <b>16:1n7</b>           | 2.29 ± 0.76 <sup>a</sup>    | 6.37 ± 0.07 <sup>b x</sup>  | 4.06 ± 0.60 <sup>ab</sup>  | 6.10 ± 0.86 <sup>b</sup>    | 6.57 ± 1.05 <sup>b</sup>   |
| <b>18:0</b>             | 4.45 ± 1.09                 | 3.84 ± 0.47                 | 5.57 ± 0.67                | 4.60 ± 0.19                 | 5.58 ± 1.05                |
| <b>18:1n7</b>           | 3.28 ± 0.29 <sup>x</sup>    | 3.46 ± 0.73                 | 3.81 ± 0.40 <sup>x</sup>   | 4.39 ± 0.58                 | 3.85 ± 0.48 <sup>x</sup>   |
| <b>18:1n9</b>           | 29.54 ± 2.82                | 26.37 ± 2.44                | 28.55 ± 1.67               | 26.50 ± 1.80                | 24.11 ± 1.79               |
| <b>18:2n6</b>           | 24.06 ± 0.21 <sup>b</sup>   | 3.80 ± 0.45 <sup>a</sup>    | 23.28 ± 2.00 <sup>b</sup>  | 2.29 ± 0.50 <sup>a</sup>    | 5.32 ± 2.34 <sup>a</sup>   |
| <b>18:3n3</b>           | 0.00 ± 0.00                 | 0.00 ± 0.00 <sup>x</sup>    | 0.00 ± 0.00 <sup>x</sup>   | 0.00 ± 0.00 <sup>x</sup>    | 0.00 ± 0.00 <sup>x</sup>   |
| <b>20:0</b>             | 0.15 ± 0.04 <sup>b x</sup>  | 0.15 ± 0.02 <sup>b</sup>    | 0.00 ± 0.00 <sup>a x</sup> | 0.00 ± 0.00 <sup>a x</sup>  | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>   |
| <b>20:1n9</b>           | 2.60 ± 0.19 <sup>x</sup>    | 2.38 ± 0.96                 | 1.03 ± 0.37                | 2.46 ± 0.61                 | 2.76 ± 0.49                |
| <b>20:2n6</b>           | 1.15 ± 0.32 <sup>b</sup>    | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>    | 0.62 ± 0.22 <sup>b</sup>   | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>    | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>   |
| <b>20:3n3</b>           | 0.44 ± 0.07 <sup>b x</sup>  | 0.27 ± 0.12 <sup>b</sup>    | 0.28 ± 0.09 <sup>b</sup>   | 0.00 ± 0.00 <sup>a x</sup>  | 0.00 ± 0.00 <sup>a x</sup> |
| <b>20:4n6</b>           | 0.53 ± 0.11 <sup>c</sup>    | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>    | 0.18 ± 0.08 <sup>b</sup>   | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>    | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>   |
| <b>20:5n3</b>           | 1.86 ± 0.58                 | 1.58 ± 0.65                 | 0.66 ± 0.25                | 2.19 ± 0.61                 | 2.97 ± 0.46                |
| <b>20:6n3</b>           | 0.11 ± 0.01 <sup>b</sup>    | 0.00 ± 0.00 <sup>a x</sup>  | 0.16 ± 0.06 <sup>b</sup>   | 0.00 ± 0.00 <sup>a x</sup>  | 0.00 ± 0.00 <sup>a x</sup> |
| <b>22:1n9</b>           | 1.87 ± 0.09 <sup>b x</sup>  | 3.30 ± 0.40 <sup>c</sup>    | 0.57 ± 0.02 <sup>a</sup>   | 0.27 ± 0.17 <sup>a</sup>    | 3.13 ± 0.47 <sup>bc</sup>  |
| <b>22:4n6</b>           | 0.88 ± 0.08 <sup>x</sup>    | 1.52 ± 0.39                 | 0.87 ± 0.07                | 0.25 ± 0.06 <sup>x</sup>    | 0.79 ± 0.33                |
| <b>22:6n3</b>           | 9.14 ± 1.38                 | 17.3 ± 2.15                 | 8.59 ± 3.58                | 13.05 ± 2.09                | 18.68 ± 0.24               |
| <b>24:1n9</b>           | 0.39 ± 0.02 <sup>b x</sup>  | 0.35 ± 0.06 <sup>b</sup>    | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>   | 0.00 ± 0.00 <sup>a x</sup>  | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>   |
| <i>% Saturados</i>      | 24.05 ± 1.04 <sup>a x</sup> | 34.27 ± 2.75 <sup>abc</sup> | 28.45 ± 2.27 <sup>ab</sup> | 42.38 ± 1.18 <sup>c</sup>   | 37.63 ± 6.92 <sup>bc</sup> |
| <i>% MUFA</i>           | 38.36 ± 0.96                | 42.07 ± 3.60                | 37.65 ± 1.97               | 39.75 ± 1.58                | 40.41 ± 1.69               |
| <i>% PUFA</i>           | 37.60 ± 1.91                | 23.66 ± 2.39                | 33.90 ± 3.67               | 21.54 ± 6.21                | 21.63 ± 8.83               |
| <i>% HUFA</i>           | 12.05 ± 2.05 <sup>ab</sup>  | 19.77 ± 2.69 <sup>bc</sup>  | 9.79 ± 4.24 <sup>a</sup>   | 15.55 ± 2.70 <sup>abc</sup> | 23.05 ± 0.22 <sup>c</sup>  |
| <i>% HUFA n3</i>        | 11.11 ± 1.74 <sup>ab</sup>  | 18.76 ± 2.24 <sup>bc</sup>  | 9.36 ± 3.88 <sup>a</sup>   | 15.30 ± 2.65 <sup>abc</sup> | 21.93 ± 0.22 <sup>c</sup>  |

<sup>a, b y c</sup> : Diferencias entre los niveles de un mismo ácido graso debidas a la dieta. <sup>x</sup>: Diferencias en los niveles de ácidos grasos para una misma dieta debidas a la densidad. Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la media ± error estándar (n = 3).

**Tabla IV.14.** – Porcentaje de los distintos ácidos grasos en músculo de truchas arco iris alimentadas con cinco tipos de dieta en condiciones de baja densidad de peces.

| MÚSCULO (Baja densidad) |                                 |                                  |                                  |                                  |                                  |
|-------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Ácido graso             | -E-HUFA                         | -E+HUFA                          | +E-HUFA                          | +E+HUFA                          | -C+E+HUFA                        |
| <b>14:0</b>             | 1.93 ± 0.17 <sup>a</sup>        | 3.84 ± 0.34 <sup>b</sup>         | 2.0 ± 0.42 <sup>a</sup>          | 4.12 ± 0.21 <sup>bc</sup>        | 4.86 ± 0.16 <sup>c</sup>         |
| <b>16:0</b>             | 25.35 ± 1.99                    | 23.73 ± 4.28                     | 20.93 ± 1.78                     | 24.42 ± 3.53                     | 23.46 ± 1.91                     |
| <b>16:1n7</b>           | 3.67 ± 0.47 <sup>a</sup>        | 5.80 ± 0.18 <sup>b</sup>         | 3.54 ± 0.57 <sup>a</sup>         | 7.17 ± 0.04 <sup>c</sup>         | 7.68 ± 0.33 <sup>c</sup>         |
| <b>18:0</b>             | 4.24 ± 0.58                     | 3.95 ± 0.43                      | 4.44 ± 0.91                      | 5.14 ± 0.40                      | 4.71 ± 0.16                      |
| <b>18:1n7</b>           | 1.60 ± 0.28                     | 2.65 ± 0.27                      | 2.17 ± 0.13                      | 2.41 ± 0.50                      | 1.98 ± 0.15                      |
| <b>18:1n9</b>           | 28.09 ± 2.90                    | 25.0 ± 1.37                      | 26.06 ± 2.85                     | 24.22 ± 1.79                     | 22.42 ± 1.52                     |
| <b>18:2n6</b>           | 22.97 ± 1.13 <sup>b</sup>       | 2.65 ± 0.68 <sup>a</sup>         | 23.19 ± 2.42 <sup>b</sup>        | 1.74 ± 0.43 <sup>a</sup>         | 1.88 ± 0.42 <sup>a</sup>         |
| <b>18:3n3</b>           | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>        | 0.57 ± 0.01 <sup>a</sup>         | 4.11 ± 0.80 <sup>b</sup>         | 0.45 ± 0.05 <sup>a</sup>         | 0.53 ± 0.04 <sup>a</sup>         |
| <b>20:0</b>             | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>        | 0.13 ± 0.02 <sup>b</sup>         | 0.11 ± 0.03 <sup>b</sup>         | 0.12 ± 0.02 <sup>b</sup>         | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>         |
| <b>20:1n9</b>           | 1.00 ± 0.18 <sup>a</sup>        | 4.60 ± 1.07 <sup>b</sup>         | 1.51 ± 0.58 <sup>a</sup>         | 3.42 ± 0.38 <sup>b</sup>         | 3.86 ± 0.31 <sup>b</sup>         |
| <b>20:2n6</b>           | 0.68 ± 0.18 <sup>b</sup>        | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>         | 0.48 ± 0.08 <sup>b</sup>         | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>         | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>         |
| <b>20:3n3</b>           | 0.17 ± 0.01                     | 0.50 ± 0.15                      | 0.14 ± 0.04                      | 0.35 ± 0.11                      | 0.40 ± 0.06                      |
| <b>20:4n6</b>           | 0.28 ± 0.09 <sup>b</sup>        | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>         | 0.16 ± 0.04 <sup>b</sup>         | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>         | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>         |
| <b>20:5n3</b>           | 1.35 ± 0.20 <sup>a</sup>        | 3.98 ± 0.63 <sup>b</sup>         | 1.69 ± 0.38 <sup>a</sup>         | 3.42 ± 0.65 <sup>b</sup>         | 4.16 ± 0.30 <sup>b</sup>         |
| <b>20:6n3</b>           | 0.18 ± 0.03                     | 0.14 ± 0.02                      | 0.13 ± 0.03                      | 0.20 ± 0.07                      | 0.19 ± 0.04                      |
| <b>22:1n9</b>           | 0.56 ± 0.09 <sup>a</sup>        | 3.60 ± 0.95 <sup>b</sup>         | 1.03 ± 0.40 <sup>a</sup>         | 2.45 ± 0.56 <sup>ab</sup>        | 3.06 ± 0.42 <sup>b</sup>         |
| <b>22:4n6</b>           | 0.36 ± 0.04 <sup>a</sup>        | 1.10 ± 0.12 <sup>b</sup>         | 0.45 ± 0.12 <sup>a</sup>         | 1.18 ± 0.11 <sup>b</sup>         | 0.70 ± 0.18 <sup>a</sup>         |
| <b>22:6n3</b>           | 7.75 ± 1.81 <sup>a</sup>        | 19.05 ± 2.74 <sup>b</sup>        | 9.67 ± 2.16 <sup>a</sup>         | 19.20 ± 3.77 <sup>b</sup>        | 19.76 ± 3.21 <sup>b</sup>        |
| <b>24:1n9</b>           | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>        | 0.18 ± 0.03 <sup>b</sup>         | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>         | 0.15 ± 0.03 <sup>b</sup>         | 0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>         |
| <i>% Saturados</i>      | <i>31.52 ± 1.39</i>             | <i>31.66 ± 4.00</i>              | <i>27.43 ± 2.29</i>              | <i>33.72 ± 3.79</i>              | <i>33.03 ± 1.89</i>              |
| <i>% MUFA</i>           | <i>34.73 ± 2.09</i>             | <i>40.52 ± 3.00</i>              | <i>33.97 ± 2.05</i>              | <i>39.75 ± 1.82</i>              | <i>38.99 ± 1.90</i>              |
| <i>% PUFA</i>           | <i>33.75 ± 3.04</i>             | <i>27.82 ± 2.43</i>              | <i>38.61 ± 1.36</i>              | <i>26.53 ± 4.69</i>              | <i>27.97 ± 3.15</i>              |
| <i>% HUFA</i>           | <i>9.93 ± 2.07 <sup>a</sup></i> | <i>24.28 ± 2.93 <sup>b</sup></i> | <i>12.05 ± 2.55 <sup>a</sup></i> | <i>24.00 ± 4.54 <sup>b</sup></i> | <i>25.15 ± 3.45 <sup>b</sup></i> |
| <i>% HUFA n3</i>        | <i>9.29 ± 1.97 <sup>a</sup></i> | <i>23.17 ± 2.85 <sup>b</sup></i> | <i>11.45 ± 2.44 <sup>a</sup></i> | <i>22.25 ± 4.45 <sup>b</sup></i> | <i>24.12 ± 3.40 <sup>b</sup></i> |

<sup>a, b y c</sup>: Diferencias entre los niveles de un mismo ácido graso debidas a la dieta. <sup>x</sup>: Diferencias en los niveles de ácidos grasos para una misma dieta debidas a la densidad. Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la media ± error estándar (n = 3).

**Anexo Tablas IV.11., IV.12., IV.13. y IV.14.-** ANOVA de dos vías para la densidad y la dieta en los niveles de ácidos grasos.

|                  | <b>Período experimental (días)</b> | <b>SATURADOS</b> | <b>MUFAs</b> | <b>PUFAs</b> | <b>HUFAs</b> | <b>HUFAs n3</b> |
|------------------|------------------------------------|------------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|
| DIETA            | Hígado                             | n.s              | n.s          | 0.01         | 0.05         | 0.05            |
|                  | Músculo                            | 0.05             | n.s          | 0.05         | 0.001        | 0.001           |
| DENSIDAD         | Hígado                             | n.s              | n.s          | n.s          | n.s          | n.s             |
|                  | Músculo                            | n.s              | n.s          | n.s          | n.s          | n.s             |
| DIETA * DENSIDAD | Hígado                             | n.s              | n.s          | n.s          | n.s          | n.s             |
|                  | Músculo                            | n.s              | n.s          | n.s          | n.s          | n.s             |

n.s: no existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

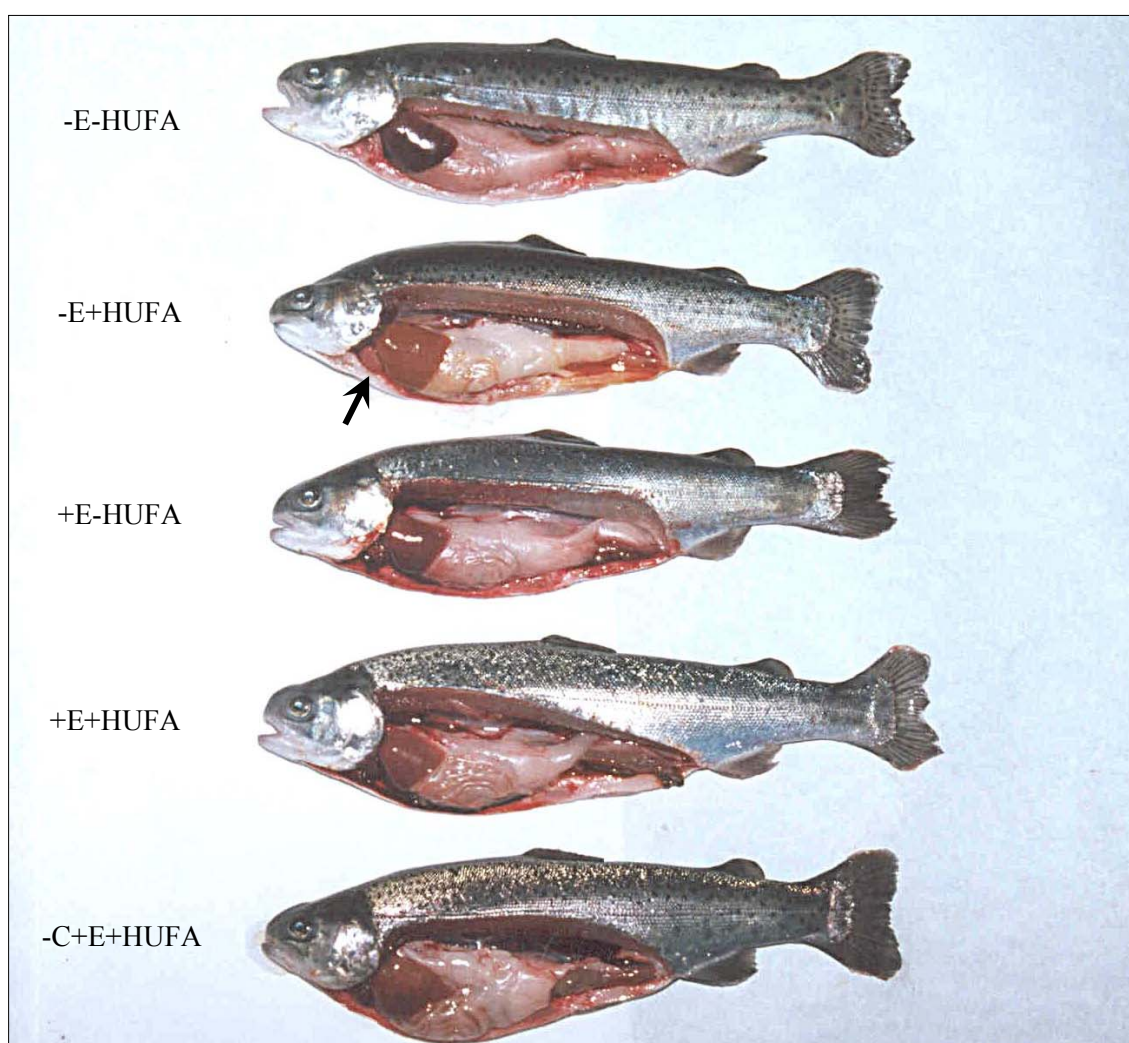
El análisis estadístico global (anexo Tablas IV.11., IV.12., IV.13. y IV.14.) revela que las variaciones en los distintos ácidos grasos debidas al tipo de dieta consumida se ponen de manifiesto de una manera más clara en músculo que en hígado, y que esta influencia parece afectar tanto a los ácidos grasos saturados como a los PUFAs y HUFAs, observándose de manera más evidente en estos últimos.

Las diferencias asociadas al efecto de la densidad de peces no muestran una tendencia clara en ambos tejidos, no pudiéndose establecer un patrón de comportamiento claro en cuanto al efecto de esta variable. Esto se refleja en el análisis estadístico global (anexo Tablas IV.11., IV.12., IV.13. y IV.14.), en donde se pone de manifiesto, tanto en hígado como en músculo, la ausencia de diferencias significativas asociadas a la densidad de peces. Por último, tampoco se observa ningún efecto global de la densidad y la dieta en conjunto, en ninguno de los casos.

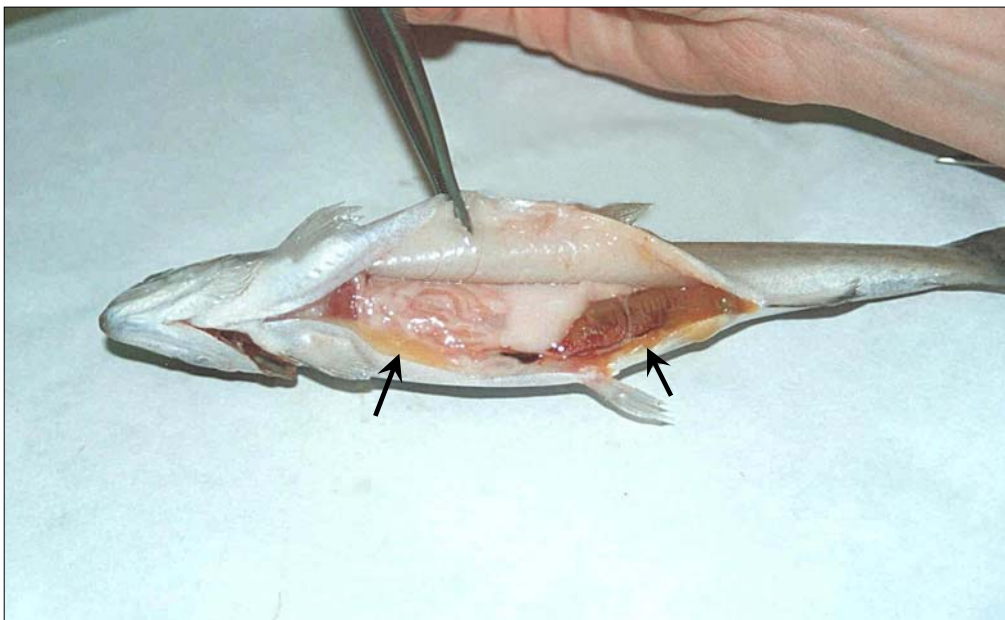
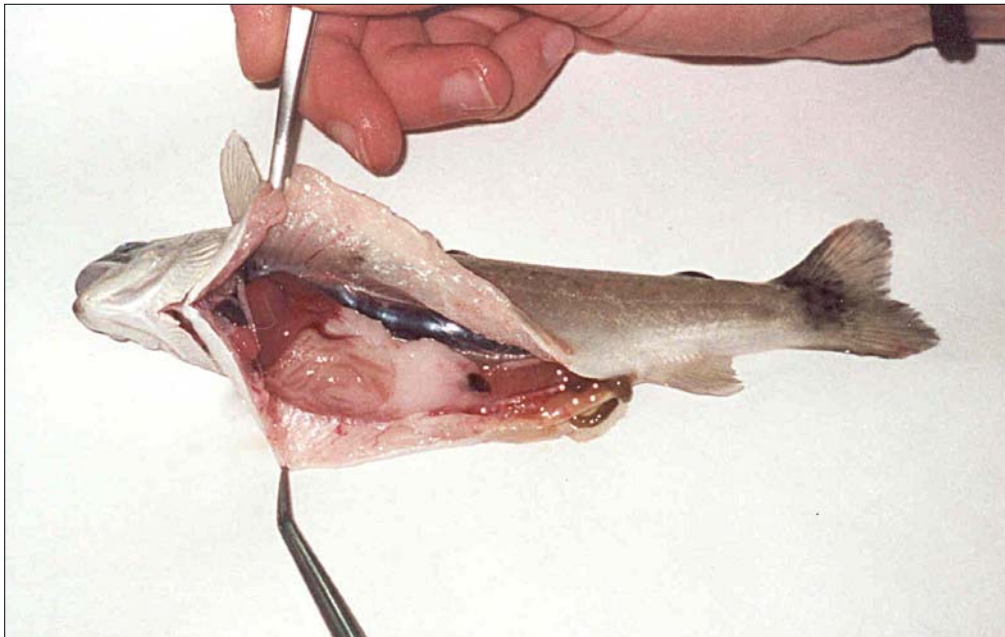


## 2.6. ALTERACIONES Y LESIONES MACROSCÓPICAS

Los animales alimentados con la dieta -E+HUFA mostraron, en un porcentaje en torno al 25%, un hígado con una tonalidad amarilla que en muchos casos se acompañó de la presencia de un fluido también de color amarillento rodeando la cavidad visceral. Los animales que consumieron las restantes dietas, en general, no mostraron alteraciones de este tipo (ver Imagen IV.1., IV.2. y IV.3.).



**Imagen IV.1.-** Disección de cinco animales alimentados con cada una de las dietas experimentales. La flecha marca el hígado que presenta un color algo más amarillo con respecto a los restantes.



**Imagen IV.2.-** (superior) y **IV.3.-** (inferior): La imagen superior muestra el aspecto de una trucha arco iris normal. La imagen inferior muestra la disección de una trucha alimentada con la dieta -E+HUFA, poniéndose de manifiesto la presencia de un fluido amarillento en la cavidad visceral.

Con relación al efecto de la deficiencia en vitamina C, un 30% de los animales mostraron alteraciones epiteliales ligadas a procesos hemorrágicos (ver Imagen IV.4.).

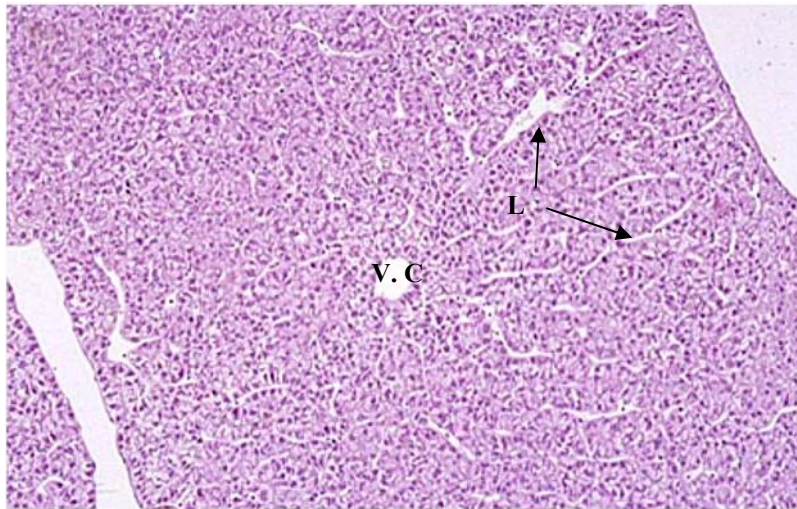


**Imagen IV.4.-** La imagen muestra el aspecto de una trucha arco iris alimentada con la dieta -C+E+HUFA, donde se observa la presencia de hemorragias en la zona de las aletas pectorales.

## 2.7. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE HÍGADO Y BRANQUIAS

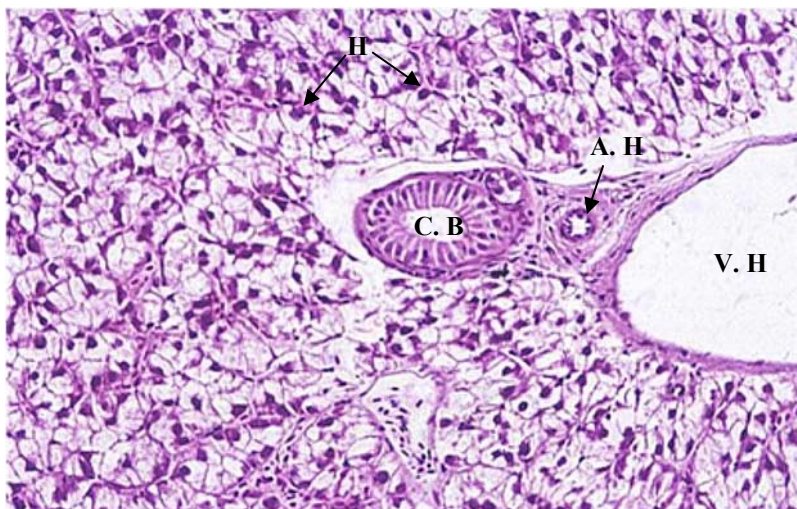
### 2.7.1. Hígado

El hígado de trucha arco iris muestra una estructura similar a la del hígado de vertebrados superiores, aunque sin una ordenación lobulillar bien definida. Las células hepáticas muestran un contorno poligonal y núcleo grande, central o excéntrico, con uno o dos nucleolos, que a veces destacan por su tamaño. Estos hepatocitos se disponen en láminas de una o dos células de espesor, situadas entre los sinusoides, formando trabéculas ramificadas y anastomosadas libremente (Imagen IV.5.); corresponde esta estructura al tipo de organización hepática sáculo-sinusoidal o laminar (Elias y Bengelsdorf, 1952).



**Imagen IV.5.-** Estructura del parénquima hepático de peces alimentados con la dieta -E+HUFA, donde se observa la vena central del lobulillo (V. C) y los sinusoides hepáticos (S) (Hematoxilina-Eosina. x10).

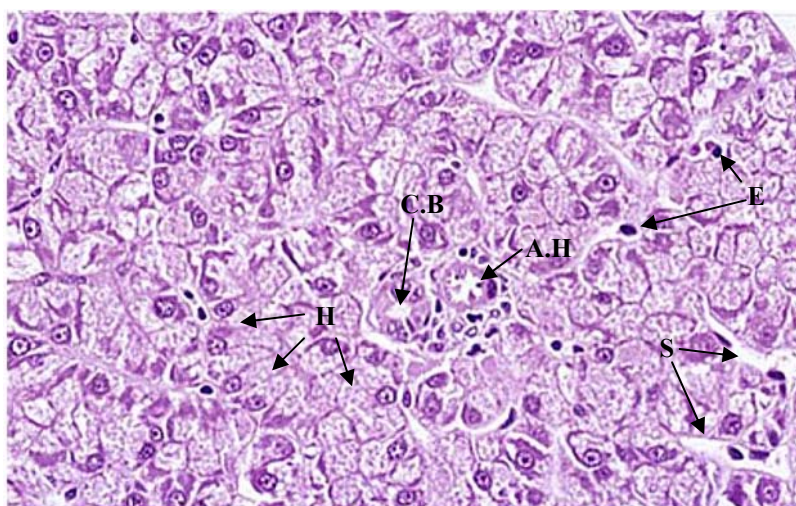
Las trabéculas hepatocitarias están recorridas por canalículos intercelulares, los canalículos biliares, a cuya luz los hepatocitos segregan la bilis, necesaria para la emulsión de las grasas, que es transportada hasta los conductos biliares que acompañan a las ramificaciones de la vena porta y de la arteria hepática en las áreas portales, lugar donde se encuentra un estroma conjuntivo laxo poco abundante (Imagen IV.6.).



**Imagen IV.6.-** Estructura del tejido hepático de animales alimentados con dieta +E+HUFA, donde se muestran los hepatocitos (H) con una gran vacuola en su citoplasma y los componentes del espacio porta: conducto biliar (C. B), vena hepática (V. H) y arteriola hepática (A. H) (E-H. x20).

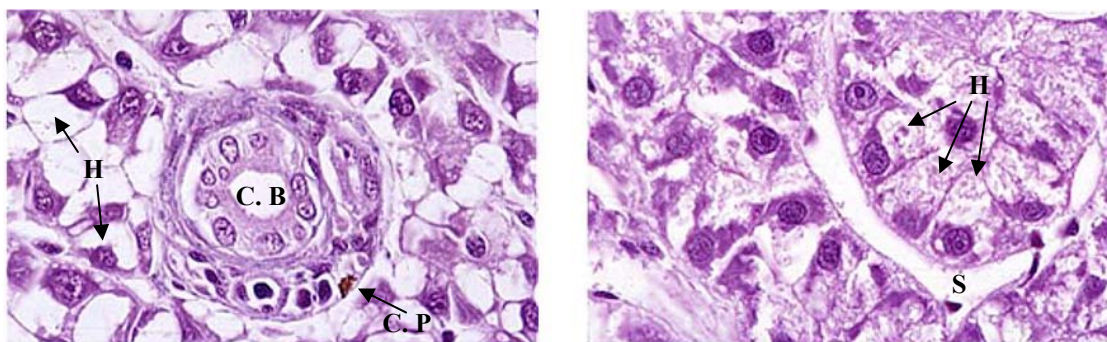
En el examen histológico de las muestras de hígado tomadas se observa que en cuatro de los grupos experimentales (-E-HUFA, +E-HUFA, +E+HUFA y -C+E+HUFA), el citoplasma de los hepatocitos presenta una gran vacuola de carácter lipídico, adquiriendo estos un aspecto de células vacías con forma poligonal y núcleo excéntrico (Imagen IV.6. y IV.8.).

Por el contrario, los tejidos pertenecientes a hígados -E+HUFA muestran un parénquima hepático con aspecto diferente. Los hepatocitos presentan los grandes núcleos esféricos algo más claros y más centrales, y el citoplasma más teñido y con un aspecto vesicular debido a la presencia de gran cantidad de gotas lipídicas de pequeño tamaño (Imagen IV.7. y IV.9.).



**Imagen IV.7.-** Estructura de tejido hepático de animales alimentados con dietas -E+HUFA, donde se muestran hepatocitos (H) con el citoplasma de aspecto multivesiculado, sinusoides hepáticos (S) en cuyo interior aparecen eritrocitos (E), conducto biliar (C. B) y arteriola hepática (A. H) (E-H, x40).

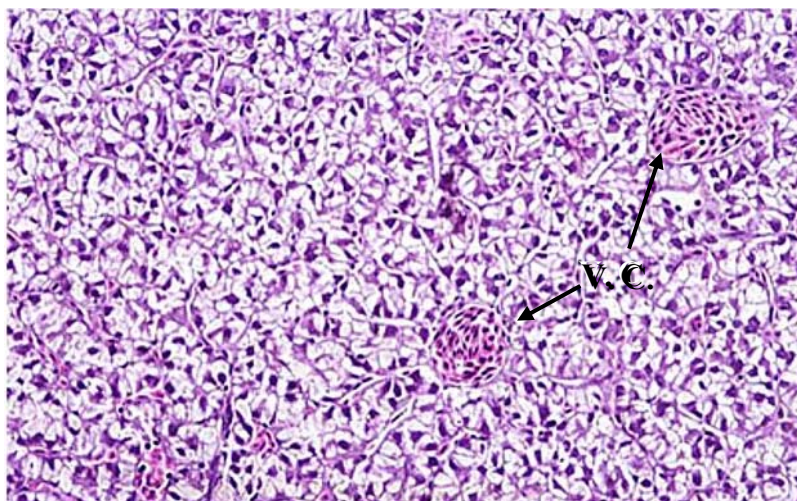
Con respecto a la presencia de otro tipo de células, en los animales alimentados con dieta +E-HUFA se observan células con granulaciones de color marrón en zonas de conjuntivo próximas a los conductos biliares (Imagen IV.8.).



**Imagen IV.8.-** (izda) Hepatocitos (H) de animales alimentados con dietas +E-HUFA en cuyo citoplasma se muestra una gran vacuola lipídica. Se muestra un conducto biliar (C. B) y se observan células con pigmentos de color marrón (C. P) en el conjuntivo que lo rodea, (E-H, x100).

**Imagen IV.9.-** (dcha) Hepatocitos (H) de animales alimentados con dieta -E+HUFA en cuyo citoplasma se muestra el aspecto multivesiculado y sinusoide hepático (S) (E-H, x100)

En todos los casos, los sinusoides hepáticos son muy visibles, están situados entre las láminas de hepatocitos, son amplios y de forma irregular, limitados por células endoteliales que pueden sobresalir o no hacia la luz del sinusoide y que contienen un núcleo ovoide o aplanado. Cabe destacar que en el grupo -C+E+HUFA la vena central de los lobulillos presenta una gran acumulación de eritrocitos (Imagen IV.10.).

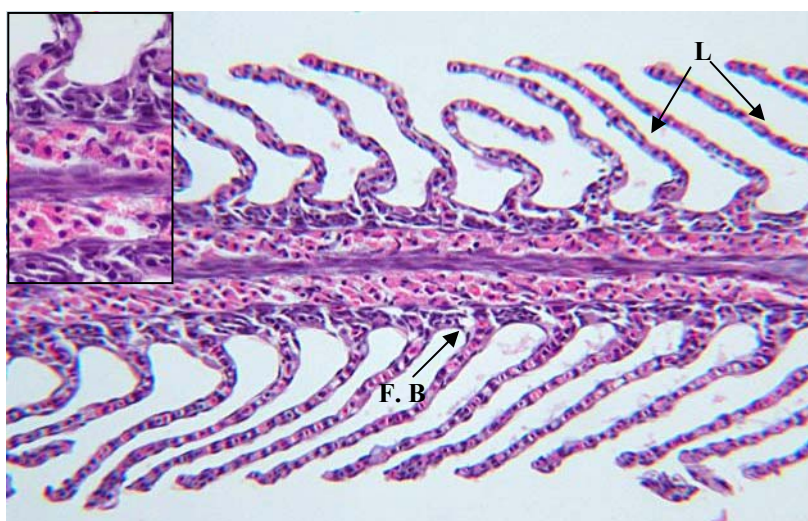


**Imagen IV.10.-** Estructura del parénquima hepático de animales alimentados con dieta -C+E+HUFA, donde se aprecia la vena central (V.C) de los lobulillos hepáticos con abundantes eritrocitos (E-H, x20).

### 2.7.2. Branquias

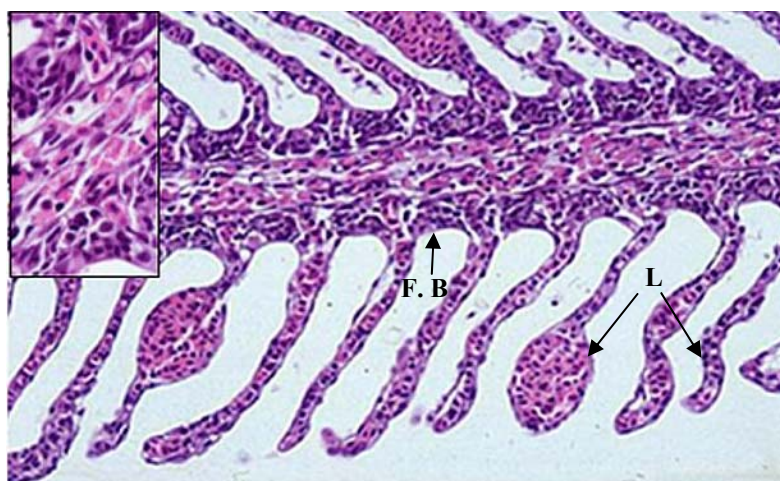
En cuanto a la morfología branquial, se comprueba que de los arcos branquiales parten los filamentos branquiales que a su vez están formados por lamelas o laminillas branquiales.

En los grupos -E-HUFA y +E-HUFA el aspecto de las branquias es totalmente normal, observándose en el primer grupo la presencia de células eosinofílicas bajo el epitelio de revestimiento del filamento (Imagen IV.11.).



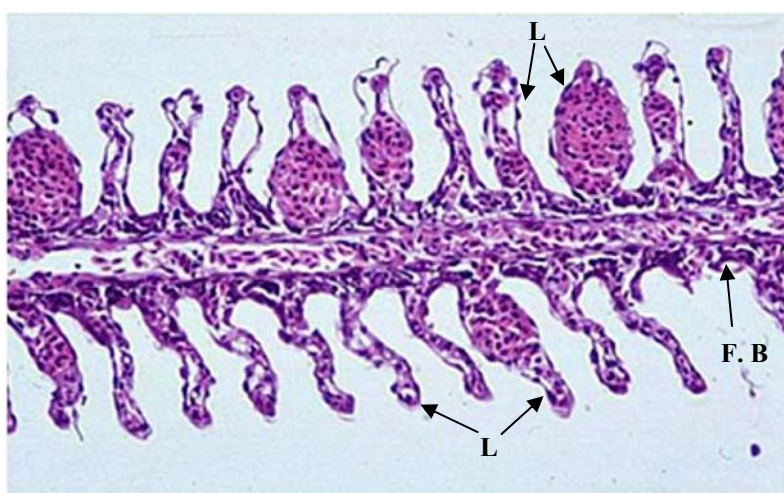
**Imagen IV.11.-** Estructura de un filamento branquial (F. B), con sus respectivas lamelas (L), de animales alimentados con dieta -E-HUFA. Destaca la presencia de células eosinofílicas a lo largo del filamento branquial (ampliación imagen) (H-E, x20, ampliación x40).

En los animales -C+E+HUFA, se observa en el interior de algunas lamelas grandes dilataciones que a veces afectan a la parte terminal. Estas dilataciones son expansiones vasculares totalmente rellenas de eritrocitos, siendo los glóbulos rojos también abundantes en aquellas lamelas que no están dilatadas. En el filamento, bajo el epitelio de revestimiento, hay abundante tejido conjuntivo laxo con gran número de células eosinofílicas de gran tamaño, de núcleo excéntrico y con su citoplasma totalmente repleto de gránulos que muestran afinidad por la eosina (Imagen IV.12.).



**Imagen IV.12.-** Estructura de un filamento branquial (F. B) con sus respectivas lamelas (L) de animales alimentados con dieta -C+E+HUFA. Destacan las dilataciones con abundantes glóbulos rojos observadas en algunas de las lamelas y la presencia de células eosinofílicas a lo largo del filamento branquial (ampliación imagen) (H-E, x20, ampliación x40).

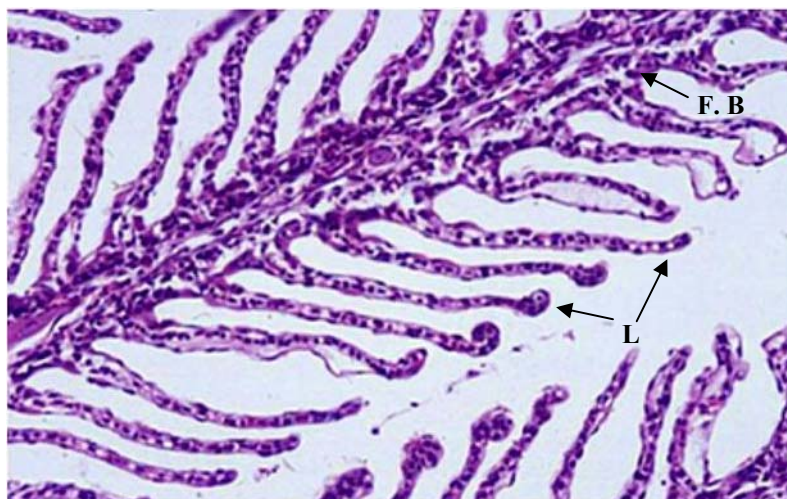
El grupo +E+HUFA presenta dilataciones vasculares más abundantes que en el tratamiento anterior, observándose que el extremo de las lamelas es algo más corto y rizado (Imagen IV.13.).



**Imagen IV.13.-** Filamento branquial (F. B) y lamelas (L) con abundantes dilataciones de animales alimentados con dietas +E+HUFA (H-E, x20).



En el grupo -E+HUFA las lamelas son largas y muestran su borde rizado. No se observan dilataciones vasculares (Imagen IV.14.).



**Imagen IV.14.-** Filamento branquial (F. B) y lamelas (L) con borde rizado en animales alimentados con dieta -E+HUFA (H-E, x20).

## 2.8. PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS

Los resultados correspondientes a los parámetros hematológicos determinados a los 21 y 42 días (Tablas IV.15. y IV.16. respectivamente), muestran que las variaciones estadísticas a lo largo del tiempo se ponen de manifiesto mayoritariamente en condiciones de alta densidad. El patrón de comportamiento observado no muestra un aumento o descenso general de un determinado parámetro con el tiempo, sino que el tipo de respuesta va a depender del tipo de dieta con que los animales fueron alimentados. Así, a alta densidad, el hematocrito y el recuento de eritrocitos muestran un descenso de sus valores a los 42 días en los grupos -E+HUFA, observándose un incremento de ambos parámetros, junto con la hemoglobina, en los animales +E+HUFA que, en el caso del recuento, es independiente de la densidad. Por otro lado, el recuento, la hemoglobina y la concentración corpuscular media de hemoglobina muestran un descenso significativo al final del experimento en los grupos +E-HUFA mantenidos a

alta densidad, presentando estos dos últimos parámetros, junto con la hemoglobina corpuscular media, un incremento en los grupos -E-HUFA. Los valores de recuento también se vieron significativamente disminuidos al final del experimento en los grupos -C+E+HUFA. El comportamiento del volumen corpuscular medio es algo diferente, ya que se produce un incremento significativo en los grupos +E-HUFA a alta densidad y un descenso de los +E+HUFA en condiciones de baja densidad.

El análisis estadístico pone de manifiesto una influencia general de la densidad de peces en todos ellos (anexo Tablas IV.15. y IV.16.), observándose, a los 42 días, una tendencia a presentar valores más bajos de hematocrito en la mayoría de los grupos sometidos a baja densidad, aunque no de manera significativa. Un comportamiento similar ocurre con la hemoglobina, recuento de glóbulos rojos y concentración corpuscular media de hemoglobina, que a lo largo de todo el experimento tienden a disminuir de manera significativa en condiciones de baja densidad. En cuanto al volumen corpuscular medio se observa, por el contrario, un aumento de este índice en condiciones de baja densidad, encontrándose a los 21 días diferencias significativas en más grupos que a los 42 días. Un patrón de cambios parecido se observa en la hemoglobina corpuscular media de algunos grupos (-E-HUFA, +E+HUFA, -C+E+HUFA) manteniéndose esta tendencia en los dos últimos al final del período experimental.

**Tabla IV.15.-** Efecto de la densidad de peces y composición de la dieta sobre parámetros e índices hematológicos tras un período experimental de 21 días.

| <b>DIETA</b>       | <b>Densidad de peces (g/l)</b> | <b>Hematocrito (%)</b>   | <b>Hemoglobina (g/100 ml)</b> | <b>Recuento (n° células/mm<sup>3</sup>)-10<sup>6</sup></b> | <b>CCMH (g/100 ml)</b>      | <b>VCM (micras<sup>3</sup>)</b> | <b>HCM (pg)</b>             |
|--------------------|--------------------------------|--------------------------|-------------------------------|--|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 41.06 ± 0.2              | 6.11 ± 0.4 <sup>a x</sup>     | 0.73 ± 0.03 <sup>a</sup>                                   | 14.88 ± 1.0 <sup>a x</sup>  | 566.5 ± 24.3 <sup>bc</sup>      | 83.88 ± 3.0 <sup>a x</sup>  |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 39.78 ± 1.6 <sup>x</sup> | 8.17 ± 0.9 <sup>b x</sup>     | 0.94 ± 0.04 <sup>b x</sup>                                 | 20.74 ± 3.0 <sup>bc</sup>   | 425.6 ± 4.21 <sup>a x</sup>     | 88.48 ± 9.5 <sup>a</sup>    |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 46.13 ± 2.5              | 10.22 ± 0.6 <sup>c x</sup>    | 0.90 ± 0.03 <sup>b x</sup>                                 | 22.20 ± 1.2 <sup>c x</sup>  | 512.7 ± 21.7 <sup>b x</sup>     | 113.2 ± 3.4 <sup>b</sup>    |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 42.10 ± 1.8 <sup>x</sup> | 7.22 ± 0.3 <sup>ab</sup>      | 0.73 ± 0.04 <sup>a x</sup>                                 | 17.17 ± 0.2 <sup>ab x</sup> | 577.9 ± 14.5 <sup>c x</sup>     | 99.10 ± 1.8 <sup>ab x</sup> |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>100</b>                     | 44.94 ± 1.5              | 7.67 ± 0.2 <sup>ab x</sup>    | 0.88 ± 0.02 <sup>b x</sup>                                 | 17.07 ± 0.3 <sup>ab x</sup> | 514.0 ± 17.0 <sup>b x</sup>     | 87.74 ± 2.9 <sup>a x</sup>  |
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 43.26 ± 1.8 <sup>b</sup> | 8.30 ± 0.4 <sup>b</sup>       | 0.73 ± 0.01 <sup>c</sup>                                   | 19.19 ± 0.6                 | 592.7 ± 33.8 <sup>ab</sup>      | 113.7 ± 7.1 <sup>bc</sup>   |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 29.06 ± 2.5 <sup>a</sup> | 4.80 ± 0.7 <sup>a</sup>       | 0.58 ± 0.04 <sup>ab</sup>                                  | 15.72 ± 2.1                 | 520.3 ± 30.9 <sup>a</sup>       | 82.13 ± 9.9 <sup>a</sup>    |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 43.56 ± 3.3 <sup>b</sup> | 6.62 ± 0.5 <sup>ab</sup>      | 0.69 ± 0.04 <sup>bc</sup>                                  | 15.20 ± 0.1                 | 637.0 ± 46.7 <sup>b</sup>       | 96.93 ± 7.8 <sup>ab</sup>   |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 47.83 ± 0.5 <sup>b</sup> | 7.15 ± 0.5 <sup>b</sup>       | 0.53 ± 0.01 <sup>a</sup>                                   | 14.94 ± 0.8                 | 894.4 ± 23.8 <sup>c</sup>       | 133.7 ± 8.7 <sup>c</sup>    |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>20</b>                      | 41.87 ± 1.9 <sup>b</sup> | 6.56 ± 0.3 <sup>ab</sup>      | 0.60 ± 0.05 <sup>ab</sup>                                  | 15.78 ± 0.3                 | 691.8 ± 29.6 <sup>b</sup>       | 110.5 ± 6.9 <sup>bc</sup>   |

<sup>a, b, y c</sup> : Diferencias entre dietas para una misma densidad. <sup>x</sup>: Diferencias para una misma dieta a ambas densidades. Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la media ± error estándar (n = 6). CCMH (concentración corpuscular media de hemoglobina): (hemoglobina (g/100 ml) / hematocrito (%)) x 100; VCM (volumen corpuscular medio): (hematocrito (%) / recuento (n° células/mm<sup>3</sup>)) x 10<sup>7</sup>; HCM (hemoglobina corpuscular media): (hemoglobina (g/100 ml) / recuento (n° células/mm<sup>3</sup>)) x 10<sup>7</sup>.

**Tabla IV.16.-** Efecto de la densidad de peces y composición de la dieta sobre parámetros e índices hematológicos tras un período experimental de 42 días.

| <b>DIETA</b>       | <b>Densidad de peces (g/l)</b> | <b>Hematocrito (%)</b>     | <b>Hemoglobina (g/100 ml)</b> | <b>Recuento (nº células/mm<sup>3</sup>)·10<sup>6</sup></b> | <b>CCMH (g/100 ml)</b>     | <b>VCM (micras<sup>3</sup>)</b> | <b>HCM (pg)</b>            |
|--------------------|--------------------------------|----------------------------|-------------------------------|--|----------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 42.39 ± 1.3 <sup>bc</sup>  | 8.89 ± 0.3 <sup>c x *</sup>   | 0.76 ± 0.04 <sup>b</sup>                                   | 20.98 ± 0.4 <sup>b *</sup> | 561.4 ± 24.7 <sup>b</sup>       | 117.6 ± 4.9 <sup>c *</sup> |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 32.88 ± 1.3 <sup>a *</sup> | 6.62 ± 0.4 <sup>a x</sup>     | 0.70 ± 0.04 <sup>ab x *</sup>                              | 20.08 ± 0.6 <sup>b x</sup> | 482.4 ± 36.8 <sup>a</sup>       | 96.55 ± 7.4 <sup>a</sup>   |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 44.77 ± 0.9 <sup>cd</sup>  | 7.61 ± 0.3 <sup>ab *</sup>    | 0.67 ± 0.02 <sup>a *</sup>                                 | 16.98 ± 0.6 <sup>a *</sup> | 677.0 ± 21.1 <sup>c *</sup>     | 114.7 ± 3.7 <sup>bc</sup>  |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 46.88 ± 0.4 <sup>d *</sup> | 8.52 ± 0.3 <sup>bc x *</sup>  | 0.86 ± 0.02 <sup>c x *</sup>                               | 18.17 ± 0.7 <sup>a</sup>   | 545.5 ± 9.32 <sup>ab x</sup>    | 99.25 ± 4.2 <sup>ab</sup>  |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>100</b>                     | 40.05 ± 1.6 <sup>b</sup>   | 7.35 ± 0.4 <sup>a</sup>       | 0.77 ± 0.02 <sup>b x *</sup>                               | 18.35 ± 0.6 <sup>a</sup>   | 522.2 ± 23.1 <sup>ab x</sup>    | 96.18 ± 6.1 <sup>a x</sup> |
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 40.09 ± 1.4 <sup>bc</sup>  | 7.79 ± 0.3 <sup>c</sup>       | 0.72 ± 0.02 <sup>c</sup>                                   | 19.48 ± 0.7                | 555.9 ± 16.2 <sup>a</sup>       | 108.1 ± 3.8 <sup>b</sup>   |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 30.11 ± 1.2 <sup>a</sup>   | 4.91 ± 0.3 <sup>a</sup>       | 0.59 ± 0.02 <sup>a</sup>                                   | 16.45 ± 1.1                | 511.4 ± 23.3 <sup>a</sup>       | 83.10 ± 3.7 <sup>a</sup>   |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 44.74 ± 1.3 <sup>d</sup>   | 7.78 ± 0.3 <sup>c</sup>       | 0.67 ± 0.02 <sup>bc</sup>                                  | 17.42 ± 0.7                | 674.9 ± 31.2 <sup>b</sup>       | 117.0 ± 4.7 <sup>b</sup>   |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 43.90 ± 1.6 <sup>cd</sup>  | 7.47 ± 0.2 <sup>c</sup>       | 0.68 ± 0.03 <sup>c *</sup>                                 | 17.10 ± 0.6                | 655.2 ± 30.1 <sup>b *</sup>     | 112.1 ± 6.7 <sup>b</sup>   |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>20</b>                      | 39.41 ± 1.4 <sup>b</sup>   | 6.76 ± 0.2 <sup>b</sup>       | 0.60 ± 0.03 <sup>ab</sup>                                  | 17.20 ± 0.5                | 661.0 ± 34.6 <sup>b</sup>       | 113.0 ± 3.9 <sup>b</sup>   |

<sup>a, b, y c</sup> : Diferencias entre dietas para una misma densidad. <sup>x</sup>: Diferencias para una misma dieta a ambas densidades. \*: diferencias entre las medidas realizadas a los 21 y 42 días para una misma situación experimental. Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la media ± error estándar (n = 6). CCMH (concentración corpuscular media de hemoglobina): (hemoglobina (g/100ml) / hematocrito) x 100; VCM (volumen corpuscular medio): (hematocrito / recuento (nº células/mm<sup>3</sup>)) x 10<sup>7</sup>; HCM (hemoglobina corpuscular media): (hemoglobina (g/100ml)/ recuento (nº células/mm<sup>3</sup>)) x 10<sup>7</sup>

La existencia de diferencias estadísticas asociadas al efecto de la dieta (anexo Tablas IV.15. y IV.16.) se refleja en los animales alimentados con la dieta -E+HUFA, los cuales muestran, al final del experimento, valores más bajos en la mayoría de los parámetros hematológicos determinados (hematocrito, hemoglobina, recuento de glóbulos rojos, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media) a ambas densidades, aunque en la hemoglobina corpuscular media, volumen corpuscular medio y recuento, este descenso sólo se muestra más claro a baja densidad. A los 21 días del experimento esta tendencia ya se pone de manifiesto en el hematocrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina y hemoglobina corpuscular media, aunque en estos dos últimos parámetros el descenso sólo es apreciable en condiciones de baja densidad. Cabe destacar que, en el caso de la concentración corpuscular media de hemoglobina el efecto a alta densidad fue el contrario, observándose un incremento en los animales -E+HUFA durante todo el período experimental.

Con relación a las dietas sin carencia vitamínica (+E-HUFA y +E+HUFA), al finalizar el experimento se pone de manifiesto un incremento de los valores de hematocrito en animales alimentados con estas dietas a ambas densidades. En la hemoglobina también se observa a baja densidad un aumento de sus valores en +E-HUFA y +E+HUFA, además de en -E-HUFA y a alta densidad sólo en los dos últimos grupos. Los valores de recuento también fueron elevados en animales alimentados con dietas +E+HUFA y -E-HUFAa a baja densidad, mientras que a alta densidad sólo se observó en el grupo +E+HUFA. A los 21 días, el volumen corpuscular medio presentó sus valores más altos en los peces +E+HUFA con independencia de la densidad. Al final del experimento las dietas con vitamina E mostraron los valores más altos a baja densidad, observándose sólo en los animales +E-HUFA a alta densidad. En cuanto a la concentración corpuscular media de hemoglobina, se observa que la dieta +E-HUFA sólo muestra valores elevados a los 21 días de experimento en condiciones de alta densidad, presentando a los 42 días valores destacadamente más bajos los grupos suplementados con vitamina E. Por último, destacar el efecto de la dieta -E-HUFA al final del experimento, que presentó, con independencia de la densidad, valores de hematocrito, hemoglobina, recuento y hemoglobina corpuscular media, superiores con respecto al otro grupo carente de vitamina E (-E+HUFA).

**Anexo Tablas IV.15. y IV.16.-** ANOVA de dos vías para la densidad y la dieta en los distintos parámetros medidos.

|                     | <b>Período experimental</b><br>(días) | <b>Hematocrito</b> | <b>Hemoglobina</b> | <b>Recuento</b> | <b>CCMH</b> | <b>VCM</b> | <b>HCM</b> |
|---------------------|---------------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------|-------------|------------|------------|
| DIETA               | 21                                    | 0.001              | 0.05               | 0.01            | n.s         | 0.001      | 0.01       |
|                     | 42                                    | 0.001              | 0.001              | 0.001           | 0.001       | 0.001      | 0.001      |
| DENSIDAD            | 21                                    | n.s                | 0.01               | 0.001           | 0.05        | 0.001      | 0.01       |
|                     | 42                                    | 0.05               | 0.001              | 0.001           | 0.01        | 0.01       | n.s        |
| DIETA *<br>DENSIDAD | 21                                    | 0.01               | 0.001              | 0.001           | 0.01        | 0.001      | 0.01       |
|                     | 42                                    | n.s                | 0.05               | 0.01            | n.s         | 0.05       | 0.05       |

n.s: no existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

En líneas generales, cabe destacar que además de la influencia de la densidad y la dieta, los análisis estadísticos revelan que en el período experimental se produce un efecto conjunto de ambas variables sobre todos estos parámetros hematológicos (anexo Tablas IV.15. y IV.16.).

## 2.9. PARÁMETROS PLASMÁTICOS Y GLUCÓGENO TISULAR

Las Tablas IV.17. y IV.18. recogen los niveles plasmáticos de cortisol, proteínas y glucosa, así como el contenido de glucógeno muscular y hepático en los distintos grupos experimentales. Los análisis estadísticos no revelan variaciones significativas a lo largo del período experimental en los niveles de cortisol, excepto en los grupos +E-HUFA a alta densidad y +E+HUFA a baja densidad, que presentan al final del experimento un descenso de sus valores. Con respecto a las proteínas, los valores son bastante estables a lo largo del tiempo, si bien los grupos +E+HUFA y -C+E+HUFA presentan, a baja densidad, un incremento significativo de sus niveles al final del experimento. En contraposición, el grupo -C+E+HUFA muestra a alta densidad un descenso significativo de las proteínas plasmáticas con el tiempo. Los glucosa, en

condiciones de alta densidad, presentó un aumento generalizado de sus niveles a los 42 días, que es significativo en los animales alimentados con dietas carentes de vitamina E. A baja densidad este aumento se observa sólo de manera significativa en los grupos +E-HUFA y +E+HUFA. El glucógeno hepático muestra a baja densidad un incremento de sus valores a los 42 días, que es significativo en todos los grupos, excepto en los de animales alimentados con dietas carentes de HUFAs. Por el contrario, a alta densidad, se observa un descenso de las concentraciones hepáticas de glucógeno en el grupo -C+E+HUFA, no sufriendo variaciones significativas el resto de los grupos. Los valores de glucógeno muscular no revelan grandes cambios a lo largo del período experimental, observándose, a alta densidad, en los grupos +E+HUFA y -C+E+HUFA, las únicas diferencias significativas en las que se aprecia un descenso y un aumento respectivamente de los niveles de glucógeno.

Los análisis estadísticos no muestran una influencia clara de la densidad sobre los niveles plasmáticos de cortisol. Si bien, a los 42 días, las condiciones de alta densidad provocan un aumento significativo de los niveles de cortisol en los peces alimentados con las dietas -C+E+HUFA y +E+HUFA. En cuanto a las proteínas plasmáticas solo se manifiesta una influencia significativa de la densidad en los primeros 21 días en los grupos +E+HUFA y -C+E+HUFA mostraron valores más altos a alta densidad; desapareciendo toda diferencia a los 42 días. Con respecto a la glucosa, se observa una tendencia a presentar niveles más altos a baja densidad, que sólo son significativos para las dietas carentes de vitamina E y a los 21 días del experimento; cabe destacar que, el análisis estadístico general muestra cierta influencia de la densidad sobre este parámetro (anexo Tablas IV.17. y IV.18.). La respuesta del glucógeno hepático varía a lo largo del experimento ya que, a los 21 días los grupos +E+HUFA y -C+E+HUFA, presentan valores significativamente más elevados a alta densidad, observándose, sin embargo, que a los 42 días los valores más altos se producen a baja densidad y, en concreto, de manera significativa, en el grupo -E+HUFA. El glucógeno muscular disminuye su concentración a los 42 días en los animales alimentados con la dieta +E-HUFA y sometidos a alta densidad.

En cuanto al efecto del tipo de dieta sobre estos parámetros, a los 21 días los peces -E-HUFA presentan los valores más bajos de cortisol plasmático mientras que los -C+E+HUFA los presentan más altos que el resto de los grupos sometidos a alta densidad. Por otro lado, a los 42 días, y a alta densidad, se observa que los +E+HUFA y -C+E+HUFA presentan valores superiores al resto de los grupos, observándose una tendencia contraria en estos animales cuando se someten a baja densidad. Con respecto a las proteínas, se observan también efectos de la dieta, destacando que en condiciones de baja densidad los grupos -E-HUFA presentan los valores más altos con respecto al resto. En condiciones de alta densidad sólo se observan diferencias significativas a los 21 días del experimento, mostrando el grupo -C+E+HUFA el valor más alto, mientras que aquellos animales alimentados con dietas carentes en vitamina E presentan valores de proteínas significativamente más bajos. La glucosa plasmática sólo muestra diferencias significativas, asociadas a la dieta, a los 21 días del experimento y en condiciones de baja densidad, mostrando los peces alimentados con dietas +E-HUFA los títulos más bajos de glucosa. En cuanto al glucógeno hepático, a los 21 días, a alta densidad, y al final del experimento, a ambas densidades, los valores más bajos los presentan los grupos -E+HUFA, mientras que el grupo -C+E+HUFA presenta a los 21 días los valores mayores a alta densidad, mostrándolos los -E-HUFA a baja densidad. Al final del experimento, los títulos significativamente más altos en condiciones de alta densidad son presentados por los grupos +E+HUFA, mientras que a baja densidad los animales alimentados con las dietas -E-HUFA mostraron, aunque no de manera significativa, valores superiores al resto de los grupos. Por otro lado, a pesar de que los análisis estadísticos globales no revelan ninguna influencia de la dieta sobre los niveles de glucógeno muscular, a los 21 días, a baja densidad, se observa una tendencia en el grupo +E-HUFA a presentar valores superiores al resto, hecho que a los 42 días, además de en este grupo, también se pone de manifiesto en los -E-HUFA y +E+HUFA presentando aquellos grupos con carencias vitamínicas y niveles altos de HUFAs (-E+HUFA y -C+E+HUFA) valores significativamente más bajos.



**Tabla IV.17.-** Efecto de la densidad de peces y composición de la dieta sobre algunos parámetros plasmáticos y glucógeno en tejidos tras un período experimental de 21 días.

| <b>DIETA</b>       | <b>Densidad de peces (g/l)</b> | <b>Cortisol plasmático (ng/ml)</b> | <b>Proteínas plasmáticas (mg/ml)</b> | <b>Glucosa plasmática (mg/100 ml)</b> | <b>Glucógeno hepático (mg/g tejido)</b> | <b>Glucógeno muscular (mg/g tejido)</b> |
|--------------------|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---|---|
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 16.70 ± 4.1 <sup>a</sup>           | 38.81 ± 2.1 <sup>a</sup>             | 80.14 ± 9.7 <sup>x</sup>              | 71.13 ± 2.3 <sup>ab</sup>               | 9.80 ± 1.2                              |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 32.33 ± 6.5 <sup>ab</sup>          | 38.58 ± 1.3 <sup>a</sup>             | 91.91 ± 3.4 <sup>x</sup>              | 53.21 ± 9.2 <sup>a</sup>                | 10.64 ± 1.4                             |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 44.67 ± 1.9 <sup>bc</sup>          | 41.24 ± 1.0 <sup>ab</sup>            | 84.94 ± 6.4                           | 62.17 ± 3.3 <sup>ab</sup>               | 8.66 ± 1.0                              |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 29.90 ± 6.9 <sup>ab</sup>          | 44.19 ± 2.2 <sup>bx</sup>            | 87.14 ± 8.1                           | 80.86 ± 9.4 <sup>bx</sup>               | 10.09 ± 0.2                             |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>100</b>                     | 64.00 ± 9.8 <sup>cx</sup>          | 49.78 ± 1.2 <sup>cx</sup>            | 106.0 ± 7.1                           | 106.8 ± 3.1 <sup>cx</sup>               | 8.11 ± 0.3                              |
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 41.67 ± 9.8                        | 45.24 ± 2.1 <sup>c</sup>             | 121.4 ± 8.1 <sup>b</sup>              | 72.12 ± 8.0 <sup>c</sup>                | 9.95 ± 0.8                              |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 33.33 ± 1.3                        | 36.99 ± 3.2 <sup>a</sup>             | 120.8 ± 6.7 <sup>b</sup>              | 52.02 ± 4.4 <sup>ab</sup>               | 8.66 ± 0.8                              |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 47.33 ± 13.6                       | 43.41 ± 1.2 <sup>bc</sup>            | 88.11 ± 3.3 <sup>a</sup>              | 58.39 ± 8.0 <sup>bc</sup>               | 10.44 ± 0.6                             |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 26.33 ± 5.3                        | 37.36 ± 2.0 <sup>ab</sup>            | 107.3 ± 8.2 <sup>ab</sup>             | 40.47 ± 3.4 <sup>ab</sup>               | 8.96 ± 1.2                              |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>20</b>                      | 17.66 ± 1.2                        | 39.38 ± 0.6 <sup>abc</sup>           | 114.2 ± 11.5 <sup>b</sup>             | 34.54 ± 2.5 <sup>a</sup>                | 9.55 ± 0.5                              |

<sup>a, b, y c</sup>: Diferencias entre dietas para una misma densidad. <sup>x</sup>: Diferencias para una misma dieta a ambas densidades. Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la media ± error estándar (n = 6).

**Tabla IV.18.-** Efecto de la densidad de peces y composición de la dieta sobre algunos parámetros plasmáticos y glucógeno en tejidos tras un período experimental de 42 días.

| <b>DIETA</b>       | <b>Densidad de peces (g/l)</b> | <b>Cortisol plasmático (ng/ml)</b> | <b>Proteínas plasmáticas (mg/ml)</b> | <b>Glucosa plasmática (mg/100 ml)</b> | <b>Glucógeno hepático (mg/g tejido)</b> | <b>Glucógeno muscular (mg/g tejido)</b> |
|--------------------|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---|---|
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 21.00 ± 6.4 <sup>a</sup>           | 43.56 ± 0.7                          | 112.2 ± 4.5 *                         | 70.24 ± 2.1 <sup>b</sup>                | 8.81 ± 0.7                              |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 22.67 ± 8.2 <sup>a</sup>           | 41.80 ± 1.8                          | 111.9 ± 6.2 *                         | 52.07 ± 2.5 <sup>a x</sup>              | 8.81 ± 1.1                              |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 20.50 ± 2.6 <sup>a *</sup>         | 43.50 ± 2.3                          | 101.4 ± 5.7                           | 73.43 ± 7.4 <sup>b</sup>                | 7.95 ± 0.5 <sup>x</sup>                 |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 55.50 ± 11.1 <sup>b x</sup>        | 47.87 ± 1.4                          | 109.5 ± 11.7                          | 91.73 ± 3.3 <sup>c</sup>                | 8.71 ± 0.2 *                            |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>100</b>                     | 78.00 ± 11.3 <sup>b x</sup>        | 43.77 ± 1.7 *                        | 112.9 ± 5.6                           | 74.19 ± 8.4 <sup>b *</sup>              | 10.20 ± 0.6 *                           |
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 36.33 ± 3.4 <sup>c</sup>           | 47.57 ± 1.5 <sup>c</sup>             | 120.7 ± 11.3                          | 108.9 ± 14.2                            | 11.80 ± 1.0 <sup>b</sup>                |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 30.00 ± 9.6 <sup>bc</sup>          | 41.60 ± 0.5 <sup>ab</sup>            | 112.9 ± 8.3                           | 82.74 ± 8.8 *                           | 9.45 ± 0.3 <sup>ab</sup>                |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 20.00 ± 3.5 <sup>abc</sup>         | 39.50 ± 1.8 <sup>a</sup>             | 114.9 ± 10.9 *                        | 92.42 ± 10.7                            | 11.13 ± 0.8 <sup>b</sup>                |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 10.00 ± 0.1 <sup>a *</sup>         | 46.30 ± 0.7 <sup>bc *</sup>          | 135.4 ± 1.0 *                         | 99.08 ± 10.0 *                          | 10.39 ± 0.9 <sup>b</sup>                |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>20</b>                      | 17.00 ± 5.0 <sup>ab</sup>          | 43.43 ± 2.0 <sup>abc *</sup>         | 98.2 ± 16.6                           | 103.5 ± 15.6 *                          | 7.77 ± 0.7 <sup>a</sup>                 |

a, b, y c : Diferencias entre dietas para una misma densidad. x: Diferencias para una misma dieta a ambas densidades. \*: diferencias entre las medidas realizadas a los 21 y 42 días para una misma situación experimental Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la  $\pm$  error estándar (n = 6).

**Anexo Tablas IV.17. y IV.18.-** ANOVA de dos vías para la densidad y la dieta en los distintos parámetros medidos.

|                     | <b>Período experimental (días)</b> | <b>Cortisol plasmático</b> | <b>Proteínas plasmáticas</b> | <b>Glucosa plasmática</b> | <b>Glucógeno hepático</b> | <b>Glucógeno muscular</b> |
|---------------------|------------------------------------|----------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| DIETA               | 21                                 | n.s                        | 0.01                         | 0.05                      | 0.05                      | n.s                       |
|                     | 42                                 | 0.05                       | 0.01                         | n.s                       | n.s                       | n.s                       |
| DENSIDAD            | 21                                 | n.s                        | n.s                          | 0.001                     | 0.001                     | n.s                       |
|                     | 42                                 | 0.001                      | n.s                          | 0.05                      | 0.001                     | 0.05                      |
| DIETA<br>* DENSIDAD | 21                                 | 0.01                       | 0.001                        | n.s                       | 0.001                     | n.s                       |
|                     | 42                                 | 0.001                      | n.s                          | n.s                       | n.s                       | 0.01                      |

n.s: no existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Cabe destacar una influencia global de la densidad en todos los parámetros medidos excepto en las proteínas plasmáticas. En cuanto a la dieta, el único parámetro que no está influido por esta variable es el glucógeno muscular. Por último, el efecto conjunto de ambas variables se puso de manifiesto en todos los parámetros medidos excepto en los niveles de glucosa plasmática (anexo Tablas IV.17. y IV.18.).

## 2.10. LÍPIDOS PLASMÁTICOS

Las Tablas IV.19. y IV.20. muestran los niveles de lípidos totales, triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL y LDL en plasma, medidos en los distintos lotes de animales a lo largo del experimento. Los resultados ponen de manifiesto un descenso de los lípidos totales a los 42 días en casi todos los grupos, con la salvedad del -E-HUFA sometido a alta densidad, que presentó un incremento de sus niveles al final del experimento. Los triglicéridos no muestran un patrón de cambios generalizado a los 42 días, ya que a alta densidad se observan incrementos en dietas con bajos niveles de HUFAs que sólo fueron significativas en -E-HUFA, mientras que a baja densidad el aumento se pone de manifiesto en los -E+HUFA y +E+HUFA, mostrando los

+E-HUFA un descenso significativo. Los valores de colesterol total no varían de manera destacada a lo largo del experimento, únicamente se observa, a alta densidad, un aumento significativo en el grupo -E-HUFA, mientras que el grupo -C+E+HUFA sufrió un descenso de sus valores. En cuanto al colesterol HDL y LDL, el patrón de cambios observado al final del experimento es significativo en los mismos grupos, aunque la tendencia es contraria; al final del experimento se produce un descenso de LDL en los grupos -E+HUFA a alta densidad y en +E+HUFA a ambas densidades, observándose, en los mismos grupos, un incremento significativo de los valores de colesterol LDL.

En todos los casos, los análisis estadísticos no revelan un efecto global de la densidad sobre los parámetros determinados al final del experimento, excepto en los lípidos totales y triglicéridos a los 21 días (anexo Tablas IV.19. y IV.20.). En concreto, se observa que los lípidos totales en animales que consumieron dietas con alto contenido en HUFAs muestran (a los 21 días) valores significativamente más elevados a alta densidad, mientras que el nivel de triglicéridos en los grupos -E-HUFA, -C+E+HUFA y +E-HUFA es mayor a baja densidad, aunque sólo en el último las diferencias son significativas. Con relación al colesterol total, a pesar de no observarse influencia global de la densidad, se pone de manifiesto a los 21 días, en los grupos alimentados con dietas bajas en HUFAs y sometidos a baja densidad, una mayor concentración plasmática de este parámetro. Con respecto al colesterol HDL, a lo largo de todo el período experimental, el grupo -C+E+HUFA presentó valores significativamente menores cuando se sometió a baja densidad. En cuanto al colesterol LDL se muestra a los 42 días una tendencia a disminuir sus niveles en condiciones de baja densidad en los grupos -E+HUFA, observándose de manera significativa el efecto contrario en los -C+E+HUFA

No se muestra una influencia clara de la dieta sobre estos parámetros a lo largo del experimento, observándose que los grupos -E-HUFA a alta densidad muestran, al final del experimento, valores de lípidos totales y triglicéridos significativamente más altos que el resto. Con respecto al colesterol total, a los 21 días se observan, a alta densidad, niveles más bajos en los grupos alimentados con dietas -HUFA y -E+HUFA, apreciándose en este último grupo a ambas densidades. A los 42 días se produce una

tendencia, aunque no claramente significativa, a presentar niveles de colesterol total más bajos en el grupo +E-HUFA a ambas densidades. El colesterol HDL presenta, a lo largo del experimento, valores altos en los grupos -C+E+HUFA sometidos a alta densidad, mientras que, a baja, los animales -E-HUFA muestran valores elevados, que a los 21 días fueron significativos junto con los animales +E+HUFA. El colesterol LDL presenta a los 21 valores significativamente mayores en el grupos -C+E+HUFA y menores en los animales +E+HUFA a baja densidad, tendencia que se mantiene a alta densidad. En contraposición, al final del experimento se observa una discrepancia en los niveles de colesterol LDL de los animales -C+E+HUFA ya que a baja densidad se mantiene la tendencia a mostrar valores elevados, mientras que a alta presenta los valores más bajos. Los niveles de colesterol LDL aumentaron significativamente al final del experimento en los peces alimentados con la dieta -E+HUFA sometidos a alta densidad.

**Tabla IV.19.-** Efecto de la densidad de peces y composición de la dieta sobre los lípidos plasmáticos tras un período experimental de 21 días.

| <b>DIETA</b>       | <b>Densidad de Peces (g/l)</b> | <b>Lípidos Totales (mg/100 ml)</b> | <b>Triglicéridos (mg/100 ml)</b> | <b>Colesterol Total (mg/100 ml)</b> | <b>Colesterol HDL (mg/100 ml)</b> | <b>Colesterol LDL (mg/100 ml)</b> |
|--------------------|--------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 3743 ± 202 <sup>a x</sup>          | 466.0 ± 35.8                     | 360.2 ± 21.1 <sup>a x</sup>         | 230.1 ± 33.1 <sup>ab</sup>        | 147.4 ± 10.4                      |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 4409 ± 248 <sup>ab x</sup>         | 479.1 ± 39.9                     | 425.5 ± 25.2 <sup>a</sup>           | 228.2 ± 27.8 <sup>ab</sup>        | 160.1 ± 39.6                      |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 4100 ± 283 <sup>a</sup>            | 381.0 ± 21.2 <sup>x</sup>        | 360.2 ± 25.2 <sup>a x</sup>         | 182.6 ± 29.6 <sup>a</sup>         | 126.6 ± 30.4                      |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 5004 ± 305 <sup>b x</sup>          | 528.2 ± 47.6                     | 492.9 ± 21.8 <sup>b</sup>           | 295.8 ± 22.7 <sup>bc</sup>        | 89.40 ± 7.60                      |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>100</b>                     | 5173 ± 212 <sup>b x</sup>          | 494.6 ± 35.0                     | 562.5 ± 11.1 <sup>c x</sup>         | 326.7 ± 42.6 <sup>c x</sup>       | 179.5 ± 9.10                      |
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 4938 ± 142 <sup>b</sup>            | 544.3 ± 20.1 <sup>ab</sup>       | 467.8 ± 24.5 <sup>b</sup>           | 294.1 ± 30.6 <sup>b</sup>         | 140.7 ± 18.2 <sup>abc</sup>       |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 3656 ± 193 <sup>a</sup>            | 439.6 ± 45.1 <sup>a</sup>        | 363.9 ± 26.0 <sup>a</sup>           | 155.9 ± 23.3 <sup>a</sup>         | 127.0 ± 35.5 <sup>ab</sup>        |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 5078 ± 405 <sup>b</sup>            | 694.0 ± 30.6 <sup>c</sup>        | 472.9 ± 32.9 <sup>b</sup>           | 150.1 ± 14.4 <sup>a</sup>         | 171.6 ± 32.7 <sup>bc</sup>        |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 3289 ± 213 <sup>a</sup>            | 444.0 ± 31.7 <sup>a</sup>        | 495.6 ± 28.9 <sup>b</sup>           | 315.4 ± 50.9 <sup>b</sup>         | 67.80 ± 13.5 <sup>a</sup>         |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>20</b>                      | 3809 ± 24.3 <sup>a</sup>           | 636.3 ± 56.4 <sup>bc</sup>       | 490.2 ± 14.9 <sup>b</sup>           | 169.0 ± 33.7 <sup>a</sup>         | 219.2 ± 15.2 <sup>c</sup>         |

<sup>a, b, y c</sup> : Diferencias entre dietas para una misma densidad. <sup>x</sup>: Diferencias para una misma dieta a ambas densidades. Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la media ± error estándar (n = 6).

**Tabla IV.20.-** Efecto de la densidad de peces y composición de la dieta sobre los lípidos plasmáticos tras un período experimental de 42 días.

| <b>DIETA</b>       | <b>Densidad de Peces (g/l)</b> | <b>Lípidos Totales (mg/100 ml)</b> | <b>Triglicéridos (mg/100 ml)</b> | <b>Colesterol Total (mg/100 ml)</b> | <b>Colesterol HDL (mg/100 ml)</b> | <b>Colesterol LDL (mg/100 ml)</b> |
|--------------------|--------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 4587 ± 254 <sup>c</sup> *          | 830.1 ± 40.6 <sup>b x</sup> *    | 520.7 ± 18.0 <sup>b</sup> *         | 205.2 ± 21.8 <sup>b</sup>         | 176.7 ± 35.5 <sup>ab</sup>        |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 3575 ± 99 <sup>ab</sup> *          | 444.1 ± 42.2 <sup>a x</sup>      | 482.7 ± 30.0 <sup>ab</sup>          | 105.6 ± 6.10 <sup>a</sup> *       | 348.7 ± 39.6 <sup>c x</sup> *     |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 3218 ± 267 <sup>a</sup> *          | 508.7 ± 56.0 <sup>a</sup>        | 415.6 ± 31.8 <sup>a</sup>           | 152.4 ± 38.1 <sup>ab</sup>        | 225.0 ± 39.8 <sup>ab</sup>        |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 3880 ± 142 <sup>b</sup> *          | 531.7 ± 32.3 <sup>a</sup>        | 512.4 ± 17.5 <sup>b</sup>           | 182.8 ± 27.0 <sup>ab</sup> *      | 262.1 ± 38.9 <sup>bc</sup> *      |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>100</b>                     | 3587 ± 161 <sup>ab</sup> *         | 491.8 ± 55.3 <sup>a</sup>        | 448.2 ± 33.0 <sup>ab</sup> *        | 287.9 ± 13.3 <sup>c x</sup>       | 135.2 ± 21.6 <sup>ax</sup>        |
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 3799 ± 284 *                       | 479.0 ± 52.0                     | 495.5 ± 19.5                        | 254.5 ± 6.80                      | 204.7 ± 49.2                      |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 3261 ± 249                         | 651.9 ± 62.9 *                   | 419.3 ± 27.3                        | 157.4 ± 42.2                      | 150.7 ± 9.60                      |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 3282 ± 149 *                       | 516.9 ± 34.4 *                   | 397.0 ± 14.5                        | 138.9 ± 15.6                      | 154.2 ± 24.5                      |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 4078 ± 175 *                       | 617.6 ± 65.0 *                   | 483.1 ± 40.1                        | 153.9 ± 18.5 *                    | 258.5 ± 54.9 *                    |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>20</b>                      | 3834 ± 283                         | 611.9 ± 105                      | 428.8 ± 28.0                        | 164.0 ± 21.7                      | 246.6 ± 44.1                      |

<sup>a, b y c</sup>: Diferencias entre dietas para una misma densidad. <sup>x</sup>: Diferencias para una misma dieta a ambas densidades. \*: diferencias entre las medidas realizadas a los 21 y 42 días para una misma situación experimental Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la media ± error estándar (n = 6).

**Anexo Tablas IV.19. y IV.20.-** ANOVA de dos vías para la densidad y la dieta en los distintos parámetros medidos.

|                     | <b>Período experimental</b><br>(días) | <b>Lípidos Totales</b> | <b>Triglicéridos</b> | <b>Colesterol Total</b> | <b>Colesterol HDL</b> | <b>Colesterol LDL</b> |
|---------------------|---------------------------------------|------------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
| DIETA               | 21                                    | n.s                    | n.s                  | 0.001                   | 0.001                 | 0.001                 |
|                     | 42                                    | 0.001                  | n.s                  | 0.01                    | 0.01                  | n.s                   |
| DENSIDAD            | 21                                    | 0.05                   | 0.001                | n.s                     | n.s                   | n.s                   |
|                     | 42                                    | n.s                    | n.s                  | n.s                     | n.s                   | n.s                   |
| DIETA<br>* DENSIDAD | 21                                    | 0.001                  | 0.001                | 0.001                   | 0.01                  | n.s                   |
|                     | 42                                    | n.s                    | 0.001                | n.s                     | 0.05                  | 0.05                  |

n.s: no existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Como ya se ha comentado, no se observó efecto de la densidad, al final del experimento, en ninguno de los parámetros medidos, si bien, hubo cierta influencia sobre los lípidos totales y triglicéridos a los 21 días. La influencia de la dieta se puso de manifiesto sobre los lípidos totales, colesterol total y HDL a los 42 días, mientras que a los 21 días sólo influyó sobre el colesterol LDL. El efecto combinado de ambas variables (densidad y dieta) se puso de manifiesto en todos los parámetros, aunque de manera menos destacada sobre el colesterol LDL (anexo Tabla IV.19. y IV.20.).

## 2.11. METABOLISMO DE ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVO

### 2.11.1. Actividad de enzimas antioxidantes y niveles de MDA

#### *HÍGADO*

La actividad de las enzimas antioxidantes y los niveles de peroxidación lipídica (medidos como concentración de malondialdehído, MDA), fueron analizados en hígado a los 21 (Tabla IV.21.) y 42 días del experimento (Tabla IV.22.). Los análisis



estadísticos revelan que a los 42 días se produce un aumento claro de la actividad SOD con independencia de la densidad y tipo de dieta ingerida por los animales. Por otro lado, al final del experimento, se observa un descenso significativo de la actividad catalasa en los grupos -E+HUFA y -C+E+HUFA sometidos a baja densidad. En cuanto a las enzimas glutathion peroxidasa, glutathion reductasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, estas mostraron un descenso de su actividad a los 42 días del experimento, que fue significativo en todos los grupos, excepto para la glutathion reductasa en aquellos animales alimentados con dietas deficientes en vitaminas (-E-HUFA, -E+HUFA y -C+E+HUFA) a baja densidad. El incremento de los niveles de MDA a lo largo del experimento se puso de manifiesto en todos los grupos sometidos a baja densidad excepto en los alimentados con dietas -E-HUFA.

En cuanto al efecto de la densidad, se observa que, en el caso de la SOD y la catalasa, a los 21 días hay, por lo general, una tendencia a incrementar su actividad a baja densidad, que en la SOD sólo se observa en grupos suplementados con vitamina E. En el caso de la catalasa, estos mismos grupos llegan a mostrar al final del ensayo, un aumento significativo de su actividad a baja densidad, con excepción del -C+E+HUFA que, junto al -E+HUFA, tiene un comportamiento contrario, que es significativo en este último grupo. Por otro lado, a los 48 días, el aumento de actividad SOD a baja densidad, sólo es significativo en los animales deficientes en vitamina E. En la actividad glutathion peroxidasa, aunque hay una tendencia a incrementar los valores a baja densidad, ésta sólo se muestra significativa a los 21 días en animales -E-HUFA, y con excepciones en los grupos -E+HUFA y -C+E+HUFA. La glutathion reductasa presenta, a los 21 días, un claro aumento de su actividad a alta densidad en el grupo -E+HUFA, que desaparece al final del experimento. Con relación a la G6PDH, a los 21 días se observa, de manera significativa, una menor actividad en los grupos +E+HUFA y -C+E+HUFA sometidos a baja densidad, mientras que a los 42 días los peces alimentados con la dieta +E-HUFA muestran un incremento significativo de actividad G6PDH a baja densidad. Los niveles de MDA aumentan con la densidad, a los 21 días, en los grupos -E+HUFA, +E-HUFA y +E+HUFA, registrándose, a los 42 días, una disminución de los niveles de MDA en los grupos -E-HUFA y -C+E+HUFA a alta densidad

**Tabla IV.21.-** Efecto de la densidad de peces y composición de la dieta sobre la actividad de enzimas antioxidantes y concentración de MDA en hígado tras un período experimental de 21 días.

| <b>DIETA</b>       | <b>Densidad de peces (g/l)</b> | <b>SOD (U/mg prot.)</b>  | <b>Catalasa (μmol/min/mg prot.)</b> | <b>GPX (nmol/min/mg prot.)</b> | <b>GR (nmol/min/mg prot.)</b> | <b>G6PDH (nmol/min/mg prot.)</b> | <b>MDA (nmol /g tejido)</b> |
|--------------------|--------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 22.39 ± 2.3 <sup>b</sup> | 405.7 ± 29.9                        | 105.4 ± 9.3 <sup>a x</sup>     | 26.50 ± 2.3 <sup>a</sup>      | 412.6 ± 70.8 <sup>ab</sup>       | 16.46 ± 2.5                 |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 16.62 ± 1.7 <sup>a</sup> | 392.9 ± 36.9                        | 180.2 ± 21.9 <sup>b</sup>      | 75.31 ± 7.6 <sup>c x</sup>    | 375.6 ± 3.9 <sup>a</sup>         | 25.98 ± 3.5 <sup>x</sup>    |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 14.94 ± 1.9 <sup>a</sup> | 425.7 ± 37.6                        | 113.8 ± 14.3 <sup>a</sup>      | 40.86 ± 3.8 <sup>b</sup>      | 505.7 ± 27.6 <sup>bc</sup>       | 20.87 ± 1.5 <sup>x</sup>    |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 15.72 ± 0.3 <sup>a</sup> | 385.2 ± 30.7                        | 135.3 ± 8.6 <sup>ab</sup>      | 29.72 ± 1.5 <sup>ab</sup>     | 599.5 ± 30.7 <sup>c x</sup>      | 22.12 ± 2.3 <sup>x</sup>    |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>100</b>                     | 14.60 ± 1.7 <sup>a</sup> | 362.1 ± 47.0 <sup>x</sup>           | 151.8 ± 17.7 <sup>ab</sup>     | 23.60 ± 2.6 <sup>a</sup>      | 344.2 ± 1.1 <sup>a x</sup>       | 15.03 ± 3.9                 |
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 17.34 ± 0.6              | 493.3 ± 52.9                        | 149.5 ± 0.8                    | 22.81 ± 2.6                   | 422.7 ± 56.7 <sup>b</sup>        | 17.31 ± 2.8                 |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 17.77 ± 1.0              | 510.8 ± 10.8                        | 129.3 ± 16.8                   | 29.78 ± 5.1                   | 410.1 ± 41.1 <sup>b</sup>        | 17.14 ± 1.9                 |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 20.36 ± 3.9              | 522.0 ± 63.7                        | 159.1 ± 27.7                   | 33.20 ± 5.1                   | 559.3 ± 30.4 <sup>c</sup>        | 15.79 ± 1.4                 |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 24.23 ± 3.8              | 591.9 ± 78.6                        | 155.5 ± 9.1                    | 35.55 ± 3.3                   | 383.6 ± 6.2 <sup>b</sup>         | 14.19 ± 0.6                 |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>20</b>                      | 23.24 ± 4.3              | 527.3 ± 42.2                        | 123.0 ± 19.6                   | 19.33 ± 3.9                   | 219.4 ± 3.1 <sup>a</sup>         | 16.46 ± 1.9                 |

<sup>a, b, y c</sup> : Diferencias entre dietas para una misma densidad. <sup>x</sup>: Diferencias para una misma dieta a ambas densidades. Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la media ± error estándar (n = 6, siendo para GPX, GR y G6PDH n = 3).

**Tabla IV.22.-** Efecto de la densidad de peces y composición de la dieta sobre la actividad de enzimas antioxidantes y concentración de MDA en hígado tras un período experimental de 42 días.

| <b>DIETA</b>       | <b>Densidad de peces (g/l)</b> | <b>SOD (U/mg prot.)</b>      | <b>Catalasa (μmol/min/mg prot.)</b> | <b>GPX (nmol/min/mg prot.)</b> | <b>GR (nmol/min/mg prot.)</b> | <b>G6PDH (nmol/min/mg prot.)</b> | <b>MDA (nmol/g tejido)</b>  |
|--------------------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 37.43 ± 3.4 <sup>a x *</sup> | 479.9 ± 49.6 <sup>b</sup>           | 79.60 ± 9.2 <sup>*</sup>       | 16.92 ± 0.7 <sup>b *</sup>    | 153.3 ± 19.7 <sup>*</sup>        | 14.74 ± 0.4 <sup>a x</sup>  |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 50.73 ± 1.0 <sup>b x *</sup> | 488.9 ± 14.6 <sup>b x</sup>         | 74.71 ± 5.9 <sup>*</sup>       | 18.36 ± 3.4 <sup>b *</sup>    | 147.3 ± 19.9 <sup>*</sup>        | 22.71 ± 0.4 <sup>b</sup>    |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 59.57 ± 3.4 <sup>c *</sup>   | 360.7 ± 9.2 <sup>a x</sup>          | 73.13 ± 8.6 <sup>*</sup>       | 10.86 ± 1.1 <sup>a *</sup>    | 124.5 ± 0.6 <sup>x *</sup>       | 20.65 ± 4.3 <sup>ab</sup>   |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 51.73 ± 2.3 <sup>b *</sup>   | 440.4 ± 9.5 <sup>ab x</sup>         | 65.88 ± 1.5 <sup>*</sup>       | 10.77 ± 0.2 <sup>a *</sup>    | 140.8 ± 3.8 <sup>*</sup>         | 26.51 ± 1.0 <sup>b</sup>    |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>100</b>                     | 48.73 ± 1.2 <sup>b *</sup>   | 438.5 ± 23.5 <sup>ab</sup>          | 58.64 ± 7.8 <sup>*</sup>       | 11.34 ± 0.8 <sup>a x *</sup>  | 162.3 ± 30.2 <sup>*</sup>        | 21.28 ± 2.7 <sup>ab x</sup> |
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 56.80 ± 1.9 <sup>b *</sup>   | 538.8 ± 52.6 <sup>b</sup>           | 95.40 ± 11.8 <sup>*</sup>      | 15.55 ± 1.8 <sup>bc</sup>     | 166.7 ± 8.5 <sup>*</sup>         | 18.04 ± 0.6                 |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 60.80 ± 0.4 <sup>b *</sup>   | 356.7 ± 5.1 <sup>a *</sup>          | 77.01 ± 7.3 <sup>*</sup>       | 20.12 ± 2.8 <sup>c</sup>      | 167.0 ± 28.3 <sup>*</sup>        | 26.33 ± 4.2 <sup>*</sup>    |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 51.47 ± 1.6 <sup>a *</sup>   | 497.0 ± 19.2 <sup>b</sup>           | 86.27 ± 9.1 <sup>*</sup>       | 14.25 ± 1.0 <sup>b *</sup>    | 199.7 ± 20.5 <sup>*</sup>        | 27.89 ± 4.1 <sup>*</sup>    |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 50.10 ± 1.3 <sup>a *</sup>   | 573.1 ± 31.8 <sup>b</sup>           | 80.38 ± 3.9 <sup>*</sup>       | 12.14 ± 0.5 <sup>ab *</sup>   | 128.7 ± 17.4 <sup>*</sup>        | 25.98 ± 3.8 <sup>*</sup>    |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>20</b>                      | 52.44 ± 0.7 <sup>a *</sup>   | 353.7 ± 44.1 <sup>a *</sup>         | 67.49 ± 2.8 <sup>*</sup>       | 8.98 ± 0.2 <sup>a</sup>       | 119.8 ± 7.7 <sup>*</sup>         | 33.22 ± 2.2 <sup>*</sup>    |

<sup>a, b, y c</sup> : Diferencias entre dietas para una misma densidad. <sup>x</sup>: Diferencias para una misma dieta a ambas densidades. \*: diferencias entre las medidas realizadas a los 21 y 42 días para una misma situación experimental. Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la media ± error estándar (n = 6, siendo para GPX y GR n = 4).

Con relación al efecto del tipo de dieta consumida, el patrón de comportamiento de la SOD a los 21 días muestra, a alta densidad, valores de actividad significativamente más altos en los animales -E-HUFA, mientras que a los 42 días este grupo presenta los valores de actividad más bajos, observándose los más altos en el +E-HUFA. En condiciones de baja densidad, al contrario de la tendencia observada a los 21 días, al final del experimento los grupos carentes de vitamina E incrementaron sus valores de actividad significativamente. En cuanto a la actividad catalasa, no se observa ninguna influencia de la dieta a los 21 días, estableciéndose al final del experimento (42 días) una mayor actividad en aquellos peces alimentados con las dietas carentes de vitamina E en condiciones de alta densidad, mientras que, a baja densidad, los grupos alimentados con dietas deficientes en vitaminas y ricas en HUFAs, presentan valores de actividad significativamente más bajos. La glutatión reductasa muestra, a los 21 días, valores de actividad elevados en el grupo -E+HUFA, en condiciones de alta densidad, observándose al final del experimento una tendencia similar con independencia de la densidad. Este mismo grupo tiende a presentar, a los 21 días, los valores más elevados de actividad glutatión peroxidasa en condiciones de alta densidad. Al final del experimento, el grupo -C+E+HUFA muestra, aunque no de manera significativa, los valores más bajos de actividad glutatión peroxidasa, con independencia de la densidad. El efecto de la dieta sobre la actividad G6PDH sólo se pone de manifiesto de manera significativa a los 21 días, observándose en el grupo +E+HUFA los valores más elevados de actividad a alta densidad. A baja densidad, el grupo +E-HUFA presenta los valores más altos de actividad, mientras que los -C+E+HUFA muestran los más bajos. Esta tendencia, a baja densidad, se mantiene a los 48 días, aunque no de manera significativa.

En cuanto a los niveles de MDA, no se aprecia ninguna influencia significativa de la dieta, aunque al final del experimento se muestran valores inferiores en los grupos -E-HUFA con independencia de la densidad. Éste es el único parámetro que no presenta una influencia conjunta de la densidad y la dieta en sus valores. Tanto la densidad como la dieta ejercen, de manera independiente, una influencia sobre los parámetros estudiados, con excepción de la glutatión peroxidasa que, sin embargo, presentó un efecto conjunto de ambas variables (anexo Tablas IV.21. y IV.22.).

**Anexo Tablas IV.21. y IV.22.-** ANOVA de dos vías para la densidad y la dieta en los distintos parámetros medidos.

|                  | Período experimental (días) | SOD   | Catalasa | GPX  | GR    | G6PDH | MDA  |
|------------------|-----------------------------|-------|----------|------|-------|-------|------|
| DIETA            | 21                          | n.s   | n.s      | n.s  | 0.001 | 0.001 | n.s  |
|                  | 42                          | 0.001 | 0.01     | n.s  | 0.001 | n.s   | 0.01 |
| DENSIDAD         | 21                          | 0.05  | 0.001    | n.s  | 0.001 | 0.05  | 0.05 |
|                  | 42                          | 0.001 | n.s      | n.s  | n.s   | n.s   | 0.01 |
| DIETA * DENSIDAD | 21                          | n.s   | n.s      | 0.05 | 0.001 | 0.01  | n.s  |
|                  | 42                          | 0.001 | 0.001    | n.s  | n.s   | n.s   | n.s  |

n.s: no existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

## RIÑÓN

Los análisis de actividad enzimática en riñón, a los 21 (Tabla IV.23.) y 42 días (Tabla IV.24.) del experimento, muestran un aumento generalizado de la actividad SOD al final del experimento, que con independencia de la densidad, fue significativo en todos los grupos de animales. Por el contrario, la catalasa muestra, a los 42 días, un descenso significativo de su actividad en los grupos -C+E+HUFA, +E+HUFA y +E-HUFA a alta densidad, observándose la misma respuesta para estos dos últimos grupos a baja densidad. Los animales alimentados con dieta -E+HUFA a baja densidad son los únicos que muestran un incremento significativo de actividad a los 42 días. La actividad glutatión peroxidasa presenta un descenso general al final del experimento, aunque no fue significativo en los grupos -E+HUFA y +E+HUFA sometidos a alta densidad. Un comportamiento similar se pone de manifiesto en la actividad glutatión reductasa, que es significativo en la mayoría de los grupos a baja densidad, excepto en los +E+HUFA. Por el contrario, la actividad G6PDH sufre, al final del experimento, un incremento significativo en la mayoría de los grupos en condiciones de baja densidad,

excepto en los -E-HUFA. A alta densidad, sólo se observa un incremento significativo en los grupos +E-HUFA y +E+HUFA.

En lo que respecta al efecto de la densidad, no se observa ninguna influencia clara sobre la actividad catalasa, superóxido dismutasa o glutatión reductasa, aunque en estas dos últimas se aprecia, a los 21 días, valores significativamente más elevados en los animales alimentados con dietas -E-HUFA a baja densidad. A los 42 días, el grupo +E-HUFA presenta valores de actividad SOD más elevados a baja densidad, observándose para la glutatión peroxidasa un comportamiento similar en el grupo -E-HUFA. Con relación a la glutatión reductasa, al final del experimento, los valores sufren un descenso significativo en los grupos -E+HUFA y +E-HUFA mantenidos a baja densidad. Con respecto a la enzima G6PDH, se observa una mayor actividad en los animales sometidos a alta densidad, mostrándose estas diferencias significativas a los 21 días y al final del experimento en el grupo +E+HUFA.

En líneas generales, el modelo estadístico general revela cierta influencia de la densidad en todas los parámetros medidos excepto en la actividad catalasa (anexo Tablas IV.23. y IV.24.).

Con relación al efecto de la dieta, la SOD muestra a lo largo del experimento (21 y 42 días) que existe un efecto de esta variable sobre su actividad en condiciones de alta densidad. A los 21 días los grupos deficientes en vitamina E (-E-HUFA y -E+HUFA) presentaron los valores más bajos, mientras que los más altos se dieron en el -C+E+HUFA. A los 42 días, el valor de actividad más bajo lo presentó el grupo +E-HUFA, mientras que las dietas carentes de vitamina E en este caso mostraron los valores más elevados de actividad.

La actividad catalasa presenta al final del experimento, y con independencia de la densidad, valores de actividad estadísticamente superiores en dietas -E+HUFA, observándose una disminución de la actividad en los grupos que consumieran dietas suplementadas con vitamina E y C. En cuanto a las actividades glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, ambas enzimas muestran, a los 21 días, un comportamiento similar

en condiciones de baja densidad, presentando el grupo +E-HUFA valores de actividad significativamente más altos al resto. En condiciones de alta densidad, no se encontraron diferencias significativas con relación a estas dos enzimas, si bien la glutatión reductasa también mostró cierta tendencia a presentar valores más altos de actividad en los grupos +E-HUFA a los 21 y 42 días.

La actividad G6PDH muestra a lo largo del experimento valores altos de actividad en peces alimentados con la dieta -E-HUFA con independencia de la densidad, siendo este comportamiento estadísticamente significativo los 21 días. En esta misma fase del experimento se muestra que, después del grupo -E-HUFA, que presentó los valores más altos de actividad, los animales que consumieron la dieta -E+HUFA mostraron, a ambas densidades, valores elevados de actividad con relación a los tres restantes grupos (+E-HUFA, +E+HUFA y -C+E+HUFA).

**Tabla IV.23.-** Efecto de la densidad de peces y composición de la dieta sobre la actividad de enzimas antioxidantes en riñón tras un período experimental de 21 días.

| <b>DIETA</b>       | <b>Densidad de peces (g/l)</b> | <b>SOD (U/mg prot.)</b>    | <b>Catalasa (μmol/min/mg prot.)</b> | <b>GPX (nmol/min/mg prot.)</b> | <b>GR (nmol/min/mg prot.)</b> | <b>G6PDH (nmol/min/mg prot.)</b> |
|--------------------|--------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 10.37 ± 1.9 <sup>a x</sup> | 67.18 ± 7.8                         | 147.6 ± 10.3                   | 20.21 ± 1.7 <sup>x</sup>      | 61.73 ± 4.9 <sup>c x</sup>       |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 9.57 ± 1.0 <sup>a</sup>    | 71.14 ± 7.7                         | 126.6 ± 10.2                   | 27.27 ± 2.7                   | 45.23 ± 5.1 <sup>b x</sup>       |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 11.50 ± 0.5 <sup>ab</sup>  | 77.88 ± 7.1                         | 132.9 ± 3.1                    | 34.05 ± 4.2                   | 30.25 ± 0.3 <sup>a x</sup>       |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 11.83 ± 0.8 <sup>ab</sup>  | 71.18 ± 3.1                         | 129.6 ± 10.7                   | 28.10 ± 2.9                   | 23.50 ± 0.8 <sup>a x</sup>       |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>100</b>                     | 14.77 ± 1.4 <sup>b</sup>   | 78.44 ± 2.6                         | 134.9 ± 0.4                    | 30.55 ± 2.5                   | 36.19 ± 5.2 <sup>ab x</sup>      |
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 14.73 ± 1.0                | 67.66 ± 4.4                         | 153.9 ± 7.4 <sup>ab</sup>      | 31.93 ± 1.3 <sup>a</sup>      | 40.80 ± 0.8 <sup>c</sup>         |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 12.21 ± 1.1                | 61.69 ± 4.3                         | 140.7 ± 9.3 <sup>a</sup>       | 31.24 ± 1.7 <sup>a</sup>      | 18.92 ± 0.2 <sup>b</sup>         |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 13.30 ± 1.5                | 77.06 ± 5.2                         | 178.0 ± 6.2 <sup>b</sup>       | 38.71 ± 1.0 <sup>b</sup>      | 14.60 ± 1.8 <sup>ab</sup>        |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 13.01 ± 1.3                | 75.77 ± 5.0                         | 142.0 ± 3.7 <sup>a</sup>       | 28.91 ± 1.5 <sup>a</sup>      | 12.17 ± 1.3 <sup>a</sup>         |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>20</b>                      | 12.26 ± 0.3                | 62.41 ± 7.6                         | 162.7 ± 11.6 <sup>ab</sup>     | 31.84 ± 1.5 <sup>a</sup>      | 13.20 ± 2.4 <sup>a</sup>         |

<sup>a, b, y c</sup> : Diferencias entre dietas para una misma densidad. <sup>x</sup>: Diferencias para una misma dieta a ambas densidades. Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la media ± error estándar (n = 6, siendo para GPX, GR y G6PDH n = 3).



**Tabla IV.24.-** Efecto de la densidad de peces y composición de la dieta sobre la actividad de enzimas antioxidantes en riñón tras un período experimental de 42 días.

| <b>DIETA</b>       | <b>Densidad de peces (g/l)</b> | <b>SOD (U/mg prot.)</b>      | <b>Catalasa (μmol/min/mg prot.)</b> | <b>GPX (nmol/min/mg prot.)</b> | <b>GR (nmol/min/mg prot.)</b> | <b>G6PDH (nmol/min/mg prot.)</b> |
|--------------------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 58.17 ± 3.7 <sup>b</sup> *   | 58.13 ± 2.9 <sup>ab</sup>           | 74.23 ± 1.8 <sup>x</sup> *     | 22.92 ± 1.7                   | 56.87 ± 4.8                      |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 51.00 ± 4.5 <sup>b</sup> *   | 66.10 ± 3.8 <sup>b</sup>            | 94.76 ± 5.7                    | 22.71 ± 0.6 <sup>x</sup>      | 42.93 ± 3.5                      |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 29.55 ± 2.2 <sup>a x</sup> * | 48.27 ± 0.9 <sup>a</sup> *          | 85.30 ± 9.8 *                  | 29.05 ± 1.3 <sup>x</sup>      | 53.60 ± 4.0 *                    |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 43.60 ± 3.0 <sup>ab</sup> *  | 49.23 ± 5.5 <sup>a</sup> *          | 99.42 ± 4.3                    | 23.32 ± 1.6                   | 52.10 ± 3.9 <sup>x</sup> *       |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>100</b>                     | 42.43 ± 8.5 <sup>ab</sup> *  | 61.00 ± 5.4 <sup>ab</sup> *         | 93.83 ± 1.1 <sup>x</sup> *     | 23.85 ± 1.4                   | 42.70 ± 5.0                      |
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 44.13 ± 9.4 *                | 59.00 ± 6.4 <sup>ab</sup>           | 88.10 ± 0.4 *                  | 22.72 ± 2.7 *                 | 48.83 ± 2.9 <sup>b</sup>         |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 40.10 ± 3.1 *                | 76.83 ± 1.2 <sup>c</sup> *          | 85.88 ± 3.4 *                  | 16.37 ± 0.9 *                 | 34.30 ± 2.6 <sup>a</sup> *       |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 44.23 ± 1.5 *                | 47.00 ± 2.6 <sup>a</sup> *          | 86.97 ± 2.6 *                  | 19.66 ± 0.4 *                 | 48.20 ± 2.9 <sup>b</sup> *       |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 44.33 ± 4.6 *                | 55.67 ± 2.0 <sup>ab</sup> *         | 85.66 ± 8.0 *                  | 23.19 ± 0.4                   | 36.30 ± 1.9 <sup>a</sup> *       |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>20</b>                      | 34.87 ± 3.0 *                | 63.37 ± 6.1 <sup>b</sup>            | 78.62 ± 0.8 *                  | 18.96 ± 2.3 *                 | 34.50 ± 4.9 <sup>a</sup> *       |

<sup>a, b, y c</sup> : Diferencias entre dietas para una misma densidad. <sup>x</sup>: Diferencias para una misma dieta a ambas densidades. \*: diferencias entre las medidas realizadas a los 21 y 42 días para una misma situación experimental. Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la media ± error estándar (n = 6, siendo para GPX, GR y G6PDH n = 4).

El análisis estadístico global revela que la actividad glutathion reductasa es la única que se ve afectada por la densidad y la dieta, y por ambos parámetros, de manera conjunta, al final del experimento. La actividad SOD muestra una influencia de la densidad, y de ambos parámetros en conjunto, a los 21 días. Las actividades glutathion peroxidasa y catalasa sólo se encuentran influidas por la densidad y la dieta respectivamente (anexo Tablas IV.23. y IV.24.). Por último, las influencias previamente observadas de la densidad y la dieta sobre la actividad enzimática G6PDH no pusieron de manifiesto un efecto combinado de ambas sobre los parámetros medidos (anexo Tablas IV.23 y IV.24).

**Anexo Tablas IV.23. y IV.24.-** ANOVA de dos vías para la densidad y la dieta en los distintos parámetros medidos.

---

|                  | <b>Período experimental</b><br>(días) | <b>SOD</b> | <b>Catalasa</b> | <b>GPX</b> | <b>GR</b> | <b>G6PDH</b> |
|------------------|---------------------------------------|------------|-----------------|------------|-----------|--------------|
| DIETA            | 21                                    | n.s        | n.s             | n.s        | 0.01      | 0.001        |
|                  | 42                                    | n.s        | 0.001           | n.s        | n.s       | 0.01         |
| DENSIDAD         | 21                                    | 0.05       | n.s             | 0.001      | 0.01      | 0.001        |
|                  | 42                                    | n.s        | n.s             | n.s        | 0.001     | 0.001        |
| DIETA * DENSIDAD | 21                                    | 0.05       | n.s             | n.s        | n.s       | n.s          |
|                  | 42                                    | n.s        | n.s             | n.s        | 0.05      | n.s          |

---

n.s: no existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

### *GLÓBULOS ROJOS*

La actividad superóxido dismutasa, catalasa, glutathion peroxidasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, así como los niveles de MDA en glóbulos rojos, se exponen en las Tablas IV.25. y IV.26., que incluyen los resultados a los 21 y 42 días del experimento respectivamente.

El análisis estadístico revela que, la actividad SOD presenta una tendencia a disminuir a los 42 días en los animales sometidos a alta densidad, siendo sólo significativa en los grupos -E+HUFA y -C+E+HUFA. También se pone de manifiesto un descenso significativo de su actividad en los animales alimentados con dietas -E-HUFA en condiciones de baja densidad. La actividad catalasa muestra un incremento generalizado al final del experimento, que es significativo en todos los casos con excepción de los grupos +E+HUFA a alta densidad y -E+HUFA a baja densidad. Un comportamiento similar presenta la actividad glutathion peroxidasa, siendo también significativo en todos los casos excepto en -E+HUFA a baja densidad. La actividad G6PDH muestra, al final del experimento, un descenso significativo de actividad en los grupos sometidos a alta densidad alimentados con dietas -E+HUFA y +E-HUFA. A baja densidad el grupo +E-HUFA es el único que presenta un descenso significativo en los valores de actividad. Los niveles de MDA aumentan significativamente en el grupo -E+HUFA, con independencia de la densidad, no observándose cambios en el resto de los grupos.

Con respecto al efecto de la densidad, a los 42 días, se observa que aquellos grupos alimentados con dietas ricas en HUFAs, al ser sometidos a alta densidad, presentan valores más bajos de actividad SOD. La actividad catalasa muestra, a los 21 días, una tendencia a presentar valores más elevados a alta densidad en los grupos -E-HUFA, +E-HUFA y +E+HUFA, que es significativa para el primero. A los 42 días la tendencia a presentar valores más elevados de actividad a alta densidad se observa en los grupos -E-HUFA, -E+HUFA, +E-HUFA y -C+E+HUFA, aunque sólo es significativa en este último grupo. En cuanto a la actividad G6PDH, glutathion peroxidasa y a los niveles de MDA, no se encuentra ningún efecto significativo de la densidad sobre este parámetro, aunque, a los 21, se observa un incremento significativo de actividad, a alta densidad, para la glutathion peroxidasa en el grupo +E+HUFA y para la G6PDH en el grupo -C+E+HUFA. Por el contrario, a los 42 días, la actividad G6PDH aumentó significativamente en los grupos -E+HUFA y +E+HUFA en condiciones de baja densidad (anexo Tablas IV.25. y IV.26.).

Con relación al efecto de la dieta, el análisis estadístico revela que, la actividad SOD muestra diferencias significativas en los grupos sometidos a baja densidad. A los 21 días, el grupo -E+HUFA muestra los valores más altos de actividad, mientras que los animales alimentados con dietas sin deficiencias vitamínicas (+E-HUFA y +E+HUFA) presentan los valores significativamente más bajos, encontrándose estos, a los 48 días, en los animales alimentados con dietas -HUFA. En cuanto a la actividad catalasa, a los 21 días existe cierta influencia de la dieta, presentando el grupo -C+E+HUFA los valores más bajos de actividad, a alta densidad, y el grupo -E+HUFA los valores más altos de actividad a baja densidad, no observándose influencia de la dieta al final del período experimental. Con relación a la actividad glutatión peroxidasa, sólo se observan diferencias significativas, asociadas al tipo de dieta, a los 21 días y en condiciones de baja densidad, donde el grupo de animales -E+HUFA presenta valores de actividad más elevados con respecto al resto. El efecto de la dieta en la actividad G6PDH refleja un incremento generalizado de actividad en los grupos -E+HUFA a lo largo del experimento y a ambas densidades, aunque sólo es significativo a los 48 días en condiciones de baja densidad. A este incremento se suma el observado a alta densidad, aunque no de manera significativa en los grupos -C+E+HUFA. Por otro lado, cabe destacar que los niveles de MDA medidos presentan, en los animales que consumieron la dieta -E+HUFA, un patrón de comportamiento similar al de la SOD, glutatión peroxidasa y G6PDH que, en general, a lo largo de todo el experimento y con independencia de la densidad, muestra valores más elevados en dicho grupo.

**Tabla IV.25.-** Efecto de la densidad de peces y composición de la dieta sobre la actividad de enzimas antioxidantes y concentración de MDA en glóbulos rojos tras un período experimental de 21 días.

| <b>DIETA</b>       | <b>Densidad de peces (g/l)</b> | <b>SOD (U/mg prot.)</b>  | <b>Catalasa (μmol/min/mg prot.)</b> | <b>GPX (nmol/min/mg prot.)</b> | <b>G6PDH (nmol/min/mg prot.)</b> | <b>MDA (nm/g tejido)</b>  |
|--------------------|--------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 1.11 ± 0.10              | 60.86 ± 4.7 <sup>b x</sup>          | 133.5 ± 4.9                    | 14.69 ± 2.8                      | 19.31 ± 1.8 <sup>b</sup>  |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 1.21 ± 0.10              | 61.73 ± 5.9 <sup>b</sup>            | 117.6 ± 13.4                   | 21.51 ± 1.7                      | 21.63 ± 3.1 <sup>b</sup>  |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 1.06 ± 0.10              | 50.23 ± 4.0 <sup>ab</sup>           | 117.5 ± 6.1                    | 15.97 ± 1.2                      | 8.86 ± 1.1 <sup>a</sup>   |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 0.90 ± 0.03              | 62.03 ± 7.3 <sup>b</sup>            | 151.3 ± 10.8 <sup>x</sup>      | 14.60 ± 1.5                      | 12.63 ± 1.8 <sup>a</sup>  |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>100</b>                     | 1.08 ± 0.01 <sup>x</sup> | 38.48 ± 2.3 <sup>a</sup>            | 128.8 ± 3.2                    | 19.61 ± 1.5 <sup>x</sup>         | 10.36 ± 0.6 <sup>a</sup>  |
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 1.15 ± 0.01 <sup>b</sup> | 42.21 ± 2.4 <sup>a</sup>            | 120.5 ± 6.4 <sup>a</sup>       | 15.74 ± 2.0                      | 15.24 ± 1.0 <sup>b</sup>  |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 1.53 ± 0.10 <sup>c</sup> | 65.74 ± 0.8 <sup>b</sup>            | 149.8 ± 3.7 <sup>b</sup>       | 18.31 ± 2.4                      | 21.71 ± 2.0 <sup>c</sup>  |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 0.77 ± 0.01 <sup>a</sup> | 43.11 ± 1.8 <sup>a</sup>            | 112.1 ± 1.8 <sup>a</sup>       | 16.61 ± 0.1                      | 12.42 ± 1.3 <sup>ab</sup> |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 0.89 ± 0.02 <sup>a</sup> | 47.84 ± 5.2 <sup>a</sup>            | 121.5 ± 6.0 <sup>a</sup>       | 14.17 ± 1.7                      | 11.30 ± 1.1 <sup>ab</sup> |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>20</b>                      | 1.14 ± 0.01 <sup>b</sup> | 46.46 ± 3.5 <sup>a</sup>            | 120.1 ± 4.9 <sup>a</sup>       | 14.23 ± 0.2                      | 10.46 ± 1.0 <sup>a</sup>  |

a, b, y c : Diferencias entre dietas para una misma densidad. x: Diferencias para una misma dieta a ambas densidades. Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la media ± error estándar (n = 6, siendo para G6PDH n = 3).

**Tabla IV.26.-** Efecto de la densidad de peces y composición de la dieta sobre la actividad de enzimas antioxidantes y concentración de MDA en glóbulos rojos tras un período experimental de 42 días.

| <b>DIETA</b>       | <b>Densidad de peces (g/l)</b> | <b>SOD (U/mg prot.)</b>    | <b>Catalasa (μmol/min/mg prot.)</b> | <b>GPX (nmol/min/mg prot.)</b> | <b>G6PDH (nmol/min/mg prot.)</b> | <b>MDA (nmol /g tejido)</b> |
|--------------------|--------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 0.72 ± 0.10                | 103.8 ± 8.4 *                       | 177.0 ± 6.1 *                  | 13.67 ± 1.5                      | 14.31 ± 2.0 <sup>a</sup>    |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 0.65 ± 0.10 <sup>x</sup> * | 94.08 ± 1.9 *                       | 195.2 ± 2.8 *                  | 14.03 ± 0.2 <sup>x</sup> *       | 25.39 ± 4.1 <sup>b</sup>    |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 0.75 ± 0.02                | 92.30 ± 4.0 *                       | 185.2 ± 1.9 *                  | 12.47 ± 0.2 *                    | 16.43 ± 3.2 <sup>a</sup>    |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>100</b>                     | 0.75 ± 0.06 <sup>x</sup>   | 81.59 ± 3.7 <sup>x</sup>            | 190.3 ± 5.9 *                  | 12.19 ± 0.3 <sup>x</sup>         | 16.47 ± 1.0 <sup>a</sup>    |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>100</b>                     | 0.79 ± 0.10 <sup>x</sup> * | 96.22 ± 1.8 <sup>x</sup> *          | 179.9 ± 7.5 *                  | 15.54 ± 0.9                      | 12.70 ± 1.1 <sup>a</sup>    |
| <b>-E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 0.72 ± 0.03 <sup>a</sup> * | 80.74 ± 9.1 *                       | 173.6 ± 8.6 *                  | 12.99 ± 0.5 <sup>a</sup>         | 12.15 ± 1.0 <sup>a</sup>    |
| <b>-E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 1.33 ± 0.02 <sup>b</sup>   | 78.15 ± 5.8                         | 193.2 ± 14.3                   | 20.13 ± 0.4 <sup>c</sup>         | 27.77 ± 0.7 <sup>b</sup> *  |
| <b>+E -HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 0.87 ± 0.09 <sup>a</sup>   | 86.51 ± 7.1 *                       | 185.3 ± 8.8 *                  | 12.75 ± 0.6 <sup>a</sup> *       | 11.00 ± 0.8 <sup>a</sup>    |
| <b>+E +HUFA</b>    | <b>20</b>                      | 1.14 ± 0.10 <sup>b</sup>   | 96.67 ± 1.3 *                       | 184.5 ± 3.9 *                  | 16.27 ± 1.1 <sup>b</sup>         | 14.42 ± 1.9 <sup>a</sup>    |
| <b>-C +E +HUFA</b> | <b>20</b>                      | 1.12 ± 0.10 <sup>b</sup>   | 76.67 ± 0.3 *                       | 207.8 ± 9.9 *                  | 15.30 ± 0.6 <sup>b</sup>         | 13.48 ± 1.2 <sup>a</sup>    |

<sup>a, b, y c</sup> : Diferencias entre dietas para una misma densidad. <sup>x</sup>: Diferencias para una misma dieta a ambas densidades. \*: diferencias entre las medidas realizadas a los 21 y 42 días para una misma situación experimental Nivel de significación ( $P < 0.05$ ). Los valores reflejan la media ± error estándar (n = 6, siendo para G6PDH n = 3).

**Anexo Tablas IV.25. y IV.26.-** ANOVA de dos vías para la densidad y la dieta en los distintos parámetros medidos.

|                  | Período<br>experimental<br>(días) | SOD   | Catalasa | GPX  | G6PDH | MDA   |
|------------------|-----------------------------------|-------|----------|------|-------|-------|
| DIETA            | 21                                | 0.001 | 0.01     | 0.05 | 0.05  | 0.001 |
|                  | 42                                | 0.05  | n.s      | n.s  | 0.001 | 0.001 |
| DENSIDAD         | 21                                | n.s   | 0.05     | n.s  | n.s   | n.s   |
|                  | 42                                | 0.001 | n.s      | n.s  | 0.001 | n.s   |
| DENSIDAD * DIETA | 21                                | 0.05  | 0.05     | 0.01 | n.s   | n.s   |
|                  | 42                                | 0.001 | n.s      | n.s  | 0.001 | n.s   |

n.s: no existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

El análisis global pone de manifiesto un efecto de la dieta sobre la actividad SOD, glutatión peroxidasa, G6PDH y los niveles de MDA. Por otro lado, la actividad catalasa se ve influida por la densidad de animales al inicio del experimento, manifestándose una influencia más significativa de este parámetro sobre la actividad SOD y G6PDH al final del experimento. Finalmente, el estudio del efecto conjunto de ambas variables revela que fue significativo en todos los parámetros medidos excepto en los niveles de MDA (anexo Tablas IV.25. y IV.26.).

El cálculo del coeficiente de correlación de Pearson entre la variable MDA en sangre y el hematocrito o la hemoglobina muestra, de manera significativa, que tanto a alta como a baja densidad ambos parámetros hematológicos están inversamente relacionadas con los niveles de MDA (Tabla IV.27., Figuras IV.3. y IV.4.). Los valores del coeficiente obtenidos muestran que en todos los casos la correlación fue significativa excepto para el MDA y la hemoglobina a alta densidad.

**Tabla IV.27.** Coeficiente de correlación de Pearson entre las variables MDA y hematocrito o hemoglobina en glóbulos rojos.

|                        | A             | B              |
|------------------------|---------------|----------------|
|                        | MDA           | MDA            |
| <b>HEMATOCRITO</b>     |               |                |
| Correlación de Pearson | <b>-,730*</b> | <b>-,866**</b> |
| Sig.                   | ,016          | ,001           |
| <b>HEMOGLOBINA</b>     |               |                |
| Correlación de Pearson | -,534         | <b>-,752*</b>  |
| Sig.                   | ,112          | ,012           |

\* La correlación es significativa al nivel 0,05; \*\* La correlación es significativa al nivel 0,001. Sig. significación. A: En condiciones de alta densidad. B: En condiciones de baja densidad.

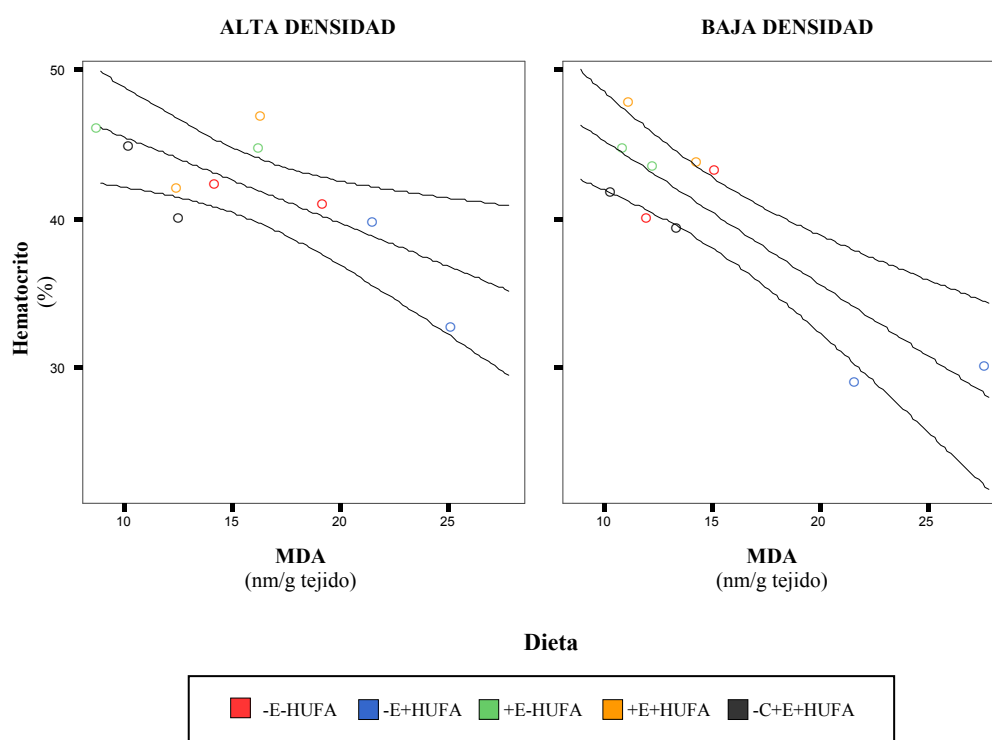


Figura IV.3.- Regresión lineal entre las variables hematocrito y MDA en sangre a ambas densidades de peces, donde se muestra el intervalo de predicción de la media con un 95% de confianza.



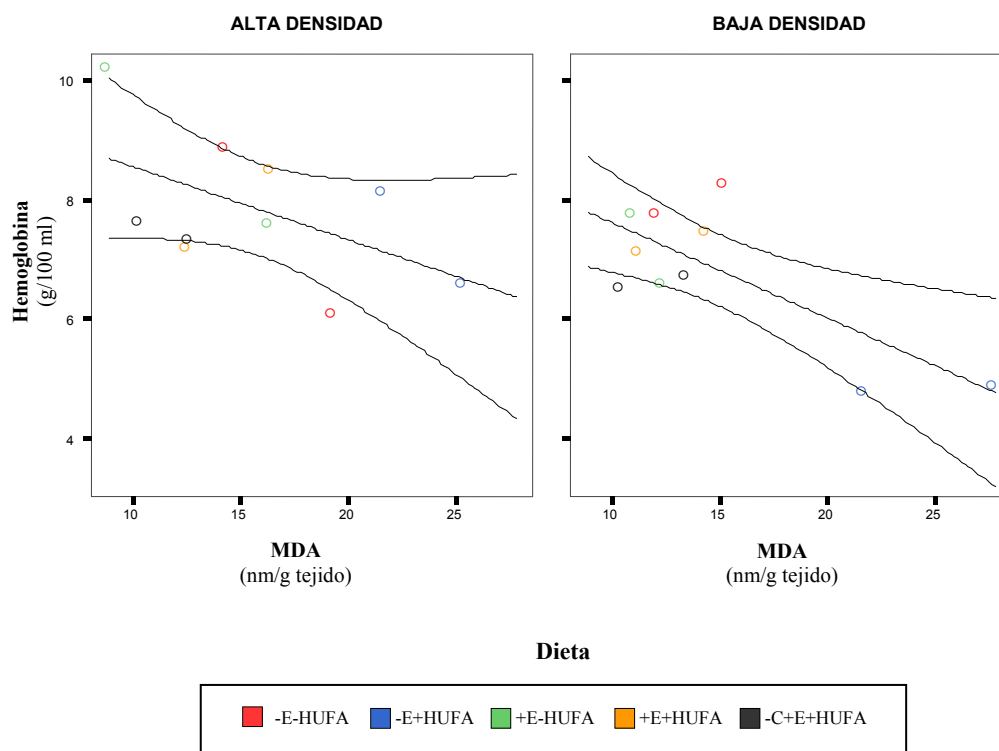


Figura IV.4. Regresión lineal entre las variables hemoglobina y MDA en sangre a ambas densidades de peces donde se muestra el intervalo de predicción de la media con un 95% de confianza.

### 2.11.2. Formas isoenzimáticas de la SOD en geles de poliacrilamida

Los resultados obtenidos tras realizar el estudio de actividad SOD en geles de poliacrilamida en hígado, riñón y glóbulos rojos de trucha, para cada situación experimental, se muestran en las Figuras IV.5., IV.6. y IV.7.

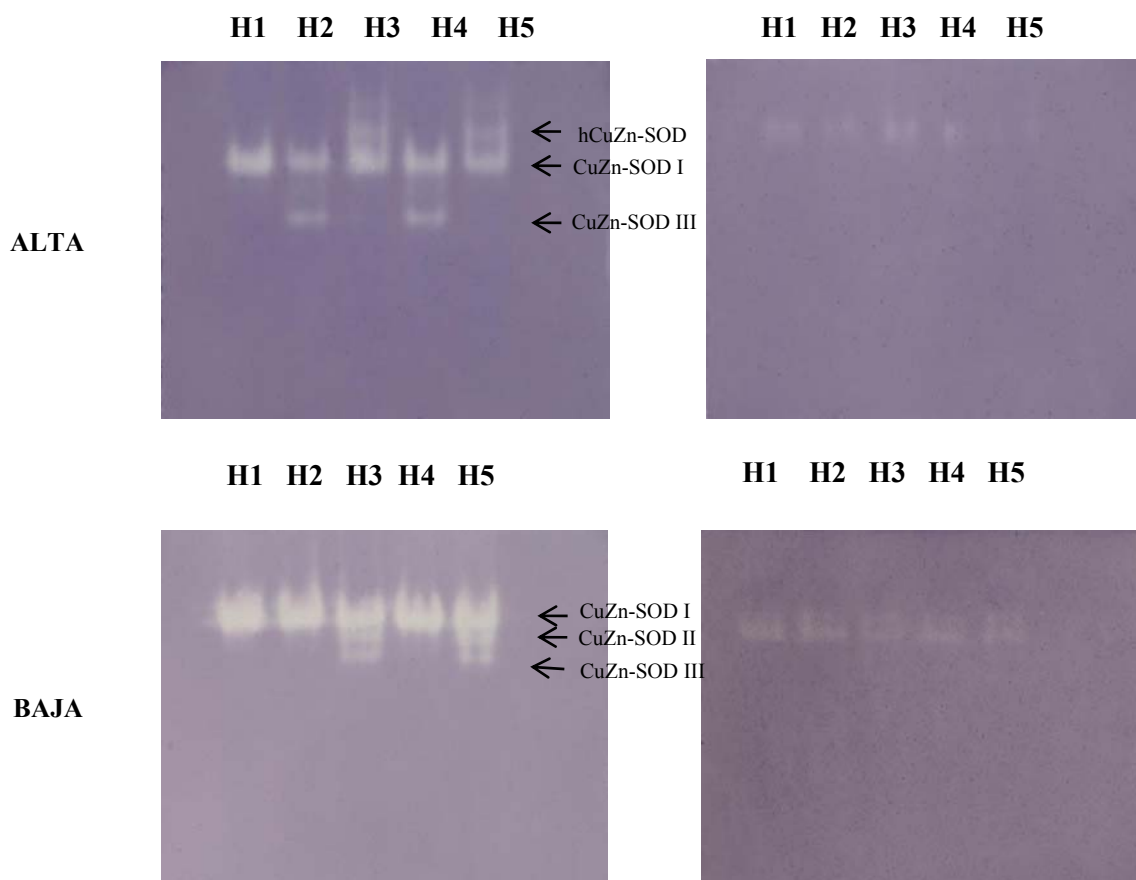


Figura IV.5. Formas isoenzimáticas de la SOD en hígado de truchas alimentadas con cinco tipos de dietas experimentales: H1 (-E-HUFA), H2 (-E+HUFA), H3 (+E-HUFA), H4 (+E+HUFA) y H5 (-C+E+HUFA) y sometidas a dos densidades de peces (alta y baja). A la derecha se muestra el efecto de la inhibición con cianuro.

En hígado se ponen de manifiesto al menos cuatro isoenzimas de la SOD (h, I, II y III) siendo todas CuZn ya que tras inhibición con cianuro no se pone de manifiesto ninguna de ellas. En todos los casos se observa la presencia de la CuZn-SOD I, apareciendo en otros la CuZn-SOD II y III. Cabe destacar que en condiciones de alta densidad aparece la forma hCuZn-SOD en algunos grupos.

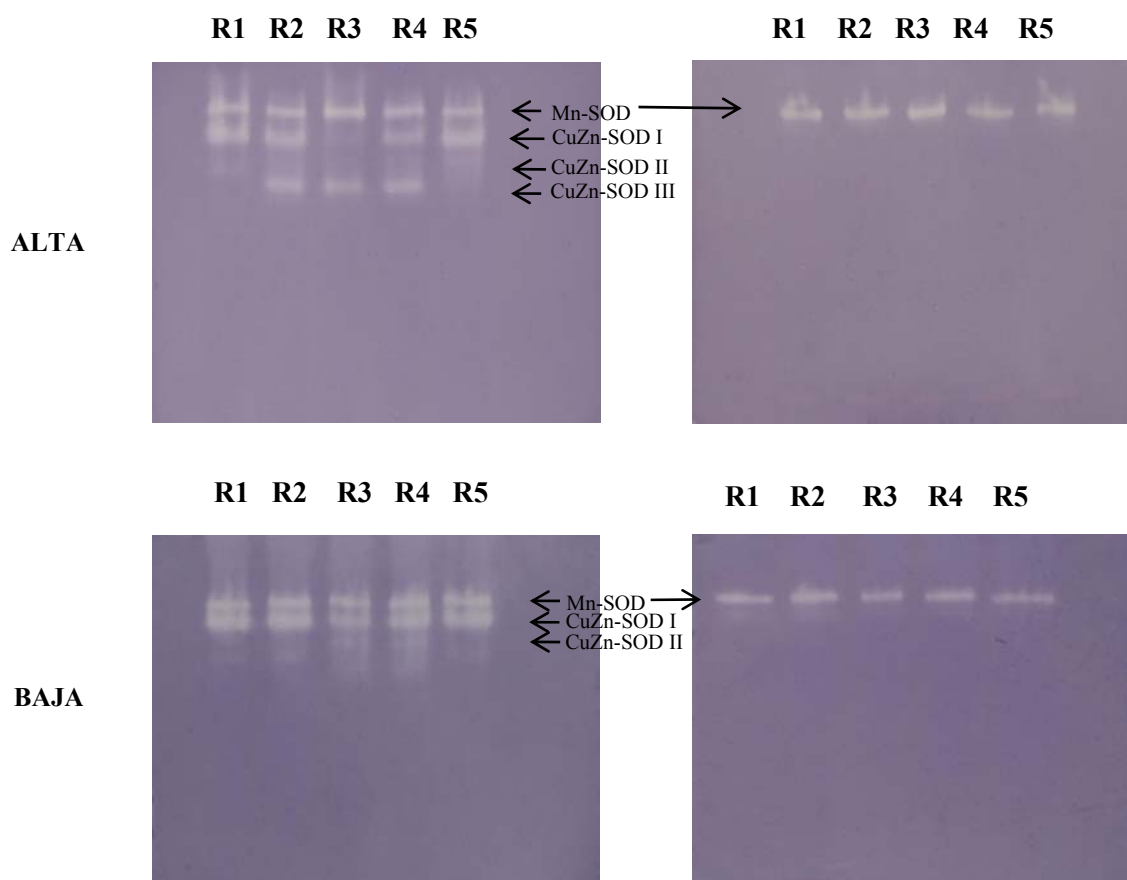


Figura IV.6. Formas isoenzimáticas de la SOD en riñón de truchas alimentadas con cinco tipos de dietas experimentales: R1 (-E-HUFA), R2 (-E+HUFA), R3 (+E-HUFA), R4 (+E+HUFA) y R5 (-C+E+HUFA) y sometidas a dos densidades de peces (alta y baja). A la derecha se muestra el efecto de la inhibición con cianuro.

En riñón se observan al menos cuatro isoenzimas, de las cuales tres son CuZn-SOD (I, II y III) y una Mn-SOD, la cual se pone de manifiesto a ambas densidades en las pruebas de inhibición con cianuro. Esta enzima está presente en todos los grupos sin existir distinción entre dietas. Por otro lado, la forma CuZn-SOD III sólo se refleja a alta densidad y en determinados grupos.

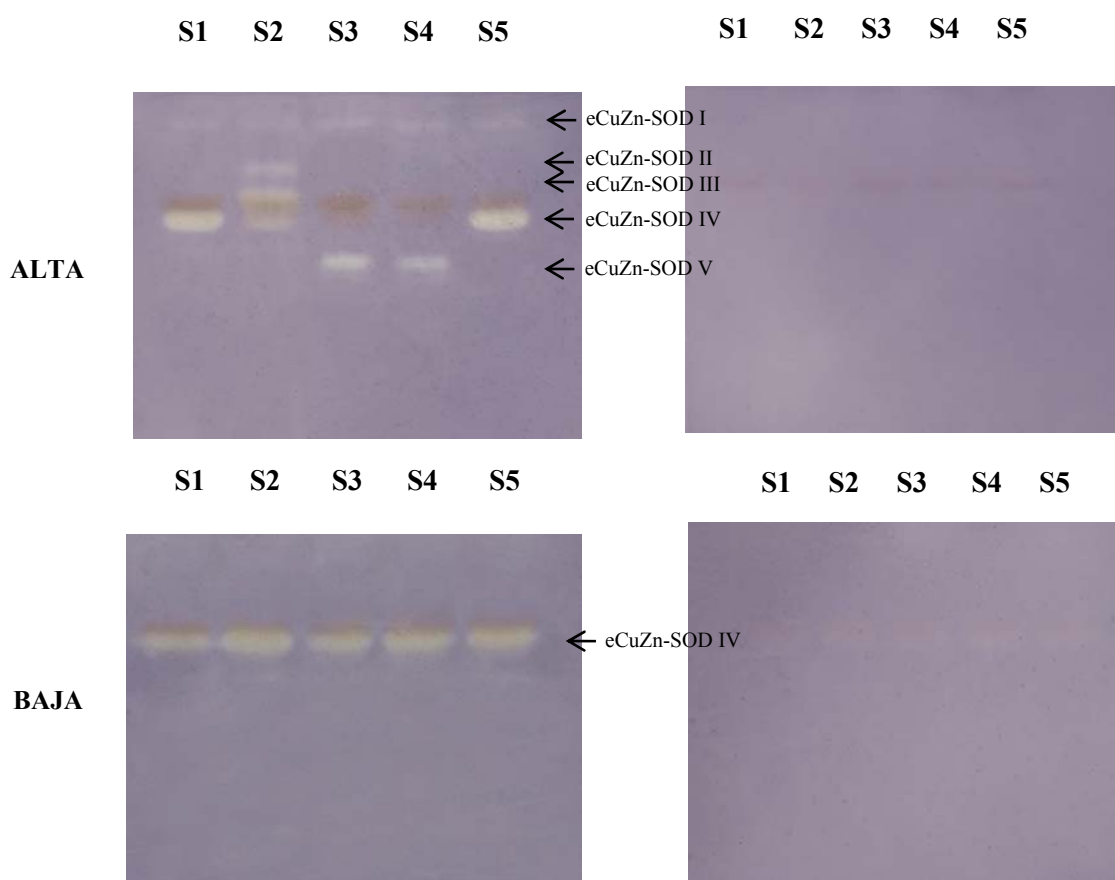


Figura 4.7. Formas isoenzimáticas de la SOD en glóbulos rojos de truchas alimentadas con cinco tipos de dietas experimentales: S1 (-E-HUFA), S2 (-E+HUFA), S3 (+E-HUFA), S4 (+E+HUFA) y S5 (-C+E+HUFA) y sometidas a dos densidades de peces (alta y baja). A la derecha se muestra el efecto de la inhibición con cianuro.

En la figura se muestra la existencia de, al menos, cinco isoenzimas, siendo todas ellas CuZn-SOD (eI, eII, eIII, eIV y eV), ya que los ensayos con cianuro muestra la ausencia de actividad de esta enzima. A alta densidad, con excepción de la CuZn-SOD I que aparece en todos los grupos, la presencia o no de estas formas depende del tipo de dieta, observándose a baja densidad que todos los grupos presentan el mismo patrón con la presencia de CuZn-SOD IV.

## 2.12. METABOLISMO DE ESPECIES DE NITRÓGENO REACTIVO. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO E INMUNOLÓGICO DE LA ISOENZIMA INOS

Los análisis realizados en extractos hepáticos de truchas alimentadas con las distintas dietas experimentales y sometidas tanto a alta como baja densidad, revelaron, tras la separación de las subunidades enzimáticas en geles de poliacrilamida, la presencia en todos los grupos de proteínas inmunoreactivas, con un tamaño molecular aparente de 131 kDa, pertenecientes a la isoforma iNOS.

La imagen del revelado muestra que los animales sometidos a alta densidad presentan bandas algo más gruesas, siendo, en estas condiciones de densidad, los alimentados con la dieta +E-HUFA los que mostraron las bandas más anchas con respecto a los restantes grupos. De hecho, los resultados obtenidos en el densitómetro, expresados como unidades arbitrarias (área problema / área grupo control: +E+HUFA a baja densidad), muestran una mayor presencia de esta enzima en los grupos -E+HUFA y +E-HUFA sometidos a alta densidad (Figura IV.7.).

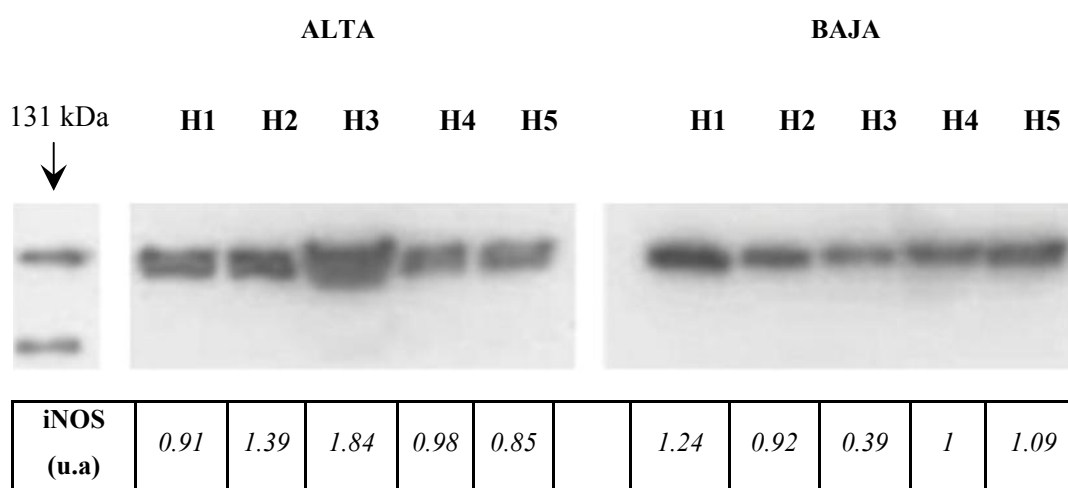


Figura IV.8. Detección inmunoelectroforética de la actividad iNOS en hígado de truchas alimentadas con las cinco dietas experimentales: H1 (-E-HUFA), H2 (-E+HUFA), H3 (+E-HUFA), H4 (+E+HUFA) y H5 (-C+E+HUFA) y sometidas a dos densidades de peces (alta y baja).



## **V.- DISCUSIÓN**





## **1. ENSAYO 1.- EFECTO DE LA DENSIDAD DE PECES EN TRUCHAS ARCO IRIS CON DIFERENTE GRADO DE RESPUESTA DE ESTRÉS**

### **1.1. EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE LA DIETA**

Entre los factores que habría que considerar cuando se estudia la relación entre estrés y crecimiento se encuentran las diferencias de raza que residen en el genotipo y las condiciones iniciales de vida, y las diferencias individuales. Se ha observado en salmónidos que distintas razas responden de manera diferente a un mismo agente estresante (Heath *et al.*, 1993; Mc. Donald y Robinson, 1993) y que diferentes causas de estrés producen respuestas diferentes en razas distintas (Mc. Geer *et al.*, 1991).

La falta de unanimidad de resultados entre alta o baja sensibilidad al estrés, en cuanto a la respuesta de cortisol se refiere, y la tasa de crecimiento, parece reflejar diferencias en el grado de domesticación de las especies y razas estudiadas. Unas pocas especies de peces han sido cruzadas con éxito, para desarrollar alta o baja sensibilidad al estrés, como el salmón Atlántico (Fevolden *et al.*, 1991) y la trucha arco iris (Pottinger *et al.*, 1994b). Sin embargo, solamente en el salmón real los resultados son concluyentes (Heath *et al.*, 1993). A la vista de la bibliografía disponible, cabe preguntarse si el cortisol es el parámetro más adecuado para investigar la relación entre estrés crónico y crecimiento ya que se deduce una cierta inconsistencia entre los altos niveles de cortisol y la depresión del crecimiento (Ellis *et al.*, 2002).

En relación con la trucha arco iris, Pottinger *et al.* (1994b) sometieron a la descendencia de padres seleccionados por su alta (HR) y baja (LR) respuesta al estrés a confinamiento de una hora, una vez al mes, durante un año. Las truchas HR tuvieron niveles de cortisol significativamente más altos que las LR, especialmente a las 4 horas del inicio del confinamiento; otros parámetros asociados a la respuesta de estrés

variaron en el mismo sentido. Estos resultados prueban que la capacidad de respuesta a situaciones estresantes se trasmite a través de generaciones. Truchas de estas características fueron utilizadas en los ensayos de este trabajo. Más adelante se volverán a revisar estos planteamientos al discutir la respuesta de cortisol a las situaciones experimentales del presente estudio.

La primera generación de individuos con alta (HR) y baja (LR) respuesta, obtenida a partir de padres seleccionados en función de su respuesta a un estrés agudo, valorada por los niveles plasmáticos de cortisol, respondió de manera diferente al ser sometidos a condiciones de confinamiento como circunstancia de estrés crónico. En este sentido, y de una manera general, se puede decir que las truchas LR dieron los mejores resultados de crecimiento y conversión de alimento dentro de cada situación de densidad (20 y 100 g/l), es decir: tanto cuando la densidad experimental fue de 20 g/l, considerada como habitual en términos de producción, como cuando supone una situación de estrés crónico por hacinamiento (100 g/l). También en términos generales, los resultados obtenidos con los animales HR no difirieron significativamente de los grupos control, dentro de los lotes de igual densidad de peces.

Cuando se compara la influencia de la densidad de peces sobre los distintos índices de interés productivo, se observa una disminución de los parámetros de carácter absoluto (ingesta, variación de peso, tasa de crecimiento) que es significativa en los grupos LR y HR mantenidos a alta densidad respecto a los correspondientes de baja densidad, cosa que no ocurre entre grupos control a ambas densidades. Por otra parte, la densidad de animales no afectó significativamente a los índices de conversión y utilización de la dieta.

La selección de animales con diferente respuesta al estrés repercute sobre la ingesta. En este sentido, y en condiciones normales de densidad, las truchas LR tuvieron una ingesta significativamente superior a la de las HR. El grupo control presentó una ingesta intermedia y no significativamente diferente de los otros dos grupos. Por otra parte, a alta densidad, fueron las truchas HR las que presentaron una ingesta inferior, respecto a las truchas control y LR que, además, no difirieron entre ellas. Por tanto, a

baja densidad, fueron las truchas seleccionadas por su baja respuesta al estrés las que mejoran su ingesta y, sin embargo, a altas densidades, son las HR las que disminuyen la ingesta como respuesta al estrés crónico por confinamiento.

La mayor sensibilidad al estrés debería manifestarse mas claramente en condiciones estresantes, y la menor sensibilidad debería favorecer los resultados de producción en todas las circunstancias. Uno de los efectos del estrés crónico es, precisamente, la disminución de la ingesta (Zounevel y Fadholi, 1991) posiblemente por influencia del cortisol sobre los centros hipotalámicos que regulan el apetito (Bernier y Peter, 2001) o asociada a cambios en los niveles de ciertos metabolitos plasmáticos (Knights, 1985) que, en este caso, como es bien conocido en mamíferos, podría deberse al efecto inhibitor del incremento de la glucemia sobre los centros del apetito (Peter, 1979).

Por otra parte, hay que considerar la posibilidad de que, en situaciones de alta densidad, la alimentación *ad libitum* disminuya la disponibilidad de alimento, bien por efecto directo del número de animales como por el establecimiento de jerarquías (Wendelaar-Bonga, 1997). Con alimentación manual hasta saciedad, que ha sido el método de alimentación aplicado en este trabajo, se ha observado que hay una tendencia a disminuir la ingesta al aumentar la densidad de peces (Papoutsoglou *et al.*, 1979). En experimentos realizados con salmónidos sometidos a diferente carga, se puso de manifiesto que, en densidades superiores a 60 g/l, se producía una mayor ingesta cuando la alimentación era automática (Jørgensen *et al.*, 1993). Sin embargo, Alanärä y Brännäs (1996) obtuvieron una disminución de la ingesta a altas densidades cuando para la alimentación se usaban dispensadores a demanda. Holm *et al.* (1990) observaron que el efecto negativo, que sobre el crecimiento ejercen las altas densidades de peces, podría compensarse con un régimen y frecuencia de alimentación adecuados.

Probablemente como consecuencia de una mayor ingesta, las truchas LR fueron las que experimentaron un mayor aumento de peso y una mayor tasa de crecimiento instantáneo (TCI) en condiciones de densidad normal, mientras que las HR no difirieron significativamente del grupo control. Sin embargo, en condiciones de alta densidad, las

HR tuvieron un menor incremento de peso, mientras que las LR experimentaron una mayor tasa de crecimiento y los grupos control obtuvieron valores intermedios. Estos resultados ponen de manifiesto la relación entre sensibilidad al estrés, establecida por selección, y el crecimiento. Además, cuando se compara el efecto de la densidad para cada tipo de trucha, se observa que la respuesta, forzada por las condiciones de alta densidad, provoca en todos los grupos una reducción de la ganancia de peso y de la tasa de crecimiento que entre animales control no llegó a ser estadísticamente significativa.

La disminución del crecimiento asociada a situaciones de estrés, y en este caso también en relación con la sensibilidad para responder a situaciones más o menos estresantes, se ha observado en una gran variedad de circunstancias. En el enfrentamiento a agentes estresantes, parte de la energía destinada a crecimiento se utiliza para otros procesos y necesidades más inmediatas como respiración, actividad motora, etc. La menor ingesta, así como la respuesta hormonal asociada a estrés, favorece la movilización de reservas, lo que se refleja en una tasa metabólica aumentada para cubrir la mayor demanda energética (Pankhurst y van der Kraak, 1997; De Boeck *et al.*, 2000). El preferente destino energético de sustratos, para hacer frente a determinadas alteraciones metabólicas, hace que la relación entre la energía destinada a la síntesis y renovación de tejidos y la empleada en el mantenimiento de funciones vitales disminuya en situaciones de estrés, lo que explicaría el descenso en la energía disponible para crecimiento (van Weerd y Komen, 1998).

De acuerdo con Marchand y Boisclair (1998), las dos variables a las que puede deberse una reducción del crecimiento serían la ingesta y la actividad de los animales. Estos autores demostraron que el aumento de la densidad de peces induce una disminución de la ingesta y un aumento de la actividad motora (destinada a conducta agresiva, competencia por el alimento, etc.), lo que se traduciría en una menor tasa de crecimiento. Valoraron igualmente el peso de ambas variables sobre la reducción del crecimiento, dando valores del 40% para la ingesta y del 60% para el gasto energético debido a la actividad de los animales.

La interacción ingesta-animal (normal o estresado) tiene su expresión práctica en los índices de conversión y utilización del alimento. En este sentido, las truchas LR, independientemente de la densidad a que estuvieran sometidas, fueron las que manifestaron unos índices de eficacia alimentaria (EA) y utilización de la proteína para crecimiento (CEC, VPP) mejores, con relación a los otros grupos. La menor diferencia entre grupos hay que atribuirle, al menos en parte, a que son índices que relacionan el incremento de peso o de proteína corporal con la ingesta y, a menos que se produzcan profundos cambios en la utilización de los nutrientes entre los diferentes grupos, una menor ingesta, por ejemplo, se traduciría, dentro de ciertos límites, en una mejor utilización del alimento ingerido. Así, las truchas HR, con menor ingesta y menor incremento de peso, llegan a presentar índices similares a los de los grupos control, especialmente cuando se considera la situación de alta densidad.

En cualquier caso, los índices de utilización de la dieta se han visto influidos por la diferente sensibilidad de los grupos de truchas al estrés, siendo mejores en los peces cuyos padres fueron seleccionados por su menor respuesta al estrés agudo por confinamiento. Los peores resultados obtenidos con los otros dos grupos habría que enfocarlos desde el punto de vista de su sensibilidad al estrés, a pesar de la falta de influencia de la densidad experimental sobre estos parámetros.

En una revisión sobre la influencia de la densidad de peces sobre diversos parámetros indicativos de bienestar en trucha arco iris, Ellis *et al.* (2002) observaron que de 27 estudios en los que se valora la conversión de alimento, 13 de ellos daban resultados negativos o adversos, 7 no demostraron influencia alguna y 2 dieron resultados favorables. En esta misma revisión, el incremento de peso se valoró en casi todos los estudios y, en la mayoría de ellos, se encontró que el aumento de la densidad de peces provocaba una disminución del crecimiento, mientras que en ninguno de ellos se registró un efecto positivo.

En relación con el estado nutritivo de los animales, el denominado factor de condición (FC: peso / longitud<sup>3</sup>) y el índice hepatosomático se consideran parámetros indicativos, *a grosso modo*, del nivel de reservas energéticas en los peces (Goede y

Barton, 1990). En las condiciones experimentales de este trabajo, el FC, que no varió entre grupos de baja densidad, tendió a disminuir a altas densidades, alcanzando valores significativamente inferiores en los grupos LR y HR. El FC más bajo correspondió al grupo HR en condiciones de alta densidad. Estos resultados indicarían una movilización de reservas en el animal asociada a la respuesta de estrés. Efectivamente, se ha comprobado en los análisis de composición corporal, que en situaciones de alta densidad, los animales HR presentan valores significativamente inferiores de lípidos corporales ligados a un mayor porcentaje de humedad con respecto a los otros grupos. El hecho de que el grupo HR presentara una menor ingesta y crecimiento a alta densidad, unido a una mayor movilización de reservas energéticas en forma de lípidos explicaría el menor FC en estos animales.

El índice hepatosomático disminuyó en todos los grupos mantenidos a alta densidad. Resultados similares han sido obtenidos en truchas arco iris sometidas a densidades elevadas (Leatherland y Cho, 1985; Leatherland, 1993), aunque no se puso de manifiesto efecto alguno sobre los niveles hepáticos de glucógeno y/o lípidos. Por otra parte, Papoutsoglou *et al.* (1987) encontraron una reducción significativa del contenido hepático de lípidos al aumentar la densidad en esta especie. En el presente trabajo se pone de manifiesto una tendencia a presentar niveles de glucógeno hepático más bajos en todos los grupos sometidos a alta densidad, coincidiendo, en los grupos LR y HR, con la disminución del índice hepatosomático y siendo los niveles de glucógeno de las truchas HR significativamente inferiores a los de las LR en ambas densidades, mientras que los grupos control mantuvieron valores intermedios.

## 1.2. EFECTO SOBRE DETERMINADOS PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS Y EL METABOLISMO INTERMEDIARIO

Los parámetros hematológicos determinados indican una tendencia a aumentar el hematocrito en los grupos sometidos a alta densidad, que fue significativa en los animales HR. Con relación al contenido en hemoglobina en la sangre, los animales HR

fueron los únicos que mostraron un incremento significativo a alta densidad, sin observarse cambios en los grupos control y LR mantenidos en las mismas condiciones.

Los datos disponibles en bibliografía con relación a la influencia de la densidad de peces sobre distintos parámetros hematológicos son muy variados y no siempre concluyentes, pero un gran número de investigaciones coinciden en que uno de los efectos derivados del aumento de la densidad es la hemoconcentración, caracterizada por valores de hemoglobina sanguínea y de recuento de glóbulos rojos superiores a los presentados por los animales mantenidos a densidad normal (Kjartansson *et al.*, 1988; Mazur e Iwama, 1993; Young y Cech, 1993; Caldwell y Hinshaw, 1994; Martínez *et al.*, 1994; Montero *et al.*, 1999, 2001b). Este efecto ha sido interpretado por algunos autores como una estrategia para aumentar la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre en circunstancias de una elevada demanda energética como es el estrés crónico al que los animales están sometidos (Srivastava y Sahai, 1987; Montero *et al.*, 2001b); de hecho, los peces sometidos a alta densidad aumentan su tasa metabólica como consecuencia del mayor coste energético derivado de la captura del alimento y la mayor interacción entre individuos (Srivastava y Sahai, 1987; Marchand y Boisclair, 1998; Montero *et al.*, 2001b).

Como se observa, los resultados ponen de manifiesto, una vez más, una divergencia en la respuesta de los animales HR y LR, mostrándose una mayor sensibilidad al estrés en los grupos HR. Dado que los tres grupos presentaban valores similares de estos parámetros bajo condiciones de densidad normal, la divergencia en la respuesta de las dos razas seleccionadas se puede atribuir exclusivamente al efecto del aumento de la densidad de peces.

El estrés produce un aumento de las demandas energéticas que parecen cubrirse, fundamentalmente, a partir de la movilización del glucógeno almacenado o de la síntesis de glucosa. En cautividad, y especialmente en condiciones forzadas, los peces están expuestos a agentes estresantes durante largos periodos de tiempo sin posibilidad de resolver las causas, esto tiene como resultado una intensificación de la actividad metabólica durante mucho tiempo. El desvío del metabolismo energético en estas

circunstancias reduce la energía disponible para otros fines como, por ejemplo, el crecimiento. Este efecto general sobre el metabolismo se traduce, como ya se ha comentado previamente, en un aumento del consumo de oxígeno y también en la elevación de los niveles plasmáticos de glucosa, que están asociados íntimamente con el estrés (ver revisión de Barton e Iwama, 1991). La Tabla IV.5. es expresiva a este respecto: en condiciones normales de densidad, las truchas LR presentaron valores de glucemia significativamente inferiores a las truchas control y HR, siendo los de estas dos últimas similares. En alta densidad, las truchas LR y control no presentaron variaciones destacables de la glucemia; sin embargo, los grupos HR incrementaron significativamente los niveles plasmáticos de glucosa.

Puesto que las truchas LR y HR proceden de progenitores seleccionados en función de su respuesta de cortisol al estrés por confinamiento, cabe esperar una respuesta similar de la progenie. En este sentido Pottinger *et al.* (1994b), obtuvieron progenies LR y HR que sometieron a confinamiento de 1h/mes durante un año, alcanzándose niveles de cortisol significativamente más altos en las truchas HR. Si aceptamos al menos la misma tendencia en las truchas HR y LR de este trabajo, podemos atribuir las diferencias en la glucemia al cortisol, al menos parcialmente. El cortisol tiende a aumentar el “pool” de aminoácidos libres, por inhibición de la síntesis proteica y/o activación del catabolismo proteico, lo que se traduce normalmente en una disminución de la tasa de crecimiento y en un aumento de la utilización de los aminoácidos para la producción de energía y glucosa. De hecho, las truchas LR, presumiblemente con niveles más bajos de cortisol, tuvieron una tasa de crecimiento más alta y menor concentración plasmática de glucosa en condiciones de densidad adecuadas. Por otra parte, la glucemia se alteró en todos los grupos por las condiciones estresantes de alta densidad de peces. El tratamiento con cortisol se ha visto que deprime el crecimiento de los peces, coincidiendo con un aumento de la glucemia (Leach y Taylor, 1982; Davis *et al.*, 1985; Barton *et al.*, 1987; Vijayan y Leatherland, 1989; Foo y Lam, 1993a, b). La mejor evidencia de que la hiperglucemia es generada directamente por el cortisol la obtuvieron Leach y Taylor (1980) al reducir la hiperglucemia por estrés con la administración de *metyrapone*, un inhibidor de la 11 $\beta$ -hidroxilasa y, por tanto, de la síntesis de cortisol. Otra posible explicación de la



hiperglucemia estaría en la inhibición de la utilización de la glucosa a nivel periférico (Leach y Taylor, 1982). Una última causa del aumento de la glucemia estaría en la movilización del glucógeno hepático y muscular, por acción de las catecolaminas, que se comenta a continuación.

El glucógeno hepático presentó niveles relacionados, en principio, con la sensibilidad de los distintos grupos experimentales al estrés, es decir: significativamente más altos en las truchas LR respecto de las HR, en ambas densidades, presentando los grupos control valores intermedios (Tabla IV.5.). La mayor densidad de peces se asoció con una disminución del glucógeno hepático en todos los grupos experimentales, aunque dicha disminución no llegó a ser significativa. Una primera explicación a las citadas variaciones podría estar en la ingesta, cuyos niveles cursan paralelos. Por otra parte, hay que pensar en que la respuesta hormonal sea también responsable de las variaciones en los depósitos de glucógeno hepático.

A la vista de la bibliografía existente, podría parecer que la activación adrenérgica y del eje hipotálamo-hipófisis-tejido interrenal (HHI) son dos respuestas distintas y paralelas al estrés. Sin embargo, hay evidencias de una interacción entre ambos ejes, modulándose recíprocamente. Las investigaciones realizadas sobre dicha interacción son escasas pero significativas. La adrenalina administrada *in vivo* causa un aumento de las concentraciones plasmáticas de cortisol (White y Fletcher, 1985; Gamperl *et al.*, 1994) lo que sugiere que la elevación de los niveles de adrenalina asociada al estrés debe estimular el eje HHI. En peces el mecanismo es desconocido pero, en mamíferos, se sabe que la adrenalina, a través de receptores adrenérgicos en hipotálamo e hipófisis, aumenta la liberación de CRH y ACTH, respectivamente (Plotsky *et al.*, 1989). El proceso inverso también se da: la activación del eje HHI durante el estrés aumenta la respuesta adrenérgica. Así, la elevación crónica de las concentraciones de cortisol parece aumentar la sensibilidad  $\beta$ -adrenérgica (aumento del número de receptores  $\beta$ ), al menos en glóbulos rojos y hepatocitos (Perry y Reid, 1993). En este sentido, el aumento del número de receptores  $\beta$  en las membranas de los hepatocitos, por influencia del cortisol, aumenta la respuesta glucogenolítica a las

catecolaminas (Perry y Reid, 1993). Además, el aumento de cortisol, en respuesta al estrés, parece acelerar la biosíntesis de catecolaminas (Jönsson *et al.*, 1983; Nilsson, 1984).

Si, como hemos supuesto, los caracteres LR y HR, seleccionados en función de la respuesta de cortisol al estrés, son transmisibles a generaciones posteriores, como han demostrado Pottinger *et al.* (1994b) para la trucha arco iris, los peces LR y HR utilizados en este trabajo deben tener bajos y altos niveles de cortisol, respectivamente. La relación mencionada entre cortisol y catecolaminas explicaría los diferentes niveles de glucógeno de los distintos grupos experimentales y la menor concentración de éste en los peces sometidos a las condiciones estresantes de alta densidad.

Las influencias metabólicas de la sensibilidad al estrés, en función del tipo de trucha seleccionada y de las condiciones de densidad, fueron estudiadas valorando en hígado las actividades enzimáticas relacionadas con la utilización de aminoácidos (alanina aminotransferasa), la producción de glucosa a través de la vía gluconeogénica (fructosa 1,6-bisfosfatasa) y la utilización glucolítica de la glucosa (piruvato quinasa y fosfofructoquinasa) (Tabla IV. 6.).

Según una serie de autores, la función metabólica principal del cortisol, en los peces teleósteos, parece ser la regulación de la gluconeogenesis (Chan y Woo, 1978; Renaud y Moon, 1980; Leach y Taylor, 1982; Janssens y Waterman, 1988; Vijayan *et al.*, 1990), aunque la fuente de sustratos gluconeogénicos utilizados por estimulación del cortisol no está clara en estos animales. Se ha demostrado que el cortisol moviliza proteínas (Chan y Woo, 1978; Davis *et al.*, 1985), lípidos (Lidman *et al.*, 1979; Sheridan, 1986) y carbohidratos (Janssens y Waterman; 1988; Vijayan y Leatherland, 1989) que aportan una variada serie de precursores posibles. En un estudio directo, en el que se evaluó la gluconeogenesis *in totum* a partir de U-C<sup>14</sup>-glutamato, de la Higuera y Cárdenas (1986) demostraron que la gluconeogenesis a partir de aminoácidos se estimula por acción del cortisol. El que este aumento de la gluconeogénesis se refleje en actividades enzimáticas concretas no está claro, al menos en el caso de la FBPasa.

En relación a la influencia de situaciones de estrés crónico sobre la gluconeogenesis, mediada o no por cortisol, la situación tampoco es clara. Vijayan *et al.* (1990) sí han llegado a observar un aumento de la actividad FBPassa en *Salvelinus fontinalis* sometido a condiciones de alta densidad; sin embargo, en estos mismos animales, los niveles de glucemia y los de glucógeno hepático fueron significativamente más bajos que los del grupo control.

La falta de influencia del estrés crónico por alta densidad de peces sobre la actividad FBPassa hepática y, consecuentemente, sobre el flujo gluconeogénico, puede ser sólo aparente. En este sentido es interesante señalar que mientras la gluconeogenesis *in totum*, a partir de U-C<sup>14</sup>-aminoácidos, se adapta a variaciones sustanciales en la composición de la dieta (Cowey *et al.*, 1977; de la Higuera y Cárdenas, 1986), la actividad FBPassa no se modifica en condiciones de velocidad máxima, como en las que se determinó en este trabajo; sin embargo, a concentraciones celulares de fructosa 1,6-bisfosfato, la Km disminuye en proporción al aumento del contenido proteico de la dieta, aumentado al mismo tiempo la razón de actividad ( $V_{ss}/V_{max}$ ) y la eficiencia catalítica, tanto a nivel subsaturante como saturante ( $V_{ss}/K_m$  y  $V_{max}/K_m$ , respectivamente) (Sánchez-Muros, 1990). La misma respuesta fue observada en condiciones de ayuno prolongado, situación que lleva normalmente asociada una respuesta de estrés. Podemos pensar, por tanto, que la gluconeogénesis puede estar aumentada en estas circunstancias y que los mecanismos de adaptación de la actividad FBPassa estén más relacionados con cambios en la actividad de la enzima que con cambios en su concentración.

La actividad de alanina aminotransferasa (AAT) disminuyó en LR frente a los otros dos grupos (HR y control) a baja densidad, mientras que a alta densidad las actividades fueron similares en los tres grupos al aumentar significativamente en LR. En este sentido, recientes experimentos con una segunda generación de truchas seleccionadas (LR y HR) no mostraron diferencias entre grupos ni evidencias de una inducción sistemática de la actividad AAT en animales sometidos a confinamiento durante dos semanas (Trenzado *et al.*, 2003). También en otras especies como *Salvelinus fontinalis* el hacinamiento crónico no indujo cambios en las actividades de

enzimas relacionadas con el catabolismo de los aminoácidos (AAT, GOT y GDH). En una situación de estrés por confinamiento a corto plazo en otro pez de agua dulce como la tilapia (*Oreochromis mossambicus*), tampoco se han observado cambios en la actividad de esta enzima, aunque las concentraciones plasmáticas de cortisol aumentaron significativamente (Vijayan *et al.* 1997). Sin embargo, en experimentos de estrés por manipulación, la actividad AAT, al igual que la de GDH, medidas a las 6 h de la manipulación sin anestesia, aumentaron significativamente (Morales *et al.*, 1990), respuesta que no se producía si los animales eran adecuadamente anestesiados.

En circunstancias de estrés se produce, normalmente, un aumento de los aminoácidos libres como consecuencia de los efectos del cortisol sobre el metabolismo proteico (aumento del catabolismo, inhibición de la síntesis, o ambas respuestas a la vez). Las concentraciones tisulares de aminoácidos, en condiciones normales, tienden a ser mayores que la  $K_m$  de las aminoacil sintetetasas y menores que los valores de  $K_m$  de las enzimas que catabolizan aminoácidos. Por tanto, cuando las concentraciones tisulares de aminoácidos aumentan, las aminoacil sintetetasas alcanzan una cinética de orden cero y la síntesis proteica presenta valores máximos (Lied y Braaten, 1984). Por el contrario, las enzimas que catabolizan aminoácidos presentan una cinética de primer orden con actividades directamente relacionadas con las concentraciones de sustrato (Cowey y Walton, 1989). El que no se haya producido un aumento en la actividad AAT indicaría que la movilización proteica no ha sido tan alta como para aumentar la concentración de aminoácidos hasta tal punto que afecte a la actividad de esta enzima.

En relación a la utilización de la glucosa a través de la vía glucolítica, la actividad piruvato quinasa (PK) fue significativamente más alta en las truchas HR a baja densidad. Sin embargo, la actividad fosfofructo quinasa (PFK) aumentó en las dos razas seleccionadas al aumentar la densidad de animales, aunque sólo fue significativa en las HR. Los resultados de la bibliografía son igualmente contradictorios para ambas enzimas, en relación, sobre todo, a la variedad de las situaciones de estrés experimental. Así, tras la administración continuada de cortisol, Vijayan *et al.* (1991) observaron en *Salvelinus fontinalis*, un descenso de la actividad glucolítica de la PFK, asociado a un aumento de la actividad FBPasa, y, sorprendentemente, a una disminución de la

glucemia. Sin embargo, en condiciones de alta densidad, con un aumento no significativo de los niveles de cortisol, obtuvieron resultados, en cierto modo, opuestos: un aumento de la actividad PFK hepática asociado a una disminución de la glucemia (Vijayan *et al.*, 1990) y ningún cambio en la actividad PK. En relación con esta última, el estrés por confinamiento provocó un incremento de su actividad (Vijayan *et al.*, 1997) mientras que el tratamiento con cortisol o producía un descenso de actividad (Vijayan *et al.*, 1997) o ésta no se afectaba (Foster y Moon, 1986; Vijayan *et al.*, 1996). En el presente estudio, el aumento de actividad PFK, enzima reguladora de la vía glucolítica, como consecuencia de un aumento de densidad en el grupo HR, pondría de manifiesto una mayor activación de esa vía bajo estas circunstancias. En este sentido, el aumento de la glucemia observado en este grupo en estas mismas condiciones sería responsable, al menos en parte, de la activación de esta enzima reguladora (Metón *et al.*, 2003).

## **2. ENSAYO 2.- EFECTO DE LA DENSIDAD DE PECES EN TRUCHAS ARCO IRIS CON DIFERENTE DISPONIBILIDAD DE HUFAS Y DE VITAMINAS E Y C EN LA DIETA**

### **2.1. EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO Y UTILIZACIÓN NUTRITIVA DE LA DIETA**

En un segundo grupo de experimentos, pertenecientes al Ensayo 2, se analiza la influencia de la densidad de peces y la composición de la dieta (suficiencia o carencia de HUFAs y vitaminas E ó C) sobre la ingesta, observándose, al igual que en el Ensayo 1, una disminución significativa de ésta al aumentar la densidad de peces en los tanques experimentales. La concentración de peces es un factor estresante cuya influencia sobre la ingesta se discutió anteriormente, por lo que no se va a insistir en los mismos argumentos.

El estudio estadístico reveló también una influencia de la composición de la dieta sobre la ingesta (Tabla IV.7.). En este sentido, hay que señalar que este efecto sólo se manifestó entre los grupos de alta densidad, en los que las condiciones estresantes deben haber propiciado esas diferencias en la ingesta que no serían estadísticamente atribuibles a una interacción densidad-dieta (ver anexo Tabla IV.7.). En esos grupos a alta densidad la mayor ingesta se observó en los animales +E-HUFA y -C+E+HUFA. Ante estos resultados, sólo cabría concluir que la mayor desproporción entre vitamina E y HUFAs, a favor de la vitamina E (dieta +E-HUFA), haya estimulado, de alguna forma, la ingesta. Hay publicaciones que demuestran el papel de la vitamina E reduciendo el estrés en mamíferos (Tengerdy, 1989) y peces (Montero *et al.*, 2001b). Además, Watson y Petro (1982) demostraron en ratones que la vitamina E reduce significativamente las concentraciones plasmáticas de corticoesteroides; observándose en doradas un incremento de cortisol plasmático en animales alimentados con dietas deficientes en vitamina E (Montero *et al.*, 1998). Esa mayor desproporción entre vitamina E y HUFAs liberaría una mayor cantidad de esta vitamina del papel antioxidante y protector de los HUFAs, pudiendo ejercer, en mayor grado, ese posible papel atenuante de la respuesta de estrés y disminuir, en su caso, los niveles circulantes de corticoesteroides. Esto explicaría los valores más bajos de ingesta observados en los grupos +E+HUFA y -E-HUFA y -E+HUFA. En relación a que la carencia de vitamina C estimule la ingesta, y sólo en condiciones de alta densidad, no hay argumentos sólidos que puedan explicar estos resultados.

En condiciones normales de densidad, las distintas dietas no indujeron cambios significativos de incremento de peso, a pesar de que tres de ellas eran deficientes en vitamina E ó C. Estos resultados coinciden con los de otros autores que observaron que la carencia de vitamina E en la dieta no afectaba negativamente el crecimiento de la trucha (Cowey *et al.*, 1983, 1986; Furones *et al.*, 1992; Clerton *et al.*, 2001), seriola (Ito *et al.*, 1999), rodaballo (Stéphan *et al.*, 1995) y lubina (Gatta *et al.*, 2000). La suplementación con esta vitamina tampoco se traduce en un aumento de la ganancia de peso en la dorada (Tocher *et al.*, 2002). En relación con la carencia de vitamina C, la bibliografía es confusa ya que, en algunas investigaciones, se ha observado una disminución del peso y de la supervivencia (Gatlin III *et al.*, 1986; Chávez de Martínez,

1990; Chien *et al.*, 1999) mientras que otros experimentos no revelaron un efecto negativo sobre estos parámetros (Andersen *et al.*, 1998; Alexis *et al.*, 1999; Moreau *et al.*, 1999; Kolkovski *et al.*, 2000). Respecto a las dietas a las que no se añade aceite de pescado, rico en HUFAs, hay que decir que el aporte lipídico cubre las necesidades esenciales de ácidos grasos de la trucha arco iris, por lo que no es de extrañar que el crecimiento no se vea afectado.

El aumento de la densidad de peces (5 x normal) indujo, en términos estadísticos generales, una disminución significativa del incremento de peso que afectó especialmente a las truchas alimentadas con la dieta +E+HUFA. Entre dietas experimentales, a alta densidad, las truchas con mayor ganancia de peso fueron las alimentadas con la dieta +E-HUFA que, como hemos indicado anteriormente, cubre las necesidades de ácidos grasos esenciales y además presentaron una mayor ingesta.

Al considerar los índices de utilización del alimento (EA, CEC y VPP) observamos que, en condiciones de densidad normal, la eficacia alimentaria (EA) y la retención proteica para crecimiento (VPP, valor productivo de la proteína) fueron mejores para las dietas +E-HUFA y +E+HUFA que son, precisamente, las que no tienen carencias vitamínicas y cubren las necesidades de ácidos grasos. A ambas densidades los índices más bajos fueron obtenidos con las dietas -E-HUFA y -C+E+HUFA, mientras que la dieta -E+HUFA dio valores intermedios. Parece, por tanto, que la deficiencia vitamínica, a pesar de no afectar la ingesta ni el incremento de peso, reduce la utilización metabólica de los nutrientes con fines plásticos. El análisis estadístico general (anexo Tabla IV.7.) detectó una mayor influencia de la dieta que de la densidad de peces sobre estos índices de utilización nutritiva, siendo la deficiencia vitamínica la que más influyó en los resultados obtenidos para ambas densidades de peces.

Aunque la carencia de vitamina C no afectó significativamente al incremento de peso, los peces alimentados con la dieta -C+E+HUFA, comparado con los +E+HUFA, fueron los que experimentaron un menor aumento de peso a densidad normal. Por otra parte, al mantener un nivel de ingesta similar al de los otros grupos, en ambas densidades, los índices de utilización nutritiva disminuyeron sensiblemente lo que

estaría de acuerdo con la disminución de la velocidad de crecimiento y de la eficacia alimentaria observada por varios autores (Gatlin III *et al.*, 1986; Chávez de Martínez, 1990; Aguirre y Gatlin III, 1999; Chien *et al.*, 1999). Además, hay que tener en cuenta que la mayoría de los estudios en los que se observó una disminución del crecimiento y de la utilización nutritiva de la dieta, fueron realizados con individuos más jóvenes, con mayor sensibilidad a la carencia de esta vitamina. En este sentido, Sato *et al.* (1978) observaron que las necesidades de ácido ascórbico disminuyen con la edad de la trucha arco iris. Las truchas jóvenes crecieron más lentamente y presentaron alteraciones esqueléticas después de 24 semanas de carencia, mientras que peces de mayor edad no desarrollaron ninguno de estos problemas. La duración de los ensayos, necesaria para que los síntomas de deficiencia lleguen a manifestarse, también es otro aspecto a tener en cuenta. Estudios recientes han demostrado en el pez gato que la diferencia de peso no se hace significativamente diferente hasta las 10 semanas de carencia (Adham *et al.*, 2000). Estos autores sugieren que futuros estudios deberían tener en cuenta el tamaño, la estrategia de alimentación, la especie y los niveles de vitamina en la dieta para tener una visión más completa y definitiva de las funciones de esta vitamina en cada momento del ciclo de peces.

Los valores de longitud muestran que, como era de esperar, todos los grupos experimentaron un aumento significativo del crecimiento a lo largo del período experimental. Por otro lado, aunque aparecen algunas diferencias significativas entre grupos, estas no fueron destacables, no observándose, en líneas generales, influencias importantes de la densidad y de la dieta.

Por otra parte, el menor factor de condición (FC) que presentaron los peces alimentados con dietas suplementadas con vitamina E (+E-HUFA, +E+HUFA y -C+E+HUFA), a los 21 días y a alta densidad, se recupera a los 42 días de tal forma que, al final del experimento, no hay diferencias en el FC en función de la dieta ni de la densidad de peces (Tabla IV.8.). La disminución del FC a alta densidad en las primeras etapas del experimento en dichos grupos, podría deberse a la acción de las catecolaminas que, como ya se comentó, están implicadas en la activación de rutas



glucogenolíticas, gluconeogénicas y de movilización lipídica, con fines energéticos (Perry y Reid, 1993; Pickering, 1993a), afectando a las reservas energéticas del animal.

La disminución del índice hepatosomático (IHS) a lo largo del experimento, observada en los animales sometidos a alta densidad, llegó a ser significativa en la mayoría de los grupos experimentales (Tabla IV.8.). El menor IHS se debe a una disminución del tamaño del hígado más que a la del tamaño corporal. Este hecho habría que atribuirlo a una movilización de las reservas energéticas. De hecho, ambos índices (FC e IHS) son una medida grosera del nivel de reservas energéticas o del estado nutritivo del los peces (Goede y Barton, 1990). En la mayoría de los estudios (70%) en los que se contempla el FC, se ha detectado un efecto negativo de la densidad de población (ver revisión de Ellis *et al.*, 2002). La reducción del IHS al aumentar la densidad de peces ha sido descrita en la trucha arco iris (Leatherland y Cho, 1985) aunque no aparecía asociada a los niveles de lípidos y glucógeno, que no se alteraron significativamente. No obstante, Papoutsoglou *et al.*, (1987) encontraron una reducción significativa del contenido de lípidos hepáticos al aumentar la densidad de la población de peces. En nuestro caso, el valor inferior en los niveles de glucógeno hepático mostrado al final del período experimental en los grupos sometidos a alta densidad, como ya se observó en estudios previos (Vijayan *et al.*, 1990; Skejervold *et al.*, 1999, 2001), podría explicar los valores más bajos de IHS en estos grupos de animales.

Los valores obtenidos en cuanto a la variación de peso, reflejan que los animales sometidos a altas densidades presentaron, por lo general, una mayor dispersión en el peso, que se pone de manifiesto, en la mayoría de los casos, por un aumento en el coeficiente de variación (Figuras IV.1. y IV.2.).

Como es sabido, los salmónidos son animales que presentan una gran territorialidad, lo que explica que, en circunstancias en las que el espacio está limitado, se genere un comportamiento agresivo que de lugar a relaciones de dominancia/subordinación entre los individuos (Ellis *et al.*, 2002). En este ensayo, en condiciones de alta densidad, se observa que, para la mayoría de los grupos alimentados con las distintas dietas, el intervalo de peso está en torno a 80-210 g, mientras que a baja

densidad, por lo general, está comprendido entre 100-180 g, poniéndose de manifiesto en este último caso un rango de variabilidad menor. Ya que los animales fueron alimentados a saciedad, las diferencias observadas entre grupos serían achacables a interacciones sociales más que a una baja disponibilidad de alimento. Además, una vez establecidas las jerarquías, los peces dominados pueden sufrir un descenso en la ingesta como consecuencia de un posible estrés, a lo que se une un aumento de actividad y gasto energético, así como un descenso en la eficacia alimentaria, que explicaría la supresión del crecimiento en estos individuos (Irwin *et al.*, 1999; Ellis *et al.*, 2002). Según Pottinger y Pickering (1992) el establecimiento de jerarquías podría explicarse por una respuesta endocrina, ya que los animales con tendencia a la sumisión presentan valores más altos de cortisol. Esto podría estar relacionado, a nivel del sistema nervioso central, con la presencia de determinados neurotransmisores que desarrollarían, según el caso, un comportamiento agresivo (dopamina) o sumiso (serotonina) en el animal (Overli *et al.*, 1999; Höglund *et al.*, 2001; Pottinger y Carrick, 2001a; Sloman *et al.*, 2001).

Pottinger y Pickering (1992) también pusieron de manifiesto la aparición de relaciones de dominancia en condiciones en las que se agrupaban parejas o grupos de cinco animales por cuba, no existiendo éstas cuando el número de animales se elevaba a diez. Esto podría justificar una ausencia de jerarquías en condiciones de baja densidad, donde, con unos veinte animales por cuba al inicio del experimento, se observó, como ya se ha comentado previamente, una menor variabilidad en los pesos con respecto a los grupos sometidos a alta densidad.

Cabe destacar que a baja densidad el grupo de animales alimentados con la dieta +E-HUFA muestra valores de variabilidad superiores al los otros grupos. En principio, no se encuentra explicación a que la dieta tenga algún efecto relacionado con el establecimiento de jerarquías y aumento en la dispersión de peso. Por otro lado, aunque los grupos de animales, en la formación de lotes al inicio del experimento, fueron lo más homogéneos posibles con relación al peso, en determinados casos, cierta variabilidad inevitable entre ellos podría influir en los valores de dispersión al final del experimento.

Por lo general, los resultados obtenidos en aquellos animales sometidos a condiciones de alta densidad se corresponden con el modelo propuesto por Jobling (1995), donde un descenso en los valores de crecimiento, asociado a un elevado coeficiente de variación, confirma la presencia de interacciones sociales entre los peces.

La mortalidad (Tabla IV.7.) fue mayor en truchas alimentadas con la dieta -E+HUFA sometidas a estrés por alta densidad. Esto parece lógico ya que las necesidades de vitamina E son mayores cuando se ingieren dietas ricas en HUFAs (Watanabe, 1987; Sargent *et al.*, 1989), lo que provocaría que estos animales se vean más afectados por la carencia de dicha vitamina.

Efectivamente, y como se discutirá más adelante, los resultados obtenidos en los parámetros hematológicos ponen de manifiesto una serie de alteraciones que podrían ser la causa de una mortalidad más elevada en este grupo. Asimismo, el hígado de la mayoría de estos animales presentó una coloración amarillenta (Imagen IV.1.), posible reflejo de daños oxidativos, que en algunos casos estarían asociados a una mayor degradación de hemoglobina ligada a un posterior incremento de bilirrubina (Yigit *et al.*, 1999), lo que podría explicar la presencia de cierta secreción amarilla en la cavidad abdominal de alguno de estos animales (Imagen IV.2., IV.3.). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Pearce y colaboradores (2003), que demostraron en trucha arco iris que la ingesta de dietas deficientes en vitamina E provoca una anemia severa y disfunción hepática asociado a un incremento de la mortalidad.

A todo esto, hay que sumar las condiciones de alta densidad en la que se encuentran estos animales. Es bien conocido que en situaciones de estrés se produce una activación de determinadas vías metabólicas destinadas a la obtención de energía, las cuales pueden favorecer un incremento de los procesos oxidativos y generación de radicales libres (Ross *et al.*, 2001; Guerriero *et al.*, 2002). En estas circunstancias, la carencia de vitamina E repercutiría negativamente al no ejercer su efecto protector sobre la oxidación de membranas celulares (Udilova *et al.*, 2003) y, por otro lado, disminuyendo la resistencia a situaciones de estrés que, como ya se observó previamente (Montero *et al.*, 1998; 2001b), era estimulada de manera positiva por dicha vitamina.

En relación a los valores de composición corporal, al final del período experimental, se puso de manifiesto una tendencia general a aumentar los niveles de lípidos, asociada a un descenso de humedad, sin observarse cambios atribuibles a la densidad o tipo de dieta consumida (Tabla IV.9.).

Es bien conocida la influencia de la dieta en la composición de los ácidos grasos presentes en distintos tejidos de los peces (Olsen *et al.*, 1999). En nuestro caso, se observa que, efectivamente, el tipo de fuente lipídica utilizada (aceite de pescado o de soja) condiciona el perfil de los distintos ácidos grasos presentes en hígado y músculo (Tablas IV.11, 12, 13 y 14). De esta manera, se ha podido observar que la mayor presencia de 14:0 y de 16:1n7 en aceite de pescado se pone de manifiesto, con independencia de la densidad, en el músculo de animales alimentados con dietas con alto contenido en HUFAs, detectándose en hígado una tendencia a elevar el porcentaje de 16:1n7 en los animales sometidos a baja densidad.

Una de las mayores diferencias observadas entre dietas son los niveles de linoleico (18:2n6), ácido graso que se encuentra en una cantidad cinco veces superior en el aceite de soja con respecto al de pescado, lo que explicaría que tanto en hígado como en músculo, sin diferencias asociadas a la densidad de peces, se observe un porcentaje significativamente más alto de este ácido graso en animales alimentados con dietas -HUFA. Estos resultados son similares a los obtenidos en trucha arco iris (Caballero *et al.*, 2002) y otras especies como el rodaballo (Regost *et al.*, 2003) alimentadas con dietas elaboradas con aceite de pescado o de origen vegetal como el de soja.

Como es bien sabido, el linoleico es el precursor de la serie n-6 de ácidos grasos poliinsaturados, lo que, efectivamente, explica que los animales que consumieron dietas elaboradas con aceite de soja (-HUFA) presenten valores detectables del 20:2n6 en ambos tejidos, con independencia de la densidad de peces. Además, el hecho de que en la dieta no se encuentren niveles apreciables de este ácido graso, confirma su origen endógeno a partir del precursor aportado en la dieta (18:2n6). Es curioso señalar que, en el caso del ácido araquidónico (20:4n6), de gran utilidad en la síntesis de fosfolípidos de membrana como el fosfatidil inositol (PI), ocurre algo similar, ya que a pesar de

detectarse su presencia en aceite de pescado, el análisis de los tejidos refleja valores significativamente más altos en los animales alimentados con dietas -HUFA, lo que también pone de manifiesto la utilización del 18:2n6 como precursor para su síntesis (Ruyter *et al.* 2000b). Este efecto se observa en músculo con independencia de la densidad, poniéndose también de manifiesto en hígado de animales sometidos a baja densidad. En cuanto al 22:4n6, este efecto no se reflejó de manera tan clara, ya que, en el músculo, el porcentaje de este ácido graso no fue superior en los animales que consumieron dietas -HUFA, observándose incluso, en condiciones de baja densidad, valores significativamente inferiores en estos animales.

En cuanto al ácido linolénico (18:3n3) consumido en dieta, el hecho de que sus niveles en el aceite de soja superen en más de 6 veces a los del aceite de pescado, sólo se pone de manifiesto en músculo de animales sometidos a baja densidad, donde los animales alimentados con la dieta +E-HUFA presentan de manera significativa niveles detectables de este ácido graso. Esto podría explicar un mayor efecto de la dieta en estos animales que no están sometidos a situaciones de estrés. El hecho de que en los animales consumidores de dietas -E-HUFA no aparezcan trazas de este ácido graso hace suponer que la vitamina E podría tener un efecto preventivo en la oxidación de estos ácidos grasos poliinsaturados, que como sabemos tienen una mayor tendencia a la oxidación (Hamre y Lie, 1995; Stéphan, *et al.*, 1995).

Los valores de 20:5n3 (EPA) muestran que, a pesar de contar con niveles muy superiores de 18:3n3 en dietas -HUFA, como posible precursor de la serie de PUFAs n-3, la destacada presencia en aceite de pescado de 20:5n3 podría ser la causa de que sus niveles sean más altos en hígado y músculo de animales alimentados con dietas +HUFA en condiciones de baja densidad, observándose de manera significativa en músculo. Esto sugiere una incorporación directa de éste ácido graso a partir de la dieta, más que una síntesis endógena desde sus precursores. Por otro lado, aunque en condiciones de alta densidad la tendencia es similar, se observa que los animales alimentados con dietas -E+HUFA sufren un descenso notable de los niveles de 20:5n3 con respecto a los de las otras dietas +HUFA, que fue significativo en hígado. Esto podría deberse a una mayor oxidación de este ácido graso, ligada a una deficiencia de

vitamina E, que a su vez se vería incrementada por una situación de estrés, como ya se ha observado en estudios previos (Lindström-Seppä *et al.*, 1996; Tort *et al.*, 1996), lo que de nuevo pone de manifiesto la importancia de la vitamina E como molécula protectora en la oxidación de HUFAs.

En cuanto al 22:6n3 (DHA), los niveles claramente superiores de este ácido graso observados en músculo de animales que consumieron dietas +HUFA (aceite de pescado) y que fueron estadísticamente significativos a baja densidad, de nuevo muestran la influencia del porcentaje de ácidos grasos en la dieta sobre la proporción de éstos en el animal (Montero *et al.*, 2001a). Experimentos de Regost y colaboradores (2003) ponen de manifiesto que la concentración de 22:6n3 es mayor en hígado de peces alimentados con dietas ricas en aceite de pescado con respecto a las de soja. Esto parece lógico ya que el 22:6n3 sólo está presente en el aceite de pescado, no encontrándose, según los análisis realizados, trazas en el de soja. Por otro lado, a pesar de encontrarse en el aceite de soja altos niveles de su precursor (18:3n3), el hecho de que en grupos alimentados con dietas -HUFA no aparezcan niveles más altos de 22:6n3 podría deberse a que una elevada presencia de 18:2n6 en este aceite, generara una competencia por la  $\Delta 6$ -desaturasa entre ambos precursores (18:2n6 y 18:3n3) y que, a pesar de tener el precursor n-3 una mayor afinidad por esta enzima, la síntesis de ácidos grasos se desviara hacia la serie n-6 (Sargent *et al.*, 1989). Esto no implica que no se produzca una síntesis endógena de HUFAs n-3 en animales consumidores de aceite de soja, ya que en ambos tejidos se observan niveles de 22:6n3, aún careciendo la dieta de éstos. A este respecto, es interesante destacar que, en hígado de animales sometidos a baja densidad, la concentración de 22:6n3 es similar en dietas +HUFA y -HUFA, observándose incluso un descenso de sus niveles en dietas -E+HUFA, debido a una posible oxidación de estos. A alta densidad de peces, el comportamiento es similar en este grupo, observándose también valores significativamente más bajos en los animales alimentados con dietas -E-HUFA, posiblemente asociado a la carencia de 22:6n3 en dieta, como ya se vio en músculo, a lo que habría que sumar una mayor predisposición a la oxidación debido a la deficiencia de vitamina E.

El porcentaje general de ácidos grasos saturados, MUFAs, PUFAs y HUFAs, muestra que el efecto de la dieta en la composición en ácidos grasos se hace patente en ambos tejidos (ver Figuras V.1. y V.2.). En músculo de animales sometidos a alta densidad, los análisis estadísticos revelan un menor porcentaje de ácidos grasos saturados en peces alimentados con dietas elaboradas con aceite de soja (-HUFA), posiblemente asociado a una menor proporción de los ácidos grasos 14:0 y 16:0 en dieta. Estos grupos muestran valores de PUFAs significativamente más altos en hígados de animales sometidos a baja densidad, observándose una tendencia similar en músculo a ambas densidades, debido al alto porcentaje de 18:2n6 aportado por estas dietas. En cuanto a los niveles de HUFAs, aunque en hígado de animales sometidos a alta densidad existen diferencias significativas entre dietas, de nuevo, el músculo es el tejido que refleja de manera más clara la influencia de la dieta en el contenido de ácidos grasos tisular, con independencia de la densidad de peces. El hecho de que los efectos de la dieta se pongan de manifiesto de manera más acusada en músculo, en cierto modo, parece lógico, ya que en este tejido es donde se depositan los ácidos grasos, mientras que el hígado es el principal lugar de síntesis/degradación de estos y el órgano regulador de los niveles de lipoproteínas plasmáticas.

Con relación a la densidad, no se observa una influencia clara. La presencia de ácido araquidónico (20:4n6) observada en hígados de animales alimentados con dietas -HUFA en condiciones de baja densidad no se pone de manifiesto al someter a los animales a alta densidad. Parece ser que, a pesar de presentar mayor porcentaje de su precursor (18:2n6, en animales alimentados con dietas -HUFA), a alta densidad se podrían afectar las vías de síntesis de araquidónico, produciéndose una oxidación de los fosfolípidos de membrana que lo contienen (Dwight y Hendry, 1995) o bien, según se ha observado en experimentos previos (Montero *et al.*, 2001a), siendo utilizado con fines energéticos.

En líneas generales, se podría resumir que el músculo refleja de manera más clara que el hígado el efecto de la composición de la dieta en el perfil de sus ácidos grasos; si bien, este efecto también se observa a nivel hepático con determinados ácidos grasos. Además de por contenido de ácidos grasos en la dieta, la composición tisular de

estos puede verse afectada por factores que den lugar a alteraciones metabólicas (como una situación de estrés crónico) y desequilibrios en los procesos oxidativos, ligados a la presencia de ácidos grasos en dieta con mayor predisposición a ser oxidados y la deficiencia de vitaminas antioxidantes en ésta.

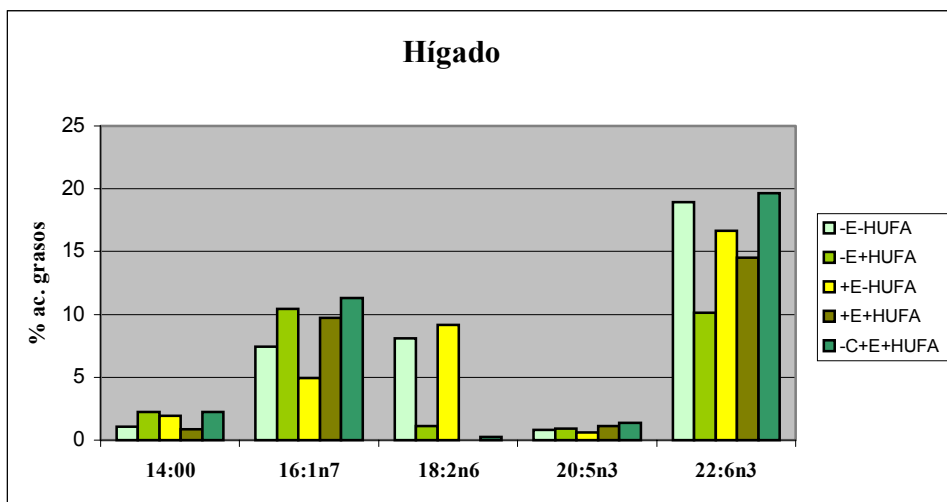


Figura V.1.- Porcentaje de los principales ácidos grasos en los lípidos hepáticos que muestran diferencias entre dietas en animales sometidos a baja densidad.

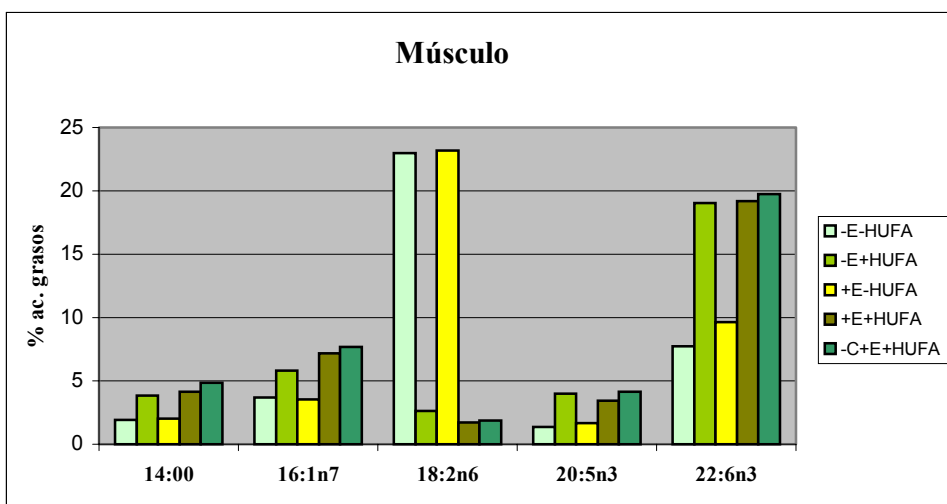


Figura V.2.- Porcentaje de los principales ácidos grasos en los lípidos musculares que muestran diferencias entre dietas en animales sometidos a baja densidad.



## 2.2. ESTUDIO HISTOLÓGICO SOBRE EL EFECTO DE LAS DIFERENTES DIETAS EXPERIMENTALES EN HÍGADO Y BRANQUIAS DE TRUCHA ARCO IRIS

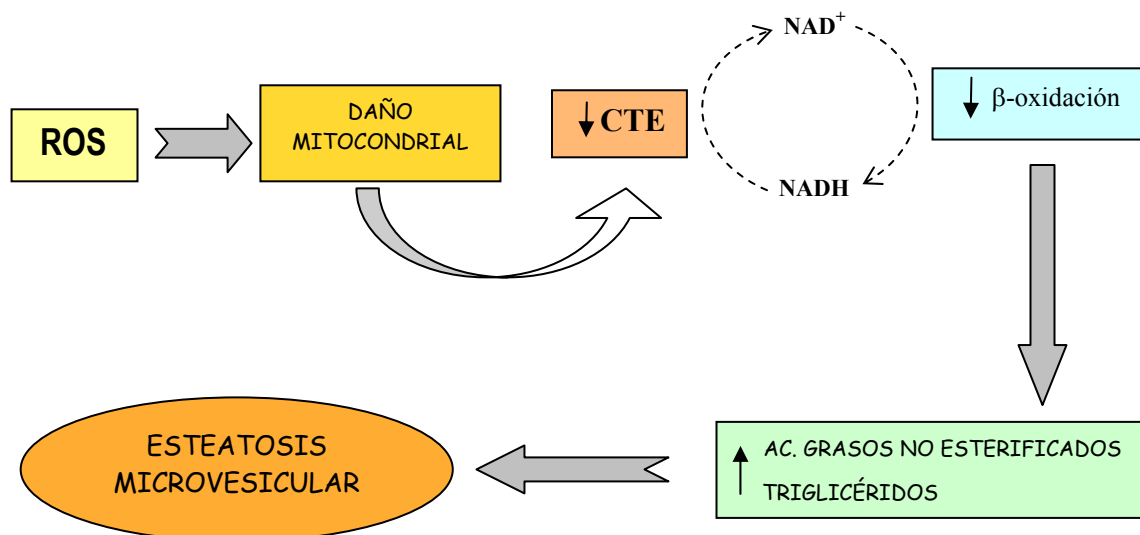
### *HÍGADO*

En todos los tejidos se observa una gran acumulación de lípidos (esteatosis) que, en la mayoría de los grupos (excepto -E+HUFA), se manifiesta en las células con la presencia de una gran gota lipídica que llega a desplazar al núcleo de su posición central a la periferia del hepatocito (Imagen IV.6. y IV.8.). Este tipo de esteatosis, conocida como macrovesicular, ocurre como consecuencia de varios factores tales como una acumulación de triglicéridos asociada a un exceso de lípidos en dieta, problemas en la secreción de lipoproteínas en el hígado (asociados a defectos en la síntesis de la apoproteína o bien a las enzimas que catalizan la unión de éstas con los lípidos para formar las lipoproteínas), y que también, en algunos casos, puede verse incrementado por leves daños en los procesos de  $\beta$ -oxidación (Lemaire *et al.*, 1991; Fromenty y Pessayre, 1997; del Moral, 1999; Montero *et al.*, 2001a; Caballero *et al.*, 2002). Según los resultados obtenidos, la influencia individual de los niveles de HUFAs o de vitaminas E o C no parece ser determinante en estos efectos, ya que los patrones histológicos son similares en la mayoría de los grupos, lo que podría deberse a los altos niveles de lípidos en dieta que la trucha almacenaría de esta forma en hepatocitos.

En el caso de los animales alimentados con dietas -E+HUFA, el aspecto mostrado por este tejido es diferente. En este grupo se observa también una acumulación lipídica, aunque la disposición de los depósitos grasos es en forma de pequeñas y abundantes vesículas (Imagen IV.7. y IV.9.). Estas vesículas no alcanzan un tamaño superior al núcleo, permaneciendo éste, en la mayoría de los casos, en una posición central. Esto lleva a pensar que se trate de un proceso de esteatosis microvesicular, proceso de cierta gravedad, ya que, entre otros aspectos, se asocia a situaciones en las que se produce un incremento en la formación de radicales libres y por tanto, un riesgo en la generación de daños oxidativos a nivel mitocondrial

(Fromenty y Passayre, 1995; Day and James, 1998). A este respecto, ya en mamíferos se puso de manifiesto el papel de la vitamina E previniendo la formación de esteatosis (Benedetti *et al.*, 1974) y daños a nivel mitocondrial (Mansouri *et al.*, 2001), lo que justificaría el hecho de que el grupo -E+HUFA, con una alta tendencia a la oxidación, presente esta disposición a nivel celular.

Es bien sabido que el ADN mitocondrial presenta cierta vulnerabilidad a ser oxidado, ya que carece de histonas que lo protegen, está próximo a una zona donde se encuentra la principal fuente de radicales libres (cadena de transporte mitocondrial) y presenta unos procesos de reparación menos eficientes que el ADN nuclear (Fromenty y Passayre, 1997). Con relación a esto, se ha puesto de manifiesto que, deterioros en la cadena de transporte mitocondrial afectan de manera indirecta a los procesos de  $\beta$ -oxidación, ya que la primera dejaría de proporcionar el  $\text{NAD}^+$  necesario para la oxidación de ácidos grasos, provocando una inhibición de esta ruta catabólica. La consecuente acumulación de ácidos grasos no esterificados que no pueden ser oxidados determina que parte de ellos se esterifiquen a triglicéridos, coexistiendo ambos en la célula (Berson *et al.*, 1998; Fromenty y Passayre, 1997).



Con relación a la presencia de pequeñas vesículas de lípidos, una de las hipótesis propuestas se basa en que, debido al carácter apolar de los triglicéridos, estos se dispondrían formando agrupaciones, a su vez rodeadas por los ácidos grasos libres, los cuales orientarían sus grupos apolares hacia el núcleo de triglicéridos y los polares hacia la cara externa. Esta disposición explicaría el aspecto multivesiculado observado en estos tejidos (Fromenty y Passayre, 1997).

Uno de los factores que apoyaría la existencia de daños a nivel mitocondrial, es la acumulación del ácido graso saturado 16:0, ya que éste es uno de los sustratos preferenciales en el catabolismo de ácidos grasos en mitocondrias (Henderson y Sargent, 1985; Caballero *et al.*, 2002). En nuestro caso, los hígados de los animales alimentados con dietas -E+HUFA a baja densidad presentan, aunque no de manera significativa, los niveles más altos del 16:0 (Tabla IV.12.) con respecto a los otros grupos, lo que indicaría una acumulación de estos por fallos en los procesos de degradación.

La acumulación de glóbulos rojos en la vena central de los lobulillos hepáticos observada en los grupos -C+E+HUFA (Imagen IV.10.) puede ser consecuencia de las deficiencias asociadas a los procesos de síntesis de colágeno, como consecuencia de la carencia de vitamina C (Chávez de Martínez, 1990). Esto podría dar lugar a que la integridad y resistencia del tejido endotelial se viera afectada provocando una acumulación de células sanguíneas en esta zona.

En cuanto a la presencia en -E+HUFA de células con granulaciones de color marrón, podría deberse a la acumulación de ciertas sustancias de deshecho o pigmentos, o bien estar relacionado con algún tipo de patología en esa zona. Esto parece lógico, ya que, en estas condiciones de acumulación lipídica, el hígado presenta una mayor propensión a daños oxidativos (Lettéron *et al.*, 1996) que se ve incrementada, en este grupo, por niveles deficientes de vitamina E (Roem *et al.*, 1990) y una mayor producción de radicales libres ligada al mal funcionamiento de la cadena de transporte mitocondrial (Berson *et al.*, 1998) que, en este caso, se vería acentuada por la presencia de ácidos grasos altamente oxidables (HUFAs). Esto podría explicar el color

amarillento mostrado en los hígados de los animales que consumieron esta dieta (Imagen IV.1.), coincidiendo con los resultados obtenidos por Pearce y colaboradores (2003) que observaron el mismo efecto en hígados de animales que consumieron dietas deficientes en vitamina E.

### *BRANQUIAS*

De los resultados obtenidos en branquias, cabe destacar la presencia de abundantes dilataciones vasculares en las lamelas de los animales +E+HUFA y -C+E+HUFA, siendo más abundantes en el primer caso (Imagen IV.12. y IV.13.). A este respecto, sólo se encuentra una posible explicación en los grupos carentes de vitamina C, como consecuencia de un deterioro en la síntesis de colágeno, que da lugar a un engrosamiento e hipertrofia branquial (Dabrowski *et al.*, 1990; Adham *et al.*, 2000). Como consecuencia de esto, también se explica la gran cantidad de glóbulos rojos observados en estas dilataciones, aunque también son abundantes en aquellas lamelas que no se encuentran dilatadas, lo que podría ser indicativo de un incipiente deterioro en éstas. En este mismo grupo, se observan numerosos eosinófilos, en respuesta a una reacción inflamatoria debida a posibles daños en la zona. Estas células también se encuentran en los grupos de peces alimentados con dietas -E-HUFA.

En el caso de los animales -E+HUFA, no se presentan dilataciones vasculares en las lamelas, aunque el borde de éstas muestra un aspecto rizado (Imagen IV.14.). Parece ser que en estos animales la deficiencia de vitamina E no afectó de la misma manera que la de vitamina C.

En ambos casos, la hipertrofia lamelar y la aparición de bordes rizados ejercen un efecto negativo en los procesos de intercambio de gases y osmorregulación, ya que un estancamiento de glóbulos rojos dificultaría la velocidad del flujo sanguíneo y la presencia de bordes rizados podría dar lugar a un descenso de la superficie de intercambio.

Por otro lado, el resto de los grupos alimentados con dietas con bajos niveles de HUFAs (-E-HUFA, +E-HUFA) presentaron un aspecto normal en las lamelas, no observándose efecto de la vitamina E sobre ellas (Imagen IV.11.). Como se ha observado en los anteriores grupos, parece que la presencia de HUFAs puede predisponer al animal a presentar alguna alteración en la morfología de las branquias.

### 2.3. EFECTO SOBRE PARÁMETROS E ÍNDICES HEMATOLÓGICOS

De entre todos los aspectos evaluados en el presente estudio, cabe destacar, en primer lugar, que, tal como refleja el análisis estadístico (Tablas IV.15, IV.16. y anexo), fue a nivel hematológico donde claramente se puso de manifiesto la influencia tanto de la composición de la dieta como de la densidad de peces, así como la interacción entre ambos factores.

Comenzando por los resultados obtenidos en condiciones de densidad normal y, por tanto, evaluando la posible influencia de la composición de la dieta, el efecto más pronunciado se refiere a la anemia observada en los animales alimentados con la dieta -E+HUFA, que ya era manifiesta a los 21 días del experimento, persistiendo hasta el final del mismo, y que se refleja también en los niveles de hematocrito y hemoglobina, muy inferiores a los presentados por el resto de grupos experimentales. El recuento de glóbulos rojos también se vio afectado en este grupo, si bien este efecto sólo se evidenció al final del experimento, donde los valores de este parámetro fueron significativamente inferiores a los del resto de los grupos, a excepción del alimentado con la dieta -C+E+HUFA.

Los índices derivados de estos parámetros indican que el cuadro anémico resultante de la ingestión de la dieta -E+HUFA se caracterizó por la presencia de glóbulos rojos más pequeños, como indica el menor valor del volumen corpuscular medio (VCM), y con un menor contenido en hemoglobina corpuscular media (HCM),

inferior al del resto de los grupos experimentales. Se sabe que los glóbulos rojos de los peces son liberados desde los tejidos eritropoyéticos en una fase temprana del desarrollo, y que es en el torrente circulatorio donde maduran, lo que viene acompañado de un aumento de volumen (Härting, 1978; Lane *et al.*, 1982) y un acúmulo de hemoglobina (Keen *et al.*, 1989; Speckner *et al.*, 1989). Según esto, los índices obtenidos indicarían que en la sangre de este grupo habría un predominio de eritrocitos inmaduros.

La mayoría de los estudios en los que se ha evaluado la influencia de la vitamina E sobre los parámetros hematológicos de los peces, coinciden con los resultados obtenidos en el sentido de que uno de los principales signos de deficiencia de esta vitamina es la anemia severa caracterizada por un descenso del número de eritrocitos y de su contenido en hemoglobina, así como por un aumento de la proporción de eritrocitos inmaduros (Poston *et al.*, 1976; Cowey *et al.*, 1984; Moccia *et al.*, 1984; Hamre *et al.*, 1994; Bai y Lee, 1998; Pearce *et al.*, 2003).

La vitamina E actúa como un antioxidante liposoluble protegiendo las membranas biológicas y las lipoproteínas de la oxidación. Este papel se torna fundamental en el caso de los eritrocitos cuyas membranas incorporan altas proporciones de ácidos grasos poliinsaturados que, a su vez, son altamente susceptibles a la oxidación (Roberts y Bullock, 1989). La carencia de esta vitamina afecta a la integridad de las membranas de los eritrocitos maduros y las nuevas células que se liberan al torrente circulatorio son degenerativas y no llegan a completar su maduración, lo que da lugar a un aumento de la hemólisis (Cowey *et al.*, 1981; Moccia *et al.*, 1984; Roem *et al.*, 1990; Montero *et al.*, 2001b; Pearce *et al.*, 2003); además, también se ha indicado que, bajo esta situación carencial, disminuye la producción de eritrocitos debido a un agotamiento de los tejidos eritropoyéticos (Moccia *et al.*, 1984). Basándonos en esta información, se podría pensar que la mayor degradación de las células circulantes, junto con este menor reemplazo celular, serían responsables de la persistente anemia microcítica observada en el grupo -E+HUFA.

Por lo que se refiere a la hemoglobina, algunos autores han indicado que, en peces, la carencia de vitamina E puede afectar tanto a la síntesis como a la degradación de este pigmento respiratorio, especulándose que el ambiente intracelular más oxidado, derivado del estado carencial, causaría una menor movilización de hierro para la síntesis del grupo hemo, así como una mayor desnaturalización de la hemoglobina ya sintetizada (Moccia *et al.*, 1984; Hamre *et al.*, 1994; Bai y Lee, 1998). Como se ha indicado, el valor del índice HCM obtenido en estos animales indica que sus eritrocitos contenían menos hemoglobina y, dado que los parámetros determinados no nos permiten constatar este hecho, no podemos descartar que su síntesis se viera afectada como consecuencia de la deficiencia de vitamina E; de cualquier modo, otra de las posibles causas podría residir en la aparente mayor presencia de eritrocitos inmaduros en la sangre de estos animales puesto que, como ya se ha indicado, tanto en trucha arco iris como en otras especies de peces, el contenido de hemoglobina de estas células inmaduras es menor, ya que continúan acumulándola hasta su total maduración.

Continuando con los animales mantenidos a densidad normal, cabe destacar los resultados obtenidos para aquellos que ingirieron la otra dieta sin suplementación de vitamina E (-E-HUFA), que difieren de lo expuesto hasta ahora, ya que los parámetros hematológicos no reflejaron los signos carenciales observados en los animales alimentados con la dieta -E+HUFA. Sí se observó, sobre todo al final del periodo experimental, un descenso similar en el índice VCM, lo que denotaría un aumento gradual del número de eritrocitos inmaduros en este grupo.

La única diferencia entre ambas dietas residió en la fuente lipídica usada en su fabricación que, a su vez, determinó el nivel de HUFAs en las mismas. Por lo que se refiere al aspecto concreto de la hematología, los HUFAs son componentes fundamentales de las membranas de los eritrocitos, desempeñando un importante papel a nivel estructural y fisiológico, pero, por su tendencia a la oxidación, requieren la presencia de sustancias que los protejan, preservando la integridad de las membranas de estas células. Ya se ha comentado el papel fundamental que, en este sentido, juega la vitamina E, y numerosos estudios en peces han demostrado que las necesidades de esta vitamina están directamente relacionadas con el nivel de ácidos grasos insaturados en la

dieta y con su grado de insaturación (Woodall *et al.*, 1964; Watanabe *et al.*, 1977, 1981; Cowey *et al.*, 1983; Satoh *et al.*, 1987; Roem *et al.*, 1990; Shimeno, 1991; Puangkaew *et al.*, 2004). Dado que las dos dietas sin suplementación de vitamina E fueron ingeridas en la misma proporción, parece claro que sería la mayor proporción de HUFAs en la dieta -E+HUFA lo que habría propiciado la aparición de los signos de deficiencia a nivel hematológico, lo que coincide con lo encontrado en la práctica totalidad de estudios similares realizados en peces (Cowey *et al.*, 1983; Roem *et al.*, 1990; Kurata *et al.*, 1994; Villarini *et al.*, 1998) rata (Mouri *et al.*, 1984; Maydani *et al.*, 1987; Ando *et al.*, 1998; Oarada *et al.*, 2000) y humanos (Maydani *et al.*, 1991; Horrocks y Yeo, 1999) acerca de que el papel de la vitamina E, como protector de las membranas eritrocitarias frente a la oxidación, críticamente modulado por la relación vit.E/HUFAs de la dieta.

En cuanto a la dieta no suplementada con vitamina C, tras 21 días ingiriéndola, los animales no mostraron alteraciones hematológicas que pudieran revelar algún síntoma de deficiencia de la misma a este nivel; sin embargo, al final del periodo experimental todos los parámetros hematológicos en este grupo fueron significativamente inferiores a los presentados por los animales alimentados con la dieta considerada como su control (+E+HUFA), aunque no tan bajos como los obtenidos con la dieta -E+HUFA, a excepción del recuento de glóbulos rojos, que fue similar en ambos grupos. Si bien en la mayoría de los estudios que evalúan la deficiencia de vitamina C en peces se obtienen alteraciones hematológicas que revelan procesos anémicos (Andrews y Murai, 1975; Hilton *et al.*, 1978; Lim y Lovell, 1978; Agrawal y Mahajan, 1980; Frischknecht *et al.*, 1994; Soliman *et al.*, 1994; Adham *et al.*, 2000), el hecho de que la deficiencia de vitamina C sea responsable directa de estos síntomas aún se cuestiona (Adham *et al.*, 2000) y son muchos los autores que indican que, más que una deficiencia de vitamina C, esas alteraciones hematológicas reflejarían una deficiencia de vitamina E desarrollada de forma secundaria por los animales (Sandnes *et al.*, 1990; Hamre *et al.*, 1997; Shiau y Hsu, 2000). En este sentido, un hecho ampliamente demostrado en los peces es la interacción de ambas vitaminas y su papel fundamental ejerciendo una protección sinérgica de las membranas celulares. La vitamina E es la principal sustancia antioxidante unida a las membranas y está presente en la fase lipídica de éstas, mientras que la vitamina C es hidrosoluble y, además de



actuar como antioxidante en la sangre (Niki *et al.*, 1988; Frei *et al.*, 1989), ya en 1968, Tappel propuso que esta vitamina, presente en la fase acuosa, regeneraría la vitamina E de las membranas a partir de la forma oxidada generada tras su actuación sobre los lípidos oxidados de las mismas, ejerciendo la vitamina C, por tanto, un efecto de ahorro de la vitamina E; así mismo, se ha encontrado que la vitamina C protege de los síntomas carenciales de vitamina E (Frischknecht *et al.*, 1994). Como se ha indicado, estos efectos han sido ampliamente demostrados en peces, si bien el nivel relativo de ambas vitaminas es determinante, encontrándose que la actuación de la vitamina C a este nivel es dosis-dependiente (Hamre *et al.*, 1997) de modo que, en la mayoría de los estudios en los que se inducen estados carenciales de vitamina E, se ha encontrado que para que el efecto de ahorro que ejerce la vitamina C se ponga de manifiesto, los niveles de suplementación de esta vitamina deben ser muy superiores a las necesidades estimadas como normales. Puede que en los animales que ingirieron la dieta -C+E+HUFA la tasa de regeneración de vitamina E se viera afectada, de modo que las alteraciones descritas podrían ser síntomas de una deficiencia de vitamina E desarrollada indirectamente como consecuencia de la deficiencia de vitamina C. A este respecto, es interesante destacar la presencia de un mayor porcentaje de hemorragias externas en peces que consumieron esta dieta, lo que parece ser indicativo de la influencia de esta vitamina protegiendo las membranas y tejidos, ya sea por su importancia en la síntesis de colágeno o bien de manera indirecta en la regeneración de la vitamina E (Imagen IV.4.). El hecho de que los animales que consumieron dietas deficientes en vitamina E no mostraran estos efectos lleva a pensar en una posible interferencia en la síntesis de colágeno asociada a carencias en la vitamina C. De cualquier modo, se puede observar que el cuadro anémico de estos animales difiere considerablemente del observado en los que ingirieron la dieta -E+HUFA ya que no se vieron afectados ni el tamaño de los eritrocitos (VCM) ni el contenido de hemoglobina de los mismos (HCM), aunque sí se afectó el contenido total de hemoglobina en la sangre debido, probablemente, al descenso del número de eritrocitos circulantes observado, similar al de los animales que ingirieron la dieta -E+HUFA. Por tanto, la anemia derivada de la ingestión de la dieta carente de vitamina C sería hipocrómica-normocítica, en contraposición a la observada en el grupo -E+HUFA que era hipocrómica-microcítica. Resultados similares, en cuanto al tipo de anemia derivada de la carencia de vitamina C en la dieta, fueron obtenidos en

*Channa punctatus* (Agrawal y Mahajan, 1980). Según algunos autores, las alteraciones hematológicas derivadas de la carencia de vitamina C podrían deberse a la implicación de esta vitamina en el metabolismo del hierro, indicando que, bajo ese estado carencial, se produce una menor liberación del mismo a partir de las reservas del retículo endotelial, lo que daría lugar a una producción reducida de eritrocitos (Hilton *et al.*, 1978).

En cuanto al posible papel de la vitamina C compensando la deficiencia de vitamina E de las dietas, a la vista de los resultados, está claro que no se puso de manifiesto en el grupo -E+HUFA. Con respecto a los animales que ingirieron la dieta -E-HUFA, no podemos descartar que la práctica ausencia de signos carenciales en este grupo pueda deberse a este hecho pero, como ya se ha indicado, la baja proporción de HUFAs en la dieta podría ser determinante.

Por último, concluyendo con los resultados obtenidos en condiciones de densidad normal, cabe decir que, en ausencia de deficiencias vitamínicas (+E+HUFA y +E-HUFA) no se observó ningún efecto importante derivado de la sustitución de aceite de pescado por aceite de soja en las dietas.

Por lo que respecta a la posible influencia de la densidad de peces a nivel hematológico, el análisis estadístico general (anexo a Tablas IV.15. y IV.16.) pone de manifiesto que el aumento de densidad ejerció una clara influencia sobre los parámetros e índices estudiados, aunque, si se observan los datos individuales (Tablas IV.15. y IV.16.), las alteraciones fueron más acusadas y generalizadas a los 21 días.

Hay que decir que, como ya se indicó anteriormente, se observó una clara interacción entre la composición de la dieta y la densidad; es por ello que, una vez analizado el efecto general del aumento de la densidad de peces se discutirán las particularidades observadas en cada uno de los grupos experimentales.

A excepción del grupo -E-HUFA que, como se comentará más adelante, mostró un comportamiento diferente a nivel hematológico, en términos generales, las

alteraciones derivadas del aumento de la densidad de peces se tradujeron en un aumento del nivel de hemoglobina en sangre (g/100 ml) y del número de eritrocitos circulantes, mientras que el valor hematocrito apenas se vio afectado. Respecto a los índices hematológicos derivados de estos parámetros, el efecto más marcado se refiere a la disminución del VCM en la práctica totalidad de los grupos mantenidos a alta densidad. En cuanto a la hemoglobina, el valor de HCM reflejó que, mientras en unos grupos el contenido celular de la misma disminuyó, en otros no se vio alterado respecto a los animales mantenidos a densidad normal e ingiriendo la misma dieta; no obstante, los valores de concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH) aumentaron en todos los grupos como consecuencia del aumento de densidad, lo que parece indicar que el aumento de hemoglobina sanguínea se debería, fundamentalmente, al mayor número de eritrocitos circulantes. Por tanto, nuestros resultados indicarían que la estrategia adoptada por la mayoría de los grupos mantenidos a alta densidad sería un aumento de glóbulos rojos inmaduros, como se deriva de la ausencia de cambios en el hematocrito y el menor valor del VCM, sin afectarse, en términos generales, la síntesis de hemoglobina. Se ha descrito que existe una correlación negativa entre el contenido de hemoglobina de la sangre y el VCM, y que los cambios relativos de ambos parámetros son un reflejo de la actividad de los peces, de tal forma que un aumento de los niveles de hemoglobina, acompañado de un bajo VCM, serían indicativos de una elevada capacidad aeróbica (Lay y Baldwin, 1999); en este sentido, algunos autores indican que la hemoglobina de los eritrocitos inmaduros tiene una mayor afinidad por el oxígeno (Houston, 1996 a, b).

Pasando a las peculiaridades observadas en cada uno de los grupos mantenidos a alta densidad, se hará mención, en primer lugar, a los animales alimentados con la dieta -E-HUFA que, como ya se indicó, fueron la única excepción al patrón general descrito anteriormente puesto que, salvo ligeras oscilaciones en la concentración de hemoglobina sanguínea, no presentaron la respuesta hematológica observada en el resto de grupos, atribuible a la condición de alta densidad. Esta ausencia de respuesta a nivel hematológico podría poner de manifiesto bien que los animales no se vieron afectados por esta situación experimental o bien una incapacidad de estos peces para responder a la misma. Como ya se indicó anteriormente, fue en estos animales donde el efecto

negativo del aumento de la densidad sobre el crecimiento, la ingesta y los parámetros nutritivos se hizo más patente, aunque no siempre de forma significativa, lo que lleva a pensar que la incapacidad de respuesta a la condición de alta densidad sería la explicación más probable para los resultados obtenidos a nivel hematológico. En principio, estos resultados no serían atribuibles, al menos de manera exclusiva, a la deficiencia de vitamina E, ya que los animales alimentados con la dieta -E+HUFA sí presentaron el patrón general de respuesta al aumento de la densidad descrito para la mayoría de los grupos. Por tanto, se podría pensar que la ausencia de HUFAs en esta dieta, junto con la menor ingestión de la misma por parte de los animales, habría dado lugar a estos resultados. Ya se ha comentado el papel fundamental de los HUFAs como constituyentes esenciales de las membranas de los eritrocitos y, aunque, en principio, la dieta -E-HUFA cubría las necesidades de ácidos grasos esenciales, puede que la menor ingesta presentada por estos animales diera lugar a un aporte insuficiente de los mismos, lo que, en último término, habría impedido el aumento de la producción de eritrocitos observado en el resto de grupos mantenidos a alta densidad. En este sentido, los resultados obtenidos en el grupo +E-HUFA parecen corroborar esta hipótesis. Esta dieta también carecía de HUFAs pero, como ya se comentó, en condiciones de alta densidad fue la que se ingirió en mayor proporción lo que habría asegurado un aporte de estos ácidos grasos esenciales suficiente para responder a la situación de alta densidad aumentando el número de eritrocitos circulantes. Continuando con los resultados obtenidos en este último grupo, cabe destacar que la respuesta hematológica sólo fue evidente a los 21 días, a diferencia del resto de grupos en los que las alteraciones hematológicas atribuibles al aumento de densidad aún eran evidentes al final del periodo experimental. En principio, considerando exclusivamente estos resultados, no sería posible interpretar hasta qué punto esta respuesta fue beneficiosa o perjudicial; sin embargo, recurriendo, una vez más, a los resultados de crecimiento, ya se indicó que el grupo +E-HUFA fue el que presentó los resultados más favorables, lo que indicaría que estos animales presentaron una mayor capacidad de adaptación a la situación de alta densidad.

El hecho de que las alteraciones hematológicas derivadas del aumento de la densidad de peces aún fueran evidentes al final del periodo experimental en aquellos

grupos que ingirieron dietas con aceite de pescado, independientemente del aporte vitamínico, y que el crecimiento de estos peces fuera inferior al presentado por el grupo +E-HUFA nos lleva a pensar que, de algún modo, estos elevados niveles de HUFAs en las dietas ejercieron una clara influencia sobre la respuesta de los animales a la situación de alta densidad que, en cierto modo, se podría considerar maladaptativa.

Por último, como ya se indicó respecto a la dieta -E-HUFA, parece que la carencia de vitamina E en las dietas no habría sido un factor determinante de la respuesta hematológica al aumento de la densidad de peces ya que, si bien el hematocrito y el VCM del grupo -E+HUFA ya parecían indicar algún síntoma carencial, estos animales presentaron una clara respuesta hematológica a la situación de alta densidad. El hecho de que los signos carenciales observados en condiciones de densidad normal no fueran tan patentes en los animales mantenidos durante seis semanas a alta densidad se debería, probablemente, a la menor ingesta observada en estos últimos, no pudiéndose descartar, por tanto, que a largo plazo la carencia de vitamina E pudiera ejercer alguna influencia a este nivel.

#### 2.4. EFECTO SOBRE DETERMINADOS PARÁMETROS PLASMÁTICOS Y GLUCÓGENO TISULAR

El cortisol es el corticoesteroide predominante en la mayoría de los peces teleósteos (Henderson y Garland, 1980). No se almacena en el tejido interrenal sino que es sintetizado a medida que se necesita. Los niveles basales de cortisol plasmático, en peces no estresados, están generalmente entre <1 y 10 ng/ml (Sumpter *et al.*, 1986; Pottinger y Moran, 1993), aumentando rápidamente en situaciones de estrés hasta alcanzar 100-200 ng/ml a la hora de iniciado el estrés (Sumpter *et al.*, 1986; Pickering y Pottinger, 1989; Pottinger y Moran, 1993), aunque elevaciones superiores han sido descritas (Brown y Whitehead, 1995). En estrés agudo la elevación de cortisol suele durar unas horas, pero en circunstancias de estrés continuado o crónico, como el confinamiento prolongado, los niveles pueden permanecer elevados durante días o

semanas (Pickering y Pottinger, 1989). En algunas situaciones de estrés prolongado, las concentraciones de cortisol plasmático pueden volver a niveles basales (Pickering y Stewart, 1984), lo que demuestra la posibilidad de aclimatación a la situación estresante.

En las condiciones normales de densidad al final del período experimental, los peces presentaron concentraciones de cortisol entre 10 ng/ml y 36,3 ng/ml de plasma (Tabla IV.8.). Los animales alimentados con la dieta +E+HUFA, considerada como adecuada a las necesidades de la trucha, fueron los que presentaron los niveles de cortisol más bajos (10 ng/ml de plasma), mientras que las que ingirieron dietas deficientes en vitamina E tuvieron mayores concentraciones plasmáticas de esta hormona (30-36 ng/ml de plasma). Si se acepta que los niveles basales de cortisol, en peces no estresados, pueden llegar a 10 ng/ml (Sumpter *et al.* 1986; y Pottinger y Moran 1993), los peces alimentados con dietas deficientes en vitamina E manifestarían una cierta maladaptación a la dieta y otras condiciones experimentales. Según estos resultados, la vitamina E, en condiciones de acuario normales, atenuaría la respuesta de cortisol. Estos resultados están de acuerdo con los resultados obtenidos en experimentos con dorada, donde se puso de manifiesto que la carencia de esta vitamina, en condiciones de densidad normal, elevaba los niveles de cortisol (Montero *et al.*, 1998). De hecho, Watson y Petro (1982) encontraron que cuando se alimentan ratones con dietas que incorporan niveles elevados de vitamina E se reducen las concentraciones de corticoesteroides. Por otra parte, existen evidencias parciales de que los HUFA n-3 puedan reducir la respuesta de algunos peces a ciertos agentes estresantes (Mc. Kenzie *et al.*, 1994; Montero *et al.*, 1998) que, en este caso, podrían derivarse de las condiciones experimentales de confinamiento.

Al someter los grupos experimentales a circunstancias estresantes por alta densidad, aumentaron significativamente los niveles de cortisol al final del período experimental en las truchas alimentadas con las dietas +E+HUFA, carentes o no de vitamina C (Tabla IV.8.). Por otra parte, en las truchas que ingirieron dietas deficientes en vitamina E se redujeron los niveles plasmáticos de cortisol entre un 25-40%, aunque sin llegar a ser significativos. El que se invierta la relación entre composición de la dieta y niveles de cortisol, en las condiciones de alta densidad, podría indicar una mayor

capacidad de respuesta al estrés en los grupos alimentados con dietas +E+HUFA, probablemente por no llegar a la fase de agotamiento que puede haberse dado en los otros grupos. De hecho, Montero *et al.*, (1998) pusieron de manifiesto que situaciones de estrés agudo repetidas a lo largo del tiempo daban lugar a una respuesta en los niveles de cortisol más brusca y breve en animales que consumieron dietas deficientes en vitamina E, con respecto a los que consumieron dietas suplementadas, en los que los niveles de cortisol incrementaron progresivamente a lo largo del período experimental.

En cualquier caso, los niveles de cortisol en truchas mantenidas a alta densidad no se elevaron demasiado en los grupos +E+HUFA, y la mayoría de los grupos no modificaron los niveles de cortisol. El hecho de que la trucha arco iris sea más tolerante a la alta densidad que otras especies de salmónidos se cree que es debido a una mayor tolerancia fisiológica al estrés por confinamiento (Wedemeyer, 1996). Por otra parte, no ha habido generalmente éxito para medir respuesta primaria y secundaria al estrés por aumento de densidad en truchas arco iris cuando se han mantenido condiciones adecuadas de calidad del agua lo que ha sugerido que la alta densidad no produce estrés crónico en esta especie (Procarione *et al.*, 1999). Sin embargo, ha habido una cierta resistencia a aceptar que el hacinamiento no produce estrés, porque hay evidencia de ello en especies próximas (Schreck *et al.*, 1985), y los efectos del aumento de densidad en la trucha arco iris (ingesta, crecimiento, conversión del alimento y linfocitos) son análogos a los efectos negativos de la respuesta de cortisol (Barton *et al.*, 1987; Pickering, 1992; Gregory y Wood, 1999).

Aunque se haya llegado al convencimiento de que el hacinamiento es un estresante crónico para la trucha arco iris, no se ha encontrado un aumento sustancial de los niveles de cortisol porque se haya alterado la secreción por influencia de la calidad del agua o la menor ingesta, o también como consecuencia de la aclimatación al estrés continuo (Pickering y Pottinger, 1987, Laidley y Letherland, 1988). Alteraciones debidas a la calidad del agua no parecen probables ya que Pickering y Stewart (1984) encontraron un aumento de las concentraciones plasmáticas de cortisol en truchas mantenidos a alta densidad que fue independiente de los cambios en la calidad del agua. La falta de mantenimiento de niveles altos de cortisol, por estrés crónico motivado por

alta densidad, habría que atribuirla a la aclimatación de los animales (Pickering y Pottinger, 1987). La aclimatación puede ser debida al agotamiento del tejido interrenal, al aumento del catabolismo y eliminación del cortisol, o la pérdida de influencia de la situación estresante (Pickering y Stewart, 1984; Schreck *et al.*, 1985 y 1995; Procarione *et al.*, 1999). Ellis *et al.* (2002) concluyen, en una revisión sobre la relación entre la densidad de peces y el estado de bienestar de la trucha arco iris cultivada, que los efectos de la densidad no son probablemente debidos al aumento de los niveles de cortisol plasmático. No obstante, es necesario profundizar en aspectos relacionados con la aclimatación al estrés crónico, no sólo en cuanto a los niveles plasmáticos de cortisol sino en relación con las variaciones en el número de receptores de membrana para esta hormona y las respuestas fisiológicas y metabólicas derivadas, que pudieran ser responsables de las alteraciones en la ingesta, velocidad de crecimiento e índices de utilización nutritiva de la dieta.

Las concentraciones de proteínas y glucosa en plasma no experimentaron variaciones que pudieran indicar una estimulación de su producción por influencia del cortisol, lo que pone de manifiesto que la respuesta de cortisol no es tan importante al final del periodo experimental, bien por disminución de su secreción o por aumento de la eliminación de la hormona y, en cualquier caso, porque en determinadas situaciones de estrés continuado las concentraciones de cortisol pueden regresar a niveles basales (Pickering y Stewart, 1984) o porque puede producirse un descenso en la afinidad de los receptores de esta hormona (Trenzado *et al.*, 2003).

Las pequeñas diferencias en la concentración de proteínas plasmáticas, entre grupos mantenidos a baja densidad, no guardan relación aparente con el estado nutritivo ni con los niveles de cortisol; sin embargo, presentan una relación directa con los valores de recuento, tanto en baja como en alta densidad, que indica variaciones en el estado de concentración/dilución de la sangre. Estas variaciones parecen tener cierta relación con la composición de la dieta pero, sobre todo, con la densidad de peces, de tal forma que las circunstancias estresantes del hacinamiento provocan hemoconcentración en todos los grupos, con excepción de las truchas alimentadas con la dieta +E-HUFA que mantienen el número de células por mm<sup>3</sup>. Se ha sugerido que pudieran producirse



alteraciones osmóticas en respuesta al estrés a corto plazo; la adrenalina, o el aumento de la presión arterial que ésta provoca, aumentaría la permeabilidad branquial a los electrolitos y al agua, por otra parte las elevadas concentraciones de lactato en músculo aumentarían la presión osmótica intracelular con la consiguiente retención de agua (Milligan y Wood, 1986). Otra posible explicación sería la reducción del volumen plasmático como consecuencia de la vasoconstricción general estimulada por las catecolaminas, que ya Bernier y Perry (1999) pusieron de manifiesto en trucha arco iris al correlacionar positivamente un aumento de los niveles de catecolaminas plasmáticas con una mayor presión arterial.

Al final del experimento, los niveles de glucógeno hepático no se modificaron en truchas alimentadas con dietas con distintos niveles de vitamina E, vitamina C o HUFAs, cuando los animales se mantienen en condiciones normales de densidad. En circunstancias de estrés crónico por alta densidad, sin embargo, los niveles de glucógeno hepático se redujeron en todos los grupos, si bien sólo de forma significativa en -E+HUFA, apareciendo diferencias asociadas a la dieta entre grupos (Tabla IV.8.). Hay que descartar cualquier influencia del nivel de ingesta sobre los valores de glucógeno hepático, ya que no hubo diferencias ni en la ingesta ni en las concentraciones de glucógeno entre los grupos mantenidos a baja densidad y, para aquellos grupos (-E+HUFA y +E+HUFA) que tuvieron niveles extremos de glucógeno en alta densidad, la dieta fue consumida en cantidades similares (1,55 y 1,51 g / 100g pez / día, respectivamente). Parece claro que el estrés crónico, a través de la respuesta hormonal que conlleva, es responsable de la movilización del glucógeno hepático. Puesto que la respuesta de cortisol, ya discutida anteriormente, no es homogénea (en tres de los cinco grupos experimentales no se modifica respecto a las condiciones normales de densidad), es difícil asegurar una interacción entre el eje hipotálamo-hipófisis-tejido interrenal y la respuesta adrenérgica, como ha sido sugerido por Perry y Reid (1993) que observaron que el aumento de número de receptores  $\beta$  en los hepatocitos, por influencia del cortisol, aumenta la respuesta glucogenolítica a las catecolaminas. En cualquier caso, y en función de los resultados obtenidos, habría que atribuir a las catecolaminas, presuntamente elevadas durante el estrés crónico, la movilización del glucógeno. Sin embargo, aún cuando se ha demostrado que las

catecolaminas, secretadas en una primera respuesta al estrés, actúan movilizándolo las reservas de glucógeno, como mecanismo para la obtención de energía inmediata (Ottolenghi *et al.*, 1989; Vijayan *et al.*, 1997; Fabbri *et al.*, 1998; Janssens y Waterman, 1998), no hay datos disponibles que aseguren que los niveles de catecolaminas permanezcan elevados durante los largos periodos del estrés crónico, ni que la mayor sensibilidad a las catecolaminas, inducida por el cortisol, permanezca el tiempo suficiente como para atribuir a estas hormonas los efectos sobre la disminución de los depósitos de glucógeno en el hígado.

Por otra parte, la movilización del glucógeno hepático ha sido observada en experimentos de estrés por densidad de peces (Vijayan *et al.*, 1990; Skejervold *et al.*, 1999, 2001), manipulación de los animales (Reubush y Heath, 1996), alteraciones de la salinidad (De Boek, 2000) y otras circunstancias estresantes. En algunas situaciones de estrés crónico, como salinidad y exposición a contaminantes, se ha observado que la disminución de las concentraciones hepáticas de glucógeno estaba asociada a un incremento de la actividad GPasa (glucógeno fosforilasa) junto a una disminución de la actividad GSasa (glucógeno sintetasa), (Soengas *et al.*, 1993a, b; Fabbri *et al.*, 1998; Lappivaara, 2001). También se ha observado la intervención de las hormonas tiroideas, en combinación con el cortisol, asociadas a un descenso de los niveles de glucógeno y aumento de la actividad GPasa (Soengas *et al.*, 1992).

En cuanto a las influencias de la dieta, habría que plantear la posibilidad de una interacción dieta-estrés crónico en la que los niveles, adecuados o no, de vitamina E, en presencia de HUFAs, de alguna forma condicionen los depósitos de glucógeno. La presencia de antioxidantes como las vitaminas E y C, asociadas a la inclusión de HUFAs en la dieta en condiciones de alta densidad, parece establecer una relación directa con altos niveles de glucógeno. De hecho, la dieta -C+E presentó niveles intermedios de glucógeno en relación a las dietas +C-E y +C+E. Es interesante destacar que, en estas condiciones, los animales que ingirieron la dieta -C+E+HUFA mostraron niveles de glucógeno similares a los de animales alimentados con dietas -HUFA. La disponibilidad de HUFAs podría haberse alterado al carecer del efecto antioxidante de la vitamina C, lo que pudo llevar a este grupo a presentar resultados similares a los

-HUFA a alta densidad. Se conoce que la deficiencia de vitamina C en dieta está ligada a un incremento en la oxidación de lípidos, aún en presencia de otras moléculas y enzimas antioxidantes como la vitamina E (Chakraborty *et al.*, 1994). A este respecto, no se debe descartar el posible efecto prooxidante de la vitamina E, que se acentuaría en ausencia de vitamina C, ya que se vería afectado el potente papel regulador de ésta sobre la primera (Upston *et al.*, 1999; Moreno y Mitjavila, 2003).

Los niveles de glucógeno muscular no experimentaron variaciones importantes, aunque se observa, como ocurre en hígado, una tendencia a disminuir en todos los grupos experimentales (salvo para la dieta -C+E+HUFA que indujo cambios opuestos) cuando se mantienen en condiciones de alta densidad. La influencia de la dieta en circunstancias estresantes no presentó las tendencias observadas en el hígado. Las posibles influencias hormonales sobre la movilización del glucógeno se han discutido ya en relación con el hígado, por lo que no se insiste en su comentario.

Los resultados obtenidos en cuanto a la concentración de lípidos en plasma no muestran, en general, una clara tendencia a incrementar sus niveles en animales sometidos a alta densidad de peces, con el fin de facilitar una mayor disponibilidad de combustible en estas condiciones (Vijayan *et al.*, 1990). Si bien, y de acuerdo con el análisis estadístico global (anexo Tablas IV.19. y IV.20.), a los 21 días se pone de manifiesto un aumento significativo de los lípidos, en condiciones de alta densidad, en aquellos grupos de animales alimentados con dietas ricas en HUFAs, mientras que los alimentados con dietas -HUFA muestran un descenso que en estas condiciones fue significativo en los animales -E-HUFA. Este incremento de lípidos totales podría explicar los beneficios del aceite de pescado sobre la capacidad de resistencia a condiciones estresantes, caracterizadas por un aumento de las necesidades energéticas (Kraul *et al.*, 1993; Kanazawa *et al.*, 1997; Gapasin *et al.*, 1998; Sakakura *et al.*, 1998; Tago *et al.*, 1999; Montero *et al.*, 2003), cosa que, por el contrario, en situaciones de baja densidad, no se pone de manifiesto, ya que la tendencia se invierte, siendo los animales alimentados con dietas -HUFA los que presentaron valores elevados de lípidos totales.

Con relación a la influencia de los ácidos grasos de la dieta sobre los niveles de triglicéridos plasmáticos, los estudios que existen no muestran una tendencia clara; Harris (1996) recoge que un aumento de HUFAs n-3, asociados a la ingesta de aceite de pescado, da lugar a un aumento de triglicéridos en el hombre, mientras que otros autores evidencian lo contrario (Horrocks y Yeo, 1999; Kroes *et al.*, 2003) e incluso apuntan que tanto el linoleico (18:2n6) como los HUFAs n-3 pueden dar lugar a un descenso de triglicéridos (Moreno y Mitjavila, 2003).

El patrón de respuesta observado a los 21 días muestra la presencia de niveles inferiores de triglicéridos y colesterol en animales alimentados con dietas -HUFA, sometidos a alta densidad, que llegó a ser significativo en los grupos +E-HUFA para ambos parámetros, lo que en parte se ve apoyado por otros estudios en los que una dieta rica en linoleico (ácido graso presente en el aceite de soja en alta proporción) disminuye los niveles de triglicéridos (Chen y Yeh, 2003) y colesterol total (Keys *et al.*, 1970).

Como se observa, la densidad va a condicionar en muchos casos los efectos de los niveles de HUFAs en dieta, dependiendo, a su vez, en mayor o menor grado, de la suplementación de antioxidantes en ésta. Esta influencia parece lógica, si se tiene en cuenta que una mayor presencia de radicales libres puede favorecer un incremento de TG, CT y LDL, debido a una menor resistencia a la oxidación en estas moléculas, asociado a su vez a valores más bajos de HDL (Góth, 2000; Vanizor *et al.*, 2001). Con relación a esto, en los animales alimentados con dietas elaboradas con aceite de soja (-HUFA) se observa, a los 42 días, que deficiencias de vitamina E (-E-HUFA) van a dar lugar a un incremento significativo de los valores de lípidos totales, triglicéridos y colesterol total con respecto a los grupos suplementados (+E-HUFA). Por otro lado, es interesante destacar que, al final del experimento y en condiciones de alta densidad, los animales -E+HUFA muestran un incremento de LDL asociado a un descenso de HDL, lo que podría significar una mayor predisposición a la oxidación de los ácidos grasos en este grupo, como ya se puso de manifiesto al analizar los parámetros hematológicos en estos animales. El hecho de que estas variaciones se pongan de manifiesto a alta densidad, se explicaría porque en determinadas situaciones de estrés se puede favorecer la aparición de radicales libres y con ello de variaciones entre las lipoproteínas

plasmáticas, sin olvidar, como ya se ha comentado, la influencia de los niveles de antioxidantes y del tipo de ácidos grasos consumidos en la dieta.

En líneas generales se observa, como ya se ha puesto de manifiesto anteriormente en salmónidos alimentados con dietas ricas en aceite de soja o pescado (Lie *et al.*, 1993), que a los 21 días del experimento hay un efecto conjunto de la densidad y del tipo de ácidos grasos de la dieta, estimulándose o inhibiéndose la formación de determinados lípidos plasmáticos. Por otro lado, al final del experimento, la suplementación o no de vitamina E va a influir en las variaciones de lípidos plasmáticos que a su vez van a estar condicionados por los niveles de HUFAs y las condiciones de densidad.

## 2.5. EFECTO SOBRE EL METABOLISMO DE ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVO

En determinadas situaciones de estrés, el aumento de la tasa metabólica favorece una mayor generación de radicales libres que puede superar la capacidad antioxidante celular (Ross *et al.*, 2001; Guerriero *et al.*, 2002), conduciendo a una situación de estrés oxidativo (Tort *et al.*, 1996). En este sentido, la composición de la dieta, en cuanto a los niveles de vitaminas antioxidantes y tipo de ácidos grasos, puede jugar un papel fundamental (Jackson, 1994).

Como ya se ha comentado a lo largo de esta memoria, una de las principales funciones atribuidas a la vitamina E es su papel protegiendo los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares frente al ataque de las especies de oxígeno reactivo (Chow, 1991; Mazor *et al.*, 1997; Stahl y Sies, 1997; John *et al.*, 2001; Gökkuşu y Mostafazadeh, 2003; Udilova *et al.*, 2003). En presencia de vitamina E, los radicales libres captan un átomo de hidrógeno de esta vitamina en lugar de oxidar los PUFAs y, de este modo, se rompe la cadena de reacciones que pueden derivar en daños en las membranas. Además, también se atribuye a esta vitamina un papel estabilizador de los fosfolípidos de membrana (Golod, 1997).

## *HÍGADO*

A lo largo del experimento (determinaciones a los 21 y 42 días) se produjo, en todos los grupos y con independencia de la densidad, un aumento significativo de la actividad SOD hepática, asociado a una disminución de las actividades GPX y GR, mientras que la actividad de la catalasa, salvo algún cambio puntual, no se modificó significativamente a lo largo del tiempo (Tablas IV.21. y IV.22.). La falta de efecto de la densidad de animales sobre estos parámetros descarta, en estas condiciones experimentales, que, en principio, el estrés crónico por alta densidad llegue a influir de forma diferente sobre el metabolismo de especies de oxígeno reactivo; otra posibilidad es que el confinamiento en las cubas experimentales haya podido producir un mismo estímulo estresante en ambas densidades. Descartando el efecto estrés en ambas densidades, el que no existan diferencias entre grupos de diferente densidad puede ser consecuencia de una reacción compensatoria en los animales sometidos a baja densidad, provocado por su mayor ingesta de alimento. El mayor aporte de energía, con la mayor ingesta, ha debido inducir un aumento en la actividad oxidativa y, con ella, una mayor producción de especies de oxígeno reactivo, por lo que las posibles diferencias con los grupos sometidos a estrés crónico se habrían atenuado. Cabe plantearse que, en la primera respuesta de adaptación a las condiciones experimentales, la formación de especies de oxígeno reactivo esté aumentada por enzimas generadoras de estas especies, con la consecuente inducción de la actividad de los sistemas enzimáticos de eliminación de los peróxidos producidos, entre los que se encuentran la actividad GPX y GR, y, al mismo tiempo, esa mayor concentración de peróxido puede haber llegado a inhibir la actividad SOD (Kono y Fridovich, 1982; Halliwell y Gutteridge, 2000). Por otra parte, a los 42 días, se habría producido una acomodación a las condiciones experimentales (también hay acomodación al estrés crónico) en la que la menor actividad oxidativa, y la mayor eliminación de peróxido, por las actividades aumentadas previamente de la GPX y GR, llevaría a un descenso en concentración hepática de  $H_2O_2$  que desinhibiría a la SOD mientras que GPX y GR regresarían a valores mas acordes con la menor generación de  $H_2O_2$ .

Hay que destacar que, a lo largo del experimento, el descenso generalizado de la actividad GPX fue paralelo al de las actividades GR y G6PDH, siendo esta última, junto con la 6PGDH, una de las principales enzimas generadoras de los equivalentes de reducción (NADPH) empleados por la GR para regenerar el glutatión reducido (GSH) a partir de la forma oxidada (GSSG) generada por la actividad GPX (Tian *et al.*, 1999; Leopold y Loscalzo, 2000).

Con relación a la influencia de la densidad, a lo largo del experimento los efectos no fueron generalizados para los grupos sometidos a una misma densidad, si bien, parece ser que a los 21 días existe una interacción entre tipo de dieta y densidad en determinados grupos de animales entre los que cabe destacar los -E+HUFA. A alta densidad, los animales que consumieron esta dieta mostraron valores de actividad GPX y GR significativamente superiores al resto de los grupos. Al mismo tiempo, en estos animales el índice de peroxidación lipídica (MDA) incrementó significativamente, junto a otros grupos, a alta densidad, alcanzando los animales -E+HUFA el valor de MDA más alto de todos los grupos experimentales. Como ya se ha comentado, la deficiencia de vitamina E aumenta el riesgo de peroxidación lipídica, especialmente cuando la dieta contiene elevadas proporciones de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA), como ya han puesto de manifiesto muchos autores (Watanabe, 1987; Roberts y Bullock, 1989; Sargent *et al.*, 1989; Hamre y Lie, 1995; Stephan, *et al.*, 1995). Aunque el volumen de ingesta fue menor a alta densidad, los efectos de la dieta en este caso ya se detectaron a los 21 días del experimento. Estos resultados son acordes con las alteraciones hematológicas, observadas desde los 21 días, en este mismo grupo y discutidas en el apartado 2.3.

La interacción dieta-densidad sobre las actividad de enzimas antioxidantes debería manifestarse más claramente con el tiempo, ya que, como se consideró anteriormente, los animales podrían encontrarse ya adaptados a las condiciones experimentales. De hecho, a los 42 días se observaron ciertos cambios de actividad atribuibles al efecto de la densidad en función del tipo de dieta ingerida. Esos cambios de actividad pusieron de manifiesto que, a alta densidad, la actividad de la catalasa aumentó en el hígado de los peces alimentados con la dieta -E+HUFA, con relación a

los animales que consumieron la misma dieta a baja densidad. Además, se observó una disminución de la actividad SOD (no se detectaron cambios significativos en las actividades GPX y GR), lo que podría deberse a una inhibición de su actividad ligada a un aumento en la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que, de nuevo, pone de manifiesto el diferente comportamiento de ambas enzimas, aspecto que ya se discutió con relación al efecto del tiempo experimental. Por otra parte, en los peces alimentados con las dietas suplementadas con ambas vitaminas (+E+HUFA y +E-HUFA), se produjo el efecto contrario, es decir, disminuyó la actividad de la catalasa. Efectivamente, ya se demostró en mamíferos que la presencia de la vitamina E daba lugar a un descenso en la actividad de enzimas antioxidantes (Atalay *et al.*, 2000) observándose posteriormente, en peces, un aumento de actividad catalasa asociado a deficiencias dietarias de vitamina E (Tocher *et al.*, 2002). En este caso, el papel de la vitamina E compensando las actividad de enzimas antioxidantes se pondría de manifiesto de manera más clara en condiciones de alta densidad que, como ya se ha comentado, podría ser una situación más propensa a daños oxidativos. Por otro lado, en el grupo +E-HUFA el descenso de actividad catalasa a alta densidad va ligado de manera significativa a una menor actividad G6PDH. Existen estudios que establecen cierta relación entre ambas enzimas al demostrarse la presencia de centros de unión para el NADPH en las subunidades de la catalasa que lo hacen necesario para su actividad (Kirkman y Gaetani, 1984; Kirkman *et al.*, 1999). De esta manera, un descenso de los niveles de NADPH, ligado a una menor actividad G6PDH, podría implicar una menor actividad catalasa.

Puesto que la influencia de la dieta, especialmente cuando se incluyen dietas deficientes en el diseño experimental, se manifiesta más claramente con el tiempo, la discusión se realizará en base a los resultados obtenidos a los 42 días.

Al comparar el efecto de la suplementación de vitamina E en los grupos alimentados con dietas elaboradas con aceite de soja (-HUFA), a alta densidad se puso de manifiesto un aumento de actividad catalasa y GR en el grupo -E-HUFA con respecto al +E-HUFA. Parece observarse que la carencia de vitamina E podría repercutir negativamente en los procesos de eliminación de radicales libres, hecho que, como ya se comentó anteriormente, podría verse compensado con un incremento en la



actividad de enzimas antioxidantes (Tocher *et al.*, 2002). Por otro lado, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede alcanzar niveles tales como para inhibir a la SOD (Kono y Fridovich, 1982), cosa que a alta densidad explicaría los bajos valores de actividad SOD mostrados en los animales -E-HUFA. Esto parece concordar con el patrón isoenzimático de esta enzima (Figura IV.5.) en el que se observa que, a diferencia de los otros animales, en el grupo -E-HUFA sólo se detectó la presencia de la CuZn-SOD I, lo que en cierto modo justificaría el valor más bajo de actividad SOD. En cualquier caso, la respuesta mostrada por este último grupo se muestra efectiva ya que los niveles de MDA fueron los más bajos con relación al resto de los grupos a alta densidad.

En dietas ricas en HUFAs, el efecto de la deficiencia de vitamina E (-E+HUFA) en condiciones de alta densidad pone nuevamente de manifiesto un incremento de la actividad de ciertas enzimas antioxidantes, como la catalasa y GR que, aunque sólo fue significativo en esta última, podría deberse, como ya se comentó anteriormente, a una respuesta compensatoria ligada a una mayor predisposición del animal a procesos oxidativos (Tocher *et al.*, 2002). A baja densidad, a diferencia de lo observado a alta densidad, los valores de actividad específica SOD sí parecen estar influenciados por la deficiencia de vitamina E, ya que los animales -E+HUFA muestran valores altos de SOD con respecto a +E+HUFA. Sin embargo, la influencia de los niveles de vitamina E en dietas con altos niveles de HUFAs no parece afectar al patrón isoenzimático de esta enzima, que se mostró estable para estos grupos (-E+HUFA y +E+HUFA) a ambas densidades.

Con relación al efecto del tipo de ácidos grasos consumidos, los resultados muestran que, en dietas deficientes en vitamina E, la presencia de HUFAs (-E+HUFA) favorece un incremento de la actividad SOD ligado a la aparición de la CuZn-SOD III en este grupo y un aumento de los niveles de MDA, que fue significativo a alta densidad. De nuevo los animales que consumieron dietas -E+HUFA muestran al final del experimento una mayor predisposición a daños oxidativos en estas condiciones de densidad. En el caso de dietas suplementadas con vitamina E, a alta densidad se observa que los grupos +E+HUFA presentan mayor actividad catalasa, con respecto a los +E-HUFA, asociada a un descenso significativo de la actividad SOD, posiblemente

debido al ya mencionado efecto inhibitor del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kono y Fridovich, 1982), aunque la presencia de HUFAs de nuevo está ligada a la aparición de la CuZn-SOD III en el grupo +E+HUFA. Parece ser que la presencia de HUFAs en condiciones de alta densidad favorece la aparición de esta forma isoenzimática lo que en cierto modo podría suponer una mayor disponibilidad de los sistemas antioxidantes en aquellos animales con mayor tendencia a la oxidación. Los niveles de MDA mostraron un incremento de un 28% en este grupo con respecto a los +E-HUFA, lo que vuelve a poner de manifiesto que de alguna manera, el consumo de HUFAs podría favorecer la generación de ROS que harían al animal más propenso a daños oxidativos, reflejados en los niveles de MDA.

Los efectos de la vitamina C se pusieron de manifiesto a baja densidad donde se observó que cuando existen deficiencias de esta vitamina (-C+E+HUFA) se produce un descenso en la actividad de las enzimas GR, catalasa, y G6PDH con respecto a los animales +E+HUFA que, aunque no fue significativo en todos los casos, sí parece ser indicativo de una posible pérdida en la capacidad de respuesta antioxidante en situaciones donde la regeneración de la vitamina E ligada a la vitamina C puede verse afectada, y que explicaría la tendencia a mostrar niveles más altos de MDA en este grupo. Con respecto a la actividad SOD, a ambas densidades la carencia de vitamina C (-C+E+HUFA) no dio lugar a diferencias con respecto a los grupos suplementados (+E+HUFA), si bien el análisis de formas isoenzimáticas muestra la aparición de nuevas bandas en los grupos -C+E+HUFA, que a baja densidad se corresponden con la Cu,Zn-SOD II y III y a alta densidad con la hCuZn-SOD. Por otro lado, es interesante destacar que el grupo +E-HUFA mostró idéntico patrón de isoenzimas al de los animales -C+E+HUFA en ambas densidades. Una posible explicación a este efecto vendría dada por el hecho de que en cierto modo la deficiencia de vitamina C podría favorecer la oxidación y por tanto una menor disponibilidad de los HUFAs de la dieta aún en presencia de vitamina E. De hecho, se ha puesto de manifiesto un papel más efectivo de la vitamina C previniendo la oxidación de lípidos plasmáticos con respecto a la vitamina E (Sahyoun, 1997; Góth, 2000), lo que indicaría que esta dieta (-C+E+HUFA) podría ser, en cierto modo, considerada como -HUFA. Una disminución de los niveles de HUFAs en presencia de vitamina E podría propiciar la inducción de la isoforma hCuZn-SOD a alta densidad, que en el caso de +E-HUFA estaría relacionada

con los niveles máximos de actividad SOD mostrados en este grupo. Por otro lado, no se puede descartar que esta forma inducible sea derivada de la oxidación de otra isoforma existente (en este caso la Cu,Zn-SOD I), como se ha demostrado en peces sometidos a agentes contaminantes que podrían propiciar la formación de radicales libres (Pedrajas *et al.*, 1993, 1995). La oxidación podría haber causado un cambio conformacional provocando una movilidad electroforética diferente. A este respecto, se ha observado que a baja densidad estos dos grupos son los que presentan niveles más altos de MDA, que también podrían ser responsables de cambios en los patrones de isoenzimas, indicativos de situaciones de estrés oxidativo (Pedrajas *et al.*, 1998).

Como se ha observado, los cambios en la actividad específica de la SOD pueden estar relacionados con alteraciones en el patrón de sus isoenzimas en cuanto a las interacciones densidad-dieta. Así, en hígado se observa que aparecen tres isoformas de la SOD (I, II y III) del tipo CuZn, ya que no se detectó su presencia tras inhibición con cianuro, siendo la CuZn-SOD I constitutiva y la II y III inducibles, lo que parece coincidir con los resultados obtenidos en estudios previos con trucha arco iris (Hidalgo *et al.*, 2002). La CuZn-SOD I aparece en todos los casos, sin distinción entre dietas ni densidad, mientras que la aparición de las isoformas inducibles II, III y hCuZn-SOD en determinados grupos puede estar asociada a la composición de la dieta y las condiciones de densidad. A este respecto, en hígado existiría un efecto más acusado de los HUFAs que de la vitamina E sobre el patrón isoenzimático de la SOD, teniendo en cuenta que la ausencia de vitamina C podría generar una situación similar a la obtenida con dietas -HUFA, lo que sumado a la presencia o no de estrés determinaría un patrón u otro de bandas.

En términos generales, hay que destacar que, a los 42 días de la ingestión de las distintas dietas experimentales se llega a una situación en la que la actividad GPX no se modifica ni por la dieta ni por las condiciones de densidad de animales; sin embargo, siempre se produce una respuesta opuesta de la actividad SOD respecto a las actividades de la catalasa y de la GR, siendo este comportamiento más acusado cuando los animales se mantienen en condiciones de alta densidad. Este comportamiento es básicamente el

mismo que hemos observado al comparar las actividades de estas enzimas a los 21 y 42 días del experimento y que ya se comentó al inicio de este apartado de la discusión.

En resumen, la carencia de vitamina E incrementa la actividad de determinadas enzimas antioxidantes pero, en ciertas ocasiones, una elevada producción de radicales libres, en algunos casos asociada a una mayor ingesta de HUFAs, puede llegar a ejercer un efecto inhibitor de la actividad de determinadas enzimas antioxidantes. No se observan cambios que lleven a pensar que exista una situación de estrés oxidativo a nivel hepático, ya que, salvo alguna excepción, por lo general no existen grandes diferencias en los niveles de MDA entre grupos. Los cambios observados en las actividades enzimáticas son un reflejo de las posibles adaptaciones sufridas por el animal según el tipo de dieta consumida.

### *RIÑÓN*

El hecho de que a lo largo del experimento se produzca un aumento generalizado de la actividad SOD, asociado, en el caso de los animales sometidos a alta densidad, a un descenso de las actividades GPX y GR, podría deberse a lo ya indicado en hígado, en el sentido de que la permanencia en las cubas experimentales habría derivado, de algún modo, en un aumento en la producción de radicales superóxido, independientemente de la densidad a la que los animales estaban siendo mantenidos y de la dieta que estaban ingiriendo, produciéndose un aumento generalizado de de los mecanismos antioxidantes. La actividad catalasa se vio afectada a lo largo del experimento, observándose un descenso de sus valores a alta densidad en aquellos grupos alimentados con dietas suplementadas con vitamina E, poniéndose de manifiesto la efectividad de esta vitamina en los mecanismos antioxidantes. Es por esto por lo que la discusión se centrará en los resultados obtenidos a los 42 días del experimento (Tabla IV.24.) donde se supone que los cambios observados se deberían a las adaptaciones derivadas de la diferente composición de las dietas y/o del aumento de la densidad.

Respecto a los grupos mantenidos a baja densidad, no se observaron cambios significativos en las actividades SOD, GPX y GR entre los animales alimentados con

las diferentes dietas; sin embargo, la actividad catalasa sí presentó diferencias entre grupos, que estarían reflejando variaciones en los niveles de  $H_2O_2$  que, en parte, podrían estar asociados a cambios en la actividad SOD, hecho que, como hemos comentado, no se puso de manifiesto al observar la actividad específica de la enzima. Una vez más, es posible que esta ausencia de diferencias en la actividad SOD se deba a que en algunos casos la enzima esté inhibida por el producto de su reacción, el  $H_2O_2$  (Kono y Fridovich, 1982). En este sentido, el análisis de las formas isoenzimáticas de la actividad SOD renal en los animales mantenidos a baja densidad (Figura IV.6.) refleja la aparición de una nueva banda correspondiente a la isoforma CuZn-SOD II en los grupos +E-HUFA y +E+HUFA, mientras que en los tres grupos con carencias vitamínicas esta isoforma no aparece, posiblemente debido a una inhibición inespecífica de ésta ligada a una mayor presencia de ROS en estas condiciones.

La actividad G6PDH presentó valores significativamente inferiores en los tres grupos que ingirieron dietas con aceite de pescado, lo que indicaría que, de acuerdo con otros estudios, el aumento de HUFAs en la dieta puede llegar a inhibir la actividad de esta enzima (Hillgartner *et al.*, 1995). Como ya se comentó anteriormente, una de las funciones primordiales de la G6PDH es aportar el NADPH necesario para el funcionamiento de la GR, cuya actuación, a su vez, es fundamental para la GPX (Tian *et al.*, 1999; Halliwell y Gutteridge, 2000; Leopold y Loscalzo, 2000). Por lo que respecta a la GR, los resultados no reflejan cambios significativos en la actividad de esta enzima, si bien en la dieta -E+HUFA fue ligeramente inferior, por lo que no se puede descartar que el menor aporte de NADPH en este grupo estuviera limitando, en cierto modo, una posible respuesta de esta enzima y, por tanto, de la GPX a nivel renal. El hecho de que este grupo presentara una mayor actividad catalasa podría apoyar esta hipótesis y, asimismo, indicaría que la mayor actividad de esta enzima podría estar compensando una menor efectividad de las enzimas antioxidantes dependientes de glutatión, derivada de la menor disponibilidad de NADPH.

Los resultados obtenidos en los animales mantenidos a alta densidad indican que, de algún modo, esta situación experimental favorece que los posibles efectos derivados de la composición de la dieta sean más manifiestos, aunque el aumento de la

densidad, *per se*, salvo en algún caso puntual, no pareció ejercer un efecto claro sobre estos parámetros a nivel renal. A esta densidad, de nuevo se pone de manifiesto que la deficiencia de vitamina E en dieta está en cierto modo ligada a un incremento de la actividad específica de determinadas enzimas antioxidantes como la SOD y la catalasa, observándose también, para esta última enzima, un comportamiento parecido en animales que consumieron dietas carentes de vitamina C. Parece claro que, la deficiencia de vitamina E podría favorecer una mayor generación de radicales superóxido a nivel renal, mientras que su aporte en dieta, aparentemente, daría lugar a una mejora de las condiciones, ligada a valores más bajos de actividad de estas enzimas. A este respecto, en el caso de la actividad SOD la ausencia de HUFAs propiciaría una situación más favorable (dieta +E-HUFA), mientras que para la catalasa los niveles de HUFAs no serían determinantes sobre los efectos beneficiosos de la vitamina E, no existiendo diferencias en la actividad de esta enzima entre individuos alimentados con dietas +E-HUFA y +E+HUFA.

Como ya se indicó en el hígado, también a nivel renal se puso de manifiesto una clara alteración del patrón isoenzimático de la SOD en los grupos mantenidos a alta densidad (Figura IV.6.), lo que indicaría que esta situación experimental estaría ejerciendo, de hecho, un efecto estresante, pero que serían los factores dietarios los que, en último término, dictarían el patrón de la respuesta frente a esta situación. En este sentido, se observa que el único grupo donde no aparece la forma isoenzimática CuZn-SOD II es el que presenta el valor más bajo de actividad específica SOD (+E-HUFA). Por otro lado, tanto el incremento de HUFAs (+E+HUFA) como la deficiencia de vitamina E con niveles altos de estos ácidos grasos (-E+HUFA) van a suponer situaciones intermedias en las que la actividad específica de la SOD se ve gradualmente incrementada y ligada a la aparición de la isoforma II. Finalmente, una situación extrema podría observarse en los grupos -E-HUFA, donde la carencia conjunta de vitamina E y de HUFAs puede dar lugar a una inhibición inespecífica de la isoforma III, presente en resto de los grupos, por un posible exceso de radicales libres. En este sentido, los animales alimentados con dieta -C+E+HUFA presentaron idéntico patrón isoenzimático al de -E-HUFA, lo que pondría de nuevo de manifiesto la importancia de la vitamina C regenerando la vitamina E para asegurar su disponibilidad

y favoreciendo una mayor estabilidad de los HUFAs (Upston *et al.*, 1999; Moreno y Mitjavila, 2003).

De las cuatro posibles isoenzimas observadas en riñón, tras inhibición con cianuro, se pone de manifiesto que una de ellas es Mn-SOD, que junto a la CuZn-SOD I sería constitutiva. Esta isoforma mitocondrial dependiente de Mn no se ve afectada ni por la dieta ni por la densidad de peces, de lo que se deduce que no nos encontramos ante una situación de estrés tan intensa que pueda afectar al metabolismo mitocondrial, si bien, la presencia de la isoforma dependiente de manganeso exclusivamente en este tejido sería un hecho destacable.

En cuanto a las actividades GPX y GR, la ausencia de cambios significativos en condiciones de alta densidad podría indicar que, a nivel renal, sería la actividad catalasa la que en mayor medida asumiría el papel de compensar las diferencias en la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> derivadas de los cambios en la actividad SOD entre otras enzimas.

Por lo que respecta a la actividad G6PDH, bajo estas condiciones, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, desapareciendo, por tanto, la tendencia encontrada a baja densidad. Puede que la menor ingesta presentada por los animales mantenidos a alta densidad atenuara el efecto inhibitorio de la actividad G6PDH por parte de los HUFAs presentes en la dieta. Sí cabe destacar que, en los grupos -E+HUFA y -C+E+HUFA se observó una mayor actividad GR y GPX, respecto a los grupos mantenidos a baja densidad, si bien este efecto sólo fue significativo para la actividad GR del grupo -E+HUFA y GPX del grupo -C+E+HUFA. Paralelamente a este efecto, se observó una ligera disminución de la actividad catalasa en esos dos grupos, respecto a los mantenidos a baja densidad, que fue más evidente en los animales alimentados con la dieta -E+HUFA. Estos resultados podrían indicar una mayor participación de las enzimas dependientes de glutatión en la degradación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aunque, como ya se ha indicado, el paralelismo entre los cambios observados en la actividad específica y el patrón isoenzimático de la SOD y la actividad catalasa podría reflejar un mayor papel desintoxicante de esta última a nivel renal.

En este tejido, las medidas de MDA se excluyeron debido a la variabilidad de resultados en los niveles de MDA obtenidos, indicativos de una posible oxidación de las muestras durante su procesado. Debido a que éste se realizó de manera idéntica para todos los tejidos, esto podría indicar una gran susceptibilidad del riñón a sufrir procesos oxidativos, pero no permite concluir con seguridad si los cambios observados en la actividad de enzimas antioxidantes fueron determinantes en la prevención de daños oxidativos.

### *GLÓBULOS ROJOS*

A lo largo del experimento se observa un aumento en las actividades catalasa y GPX que fue significativo en la mayoría de los grupos, sin hacer distinción en cuanto a densidad y tipo de dieta. Por otro lado, la actividad SOD presenta una tendencia a disminuir observada principalmente a alta densidad, siendo significativa en dos casos (Tablas IV.25. y IV.26.). Este comportamiento general en todos los grupos, podría ser de nuevo consecuencia de un período inicial de adaptación a las condiciones de confinamiento, en el que los procesos de generación de radicales libres podrían verse aumentados dando lugar a una posible inhibición de la SOD asociada a incrementos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En cuanto al los niveles de MDA, se sabe que es un producto derivado de la peroxidación lipídica y, por tanto, considerado un indicador del daño oxidativo. Basándonos en esto, los niveles de MDA en la sangre de los diferentes grupos experimentales indican que, considerados como factores independientes, ni el aumento de los HUFAs ni las carencias vitamínicas provocaron una situación de estrés oxidativo a nivel hematológico. Sin embargo, la carencia de vitamina E junto con la adición de aceite de pescado (-E+HUFA) produjo un aumento significativo de los niveles de peroxidación lipídica (MDA) ya manifestado desde los 21 días, que fue independiente de la densidad de peces, lo que pone de manifiesto que sería la combinación de ambos factores en la dieta la que provocaría una situación de estrés oxidativo en los animales.



Los eritrocitos son células en las que se produce una constante generación de especies de oxígeno reactivo (Saltman, 1989) ya que, aunque el oxígeno se une de forma reversible a la hemoglobina para ser transportado a los tejidos, bajo condiciones fisiológicas, aproximadamente el 3% de la oxihemoglobina sufre autooxidación dando lugar a la generación de radicales superóxido (Ramasarma, 1982; Lenaz, 1998; Nagababu y Rifkind, 2000). En condiciones normales, la mayor parte de estas especies de oxígeno reactivo son eliminadas por la actuación de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que constituyen las defensas antioxidantes celulares. Sin embargo, se ha descrito que en situaciones de anemia o en aquellas en que aumenta la degradación de glóbulos rojos, bien por envejecimiento de los mismos o a causa de alguna patología, los niveles de especies de oxígeno reactivo aumentan, debido tanto a un aumento en su producción como a una disminución de la capacidad antioxidante celular, dando lugar a un aumento de la peroxidación de las membranas de estas células.

A este respecto es interesante destacar que, como ya se puso de manifiesto en los parámetros hematológicos (ver Discusión apartado 2.3.), al relacionar los niveles de MDA y valores de hematocrito o hemoglobina se observa que, según el coeficiente de correlación de Pearson, ambas variables están inversamente relacionadas con los niveles de MDA (ver Resultados Tabla IV.27.). Los valores del coeficiente muestran que el porcentaje de relación entre MDA y hematocrito a baja densidad es mayor con respecto al observado a alta densidad (86% y 73% respectivamente), y que la relación entre el MDA y la hemoglobina solamente es significativa en condiciones de baja densidad (ver Resultados Tabla IV.27.). Por otro lado, al representar gráficamente dichas variables se pone de manifiesto que los valores de los pares hematocrito-MDA y hemoglobina-MDA pertenecientes a los animales que consumieron la dieta -E+HUFA se desplazan, con respecto a los del resto de los grupos, en la zona del intervalo de predicción (ver Resultados Figuras IV.3. y IV.4.). Este efecto se hace más patente en condiciones de baja densidad, mientras que a alta densidad la separación de estos grupos según el tipo de dieta consumida no se muestra tan clara, posiblemente debido a que en estas condiciones los grupos son más susceptibles de verse influidos por otros factores además de por la dieta. Este comportamiento parece lógico si consideramos que, como ya se comentó para los parámetros hematológicos, los efectos asociados al tipo de dieta

consumida fueron más acusados en condiciones de baja densidad, donde además la ingesta de alimento fue mayor. El hecho de que el grupo -E+HUFA sufra un desplazamiento con respecto a los otros, de nuevo pondría de manifiesto la relación entre esta dieta y el incremento de la susceptibilidad a los procesos oxidativos.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto, una vez más, la importancia del nivel relativo vitamina E/HUFAs de la dieta para prevenir las alteraciones de las membranas celulares (Maydani *et al.*, 1987; Farwer, 1994; Ando *et al.*, 1998; Escudero *et al.*, 1998). En los animales alimentados con la dieta -E+HUFA se estaría produciendo una alteración de las propiedades físicas de las membranas de los eritrocitos, lo que daría lugar a una mayor degradación de estas células. Además, la ausencia de vitamina E provocaría un aumento de aniones superóxido que, por acción de la enzima SOD, dismutarían hasta peróxido de hidrógeno el cual, a su vez, sería eliminado gracias a la actuación de las enzimas catalasa y GPX. En este sentido, los resultados obtenidos reflejan, en condiciones de baja densidad, un aumento de la actividad SOD, catalasa y GPX en la sangre de estos animales a los 21 días, que en el caso de la SOD permaneció hasta los 42 días. En estas condiciones, aunque no se apreciaron diferencias en el patrón de isoenzimas entre los animales alimentados con distintas dietas (Figura IV.7.), observándose una única banda correspondiente a la eCuZn-SOD IV en todos ellos, se puso de manifiesto que la mayor intensidad de esta banda se correspondía con la del grupo -E+HUFA, lo que sería un reflejo de la mayor actividad específica de la SOD observada en estos animales.

Por lo que se refiere a la actividad G6PDH, se ha indicado que el NADPH generado en la reacción catalizada por esta enzima actúa como un antioxidante protegiendo la hemoglobina intracelular (Scott *et al.*, 1991); asimismo, otros autores indican que el NADPH junto a la catalasa serían los encargados de proteger al eritrocito frente a los elevados niveles de peróxidos exógenos (Eaton, 1991). Los resultados obtenidos revelan, ya desde los 21 días del experimento, una tendencia a presentar valores más altos de actividad en el grupo -E+HUFA a ambas densidades, y que al final del experimento se puso de manifiesto de manera significativa, a baja densidad, sin presentar cambios respecto a los demás grupos en condiciones de alta densidad. Estos

resultados indicarían que, si bien a densidad baja parece observarse una mayor eliminación de aniones superóxido a lo largo del experimento, la eliminación del peróxido de hidrógeno, generado por esta actuación aumentada de la SOD, se vería incrementada a los 21 días por la acción de la catalasa y GPX, no poniéndose de manifiesto a los 42 días. Se sabe que la hemoglobina reacciona con el peróxido de hidrógeno produciendo ferrihemoglobina, que es un potente oxidante (Winterbourn, 1994; Everse y Hsia, 1997; Nagababu y Rifkind, 2000); a su vez, esta ferrihemoglobina reacciona con una segunda molécula de peróxido de hidrógeno dando lugar, tras una serie de reacciones, a la degradación del grupo hemo (Nagababu *et al.*, 1997). Además, se ha demostrado que tanto la ferrihemoglobina como el hierro producidos como consecuencia de la autooxidación de la hemoglobina están implicados en la oxidación de los lípidos de las membranas (Yamada *et al.*, 1991) encontrándose una relación directa entre los niveles de peroxidación lipídica y la tasa de oxidación de la hemoglobina (Chiu *et al.*, 1996).

Como ya se comentó anteriormente, en condiciones de alta densidad las diferencias en cuanto a la actividad de enzimas antioxidantes no fueron significativas al final del experimento. Si bien cabe destacar las diferencias ya comentadas en los niveles de MDA, como reflejo del desequilibrio en los sistemas antioxidantes. A este respecto, aunque existen estudios (Scott y Harrington, 1990) donde se pone de manifiesto que el polimorfismo en la SOD de trucha arco iris no es muy frecuente (1 de cada 12 casos presentaban una banda distinta), la ausencia de diferencias significativas en la actividad específica de la SOD podría estar compensada por la variabilidad en la expresión de sus formas isoenzimáticas observada a alta densidad (Figura IV.7.). Cabe destacar que, en el caso de los animales -E+HUFA, la situación de estrés generada podría dar lugar a oxidaciones inespecíficas de ciertas formas isoenzimáticas ya existentes (Pedrajas *et al.*, 1993, 1995) como la eCuZn-SOD IV, justificándose así la aparición de las formas II y III con diferente punto isoeléctrico y movilidad, lo que vendría apoyado por un descenso de actividad en la forma IV de este grupo. Esto parece lógico si consideramos que éste es precisamente el grupo más propenso a daños oxidativos en relación a los niveles de MDA medidos. Por otro lado, no es descartable la posibilidad de que puedan ser dos nuevas isoenzimas. Es interesante señalar que, al igual que ocurre en riñón, los

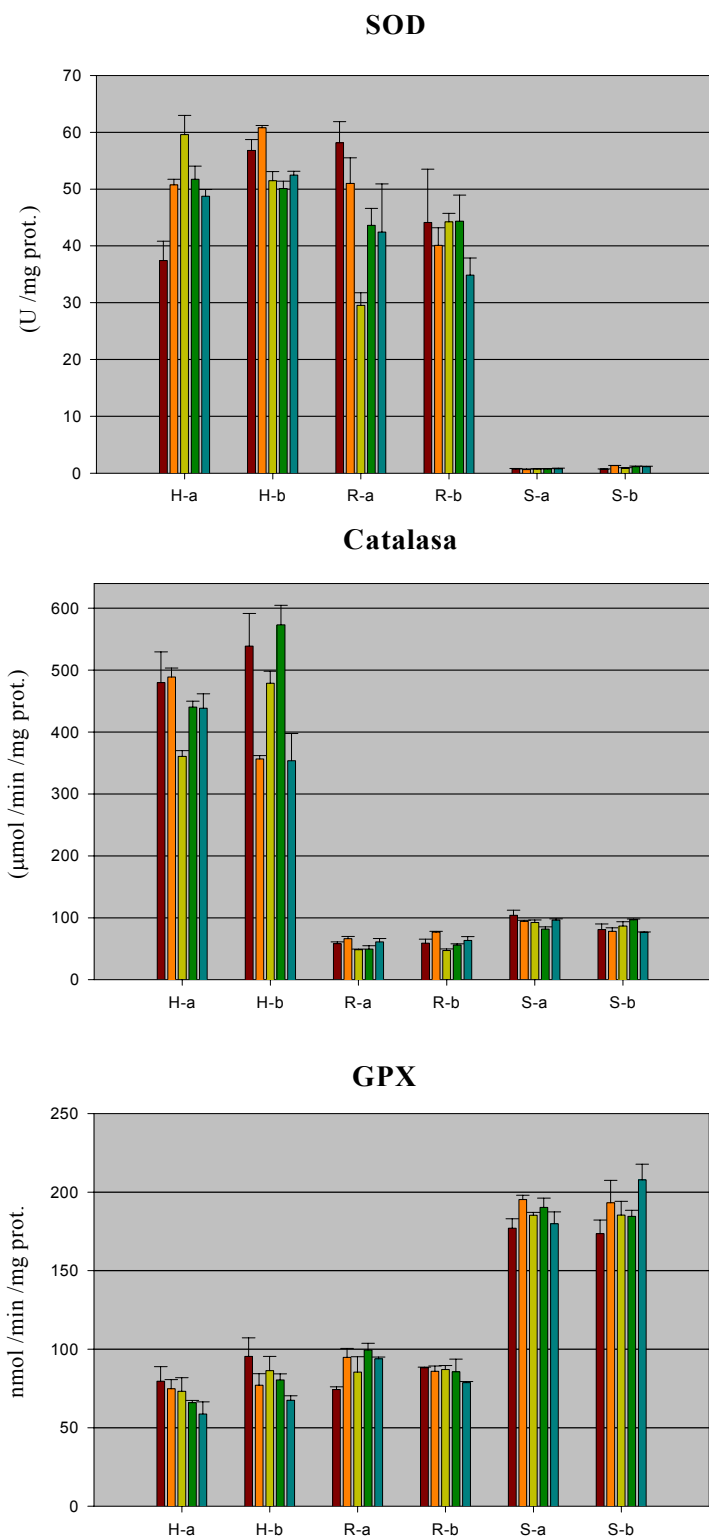
grupos -E-HUFA y -C+E+HUFA vuelven a presentar un patrón de isoenzimas común, lo que de nuevo podría reflejar la influencia de la vitamina C en el mantenimiento de los niveles de HUFAs y vitamina E (Upston *et al.*, 1999; Moreno y Mitjavila, 2003). Por último, cabe destacar la existencia de la isoforma I en todos los grupos sometidos a alta densidad, con independencia del tipo de dieta. La aparición de esta isoenzima, podría estar asociada a una activación de los sistemas antioxidantes en respuesta a situaciones de estrés, donde una activación de la tasa metabólica puede dar lugar a aumento en la producción de radicales libres (Ross *et al.*, 1991; Martínez-Álvarez *et al.*, 2002). Con relación al efecto de la densidad y su interacción con el tipo de dieta, cabe destacar que, al final del experimento, la actividad SOD en aquellos animales que consumieron dietas ricas en HUFAs (-E+HUFA, +E+HUFA, -C+E+HUFA) mostraron a baja densidad valores de actividad más altos con respecto a los de alta densidad. Esto podría asociarse a una mayor ingesta en estas condiciones, lo que implica un mayor consumo de ácidos grasos altamente oxidables (HUFAs) que a su vez sería el responsable de un incremento en la actividad de esta enzima con fines antioxidantes. Con relación a esto, se ha demostrado que, efectivamente, el patrón isoenzimático de la SOD muestra que las bandas de actividad fueron más intensas en estos grupos.

En general, parece que el efecto combinado de la ausencia de vitamina E y la adición de elevados niveles de HUFAs en la dieta generaría un estado prooxidante en la sangre de los animales que daría lugar a una serie de reacciones en cadena que habrían sido responsables de la situación de estrés oxidativo que, en último término, habría derivado en las alteraciones hematológicas observadas en estos animales y que se discutieron ampliamente.

Al final del periodo experimental se observa que, efectivamente, existe una variabilidad en cuanto a la actividad de las enzimas asociadas al metabolismo de especies de oxígeno reactivo y niveles de MDA (Figuras V.3. y V.4.). El hígado muestra valores más elevados de actividad catalasa y G6PDH con respecto a la sangre y el riñón, mientras que la sangre presenta, de manera destacada, niveles inferiores de actividad SOD, y más elevados de actividad GPX con relación a los otros dos tejidos. A este respecto, parece que existe una relación inversa entre la actividad catalasa y GPX,

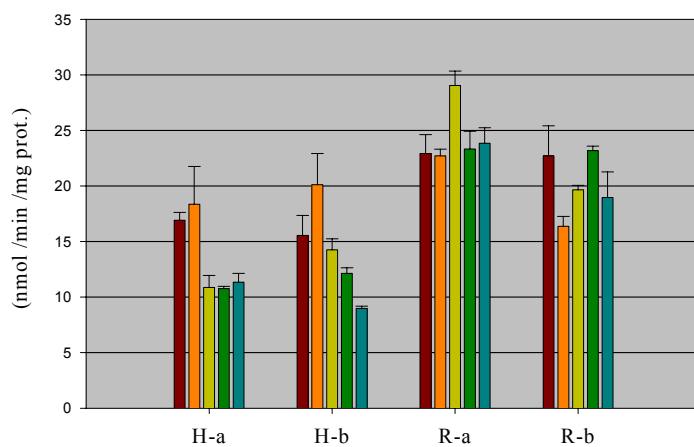
ya que, en sangre, los niveles menores de actividad catalasa se corresponden, como ya se ha comentado, con una mayor actividad GPX, observándose en el riñón y especialmente en el hígado el efecto inverso. De hecho, el índice de correlación de Pearson (-0.531) pone de manifiesto que ambas enzimas están inversamente relacionadas, existiendo un grado de dependencia del 53% entre ellas. Estudios realizados en glóbulos rojos de mamíferos muestran que en condiciones donde los niveles de  $H_2O_2$  son muy altos la catalasa cobraría un papel más importante que la GPX (Davies, 2000; Halliwell y Gutteridge, 2000) observándose algo similar en teleósteos marinos (Janssens *et al.*, 2000). Según los títulos de actividad observados, podría ocurrir que los valores más bajos de actividad SOD en sangre con respecto a los otros dos tejidos, contribuyeran, en parte, a una menor producción de  $H_2O_2$ , lo que explicaría, en cierto modo, los valores inferiores de actividad catalasa en sangre ligados a un incremento en la actividad GPX, siendo este comportamiento, más que una sustitución de la actividad de una enzima por otra, una respuesta adaptativa a variaciones en los niveles de  $H_2O_2$ .

De estos resultados se podría concluir que, posiblemente el hígado sea el tejido que presenta una mayor predisposición a daños oxidativos, en parte debida a una elevada presencia de ROS, viéndose la sangre menos afectada, y ocupando el riñón una posición intermedia. De hecho, cabe destacar que el hígado muestra, en general, niveles de MDA superiores a los de la sangre, con la salvedad de que, en ambos tejidos, es de nuevo el grupo -E+HUFA el que muestra los valores más elevados de peroxidación lipídica que, lógicamente, en el caso de la sangre fueron más destacados con respecto a los grupos alimentados con las otras dietas.

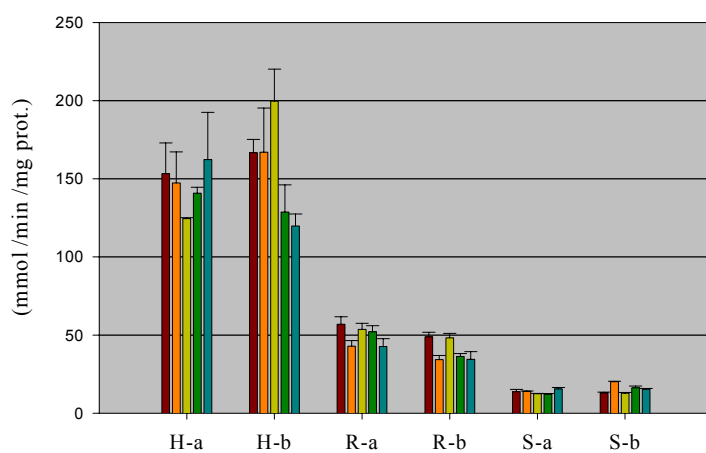


Figuras V.3. y V.4.- Actividad SOD, Catalasa, GPX, GR, G6PDH y nivel de MDA al final del experimento en los distintos tejidos para cada dieta y densidad. H (hígado), R (riñón) y S (sangre), a (alta densidad) y b (baja densidad).

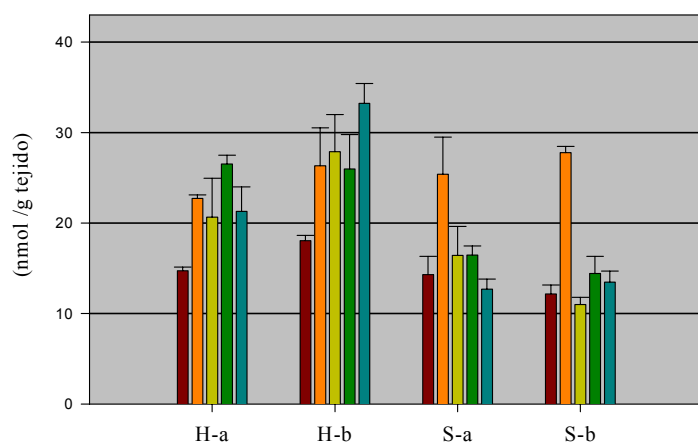
### GR



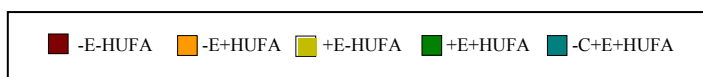
### G6PDH



### MDA



### Dieta



El estudio conjunto de las distintas isoenzimas de la SOD en hígado, riñón y sangre, muestra una amplia variabilidad en el patrón de bandas obtenido, que parece acentuarse en condiciones de alta densidad, ya que, tanto para riñón como para sangre, a baja densidad, los patrones no varían con el consumo de las diferentes dietas experimentales, mostrándose sólo en hígado la influencia de la dieta a ambas densidades. Esto, posiblemente se deba al carácter regulador que presenta este órgano, con una destacada tasa de actividad en el metabolismo intermediario y procesos de generación de radicales libres, lo que explicaría que, con independencia de la densidad, este tejido se viera más afectado por variaciones en el tipo de dieta consumida.

La presencia de Mn-SOD en riñón marca una diferencia con respecto a los otros tejidos, donde esta isoenzima no se puso de manifiesto. El hecho de que no se detecte en sangre estaría apoyado por estudios realizados en mamíferos, en los que no se ha observado dicha isoenzima, o en todo caso, como se observó en hígado de rata, no pareciendo superar el 10% de la actividad SOD total (Halliwell y Gutteridge, 2000). En base a esto, el hecho de que esta isoenzima no se haya puesto de manifiesto en la electroforesis nativa en hígado puede ser un indicativo de su bajo porcentaje en este tejido (Hidalgo *et al.*, 2002).

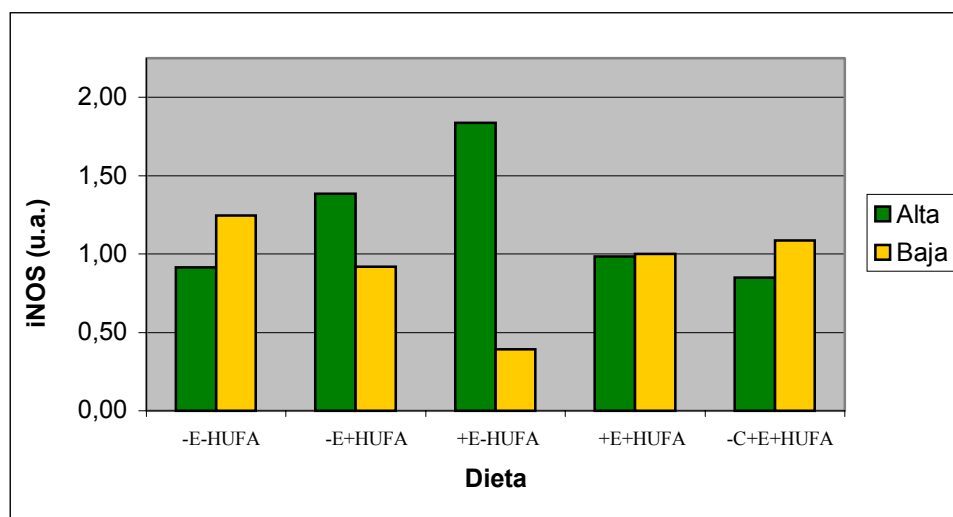
En líneas generales, las variaciones observadas en el patrón isoenzimático de la SOD tanto en hígado, como en riñón o sangre, parecen estar condicionados por el tipo de dieta consumida y la densidad de peces, cobrando en algunos casos especial importancia los niveles de HUFAs, como se observó en hígado, siendo en otros casos determinante los niveles de vitaminas E y C.

## 2.6. EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD INOS EN HÍGADO

La producción de óxido nítrico por parte de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) puede estar asociada, como ya se comentó anteriormente, a determinados tejidos como el neuronal (nNOS) y el endotelial (eNOS), o bien tener una localización más



amplia, aunque ligada a procesos de inducción (iNOS). En todos las situaciones experimentales se detectó un polipéptido relacionado inmunológicamente con la isoforma inducible de esta enzima en el tejido hepático, si bien parece que existe cierta influencia del tipo de dieta consumida y las condiciones de densidad (como posible agente estresante) en los niveles de dicho polipéptido (Figura IV.8.).



En la actualidad, existen pocos estudios que relacionen el efecto del estrés y la actividad iNOS. Por otro lado, es bien conocida la importancia de esta enzima en los mecanismos de defensa utilizados por las células del sistema inmune, al intervenir en la síntesis de óxido nítrico ( $\text{NO}^{\bullet}$ ), molécula tóxica frente a determinados patógenos (Barroso *et al.*, 2000). Con relación a esto, Saeij *et al.* (2003) demuestran que una situación de estrés puede favorecer la susceptibilidad a patógenos al disminuir la efectividad del sistema inmune. Esto podría implicar una posible inhibición de la transcripción de determinadas moléculas inmunomoduladoras así como de la actividad iNOS. Sin embargo, estos mismos autores observaron que, en truchas infectadas con *Trypanoplasma borreli* la producción de  $\text{NO}^{\bullet}$  entre animales estresados y no estresados fue similar.

Por otro lado, se conoce que, aparte de tener un papel defensivo, el  $\text{NO}^{\bullet}$  puede provocar la activación/inhibición de determinadas enzimas asociadas a síntesis de prostaglandinas y leucotrienos, hormonas, segundos mensajeros, etc., adquiriendo esta

molécula una función reguladora y adaptativa (Wink y Mitchell, 1998). Así, en mamíferos se ha observado la importancia del NO<sup>•</sup> en el mantenimiento de la respuesta de estrés asociada a la vasoconstricción endotelio-dependiente de noradrenalina. Situaciones de estrés crónico pueden atenuar la respuesta a la noradrenalina, dando lugar a una relajación del tono vascular. A este respecto, se ha puesto de manifiesto un incremento de los niveles de NO<sup>•</sup> en situaciones de estrés crónico, con el fin de favorecer el mantenimiento de la vasoconstricción (Cordellini y Vassilieff, 1998) y evitar la atenuación de esta respuesta por procesos adaptativos. El carácter regulador de esta molécula podría explicar los incrementos de iNOS observados en aquellos grupos de animales sometidos a alta densidad de peces, los cuales, sumado a la ingesta de determinado tipo de dieta (-E+HUFA y +E-HUFA), podrían estar sometidos a una situación de estrés crónico más acusada.

Con relación a la influencia de la dieta, diversos autores han demostrado un efecto inhibitor de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, en concreto aquellos de tipo n-3, sobre la iNOS a nivel transcripcional. Así, se ha puesto de manifiesto que dietas ricas en DHA (ac. docosahexanoico) favorecen los procesos infecciosos en mamíferos (Khair-El-Din *et al.*, 1996; Kielar *et al.*, 2000), no encontrando, por el contrario, otros autores, que el descenso de la síntesis de NO<sup>•</sup> en presencia de DHA se produzca a nivel transcripcional (Boutard *et al.*, 1994).

En el análisis de las muestras de hígado, se pone de manifiesto que en aquellos grupos que presentan un incremento de la iNOS a alta densidad de peces, los valores más altos se muestran en los animales que consumieron una dieta carente de HUFAs (+E-HUFA), seguidos de los -E+HUFA, en los que los bajos niveles de vitamina E podrían propiciar una menor disponibilidad de los HUFAs debido a su oxidación. Todo ello contribuiría a disminuir el efecto inhibitor de estos ácidos grasos en la síntesis de iNOS. En el caso de dietas -E-HUFA sometidas a alta densidad los resultados no muestran este comportamiento.

En cuanto al efecto directo de la vitamina E sobre la producción de NO<sup>•</sup>, Tang y colaboradores (2002) no han demostrado disminución alguna de los niveles de NO<sup>•</sup> en

hepatocitos de rata estimulados por endotoxinas y citoquinas en presencia de vitamina E. Los resultados obtenidos no muestran una actividad diferencial de la iNOS ligada a la suplementación de vitamina E en las dietas, lo que, efectivamente, podría ser un reflejo de que los niveles de su producto (NO<sup>•</sup>) no se ven alterados directamente por la presencia de esta vitamina.

Como ya se ha comentado anteriormente, existe una contribución del NO<sup>•</sup> al incremento de los procesos oxidativos debido a la formación de moléculas reactivas, observándose incluso cierto papel inhibitorio de esta molécula sobre la actividad catalasa al reaccionar con el Fe del grupo hemo de esta enzima (Farias-Eisner *et al.*, 1996) o bien por medio de su interacción con los compuestos intermediarios formados en la reacción de la catalasa (Brown *et al.* 1995), poniéndose también de manifiesto un descenso del GSH asociado al aumento de NO<sup>•</sup> (Wink *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1995; Petit *et al.*, 1996). Paradójicamente, el NO<sup>•</sup> también puede ejercer una función antioxidante, ya que puede interferir en la formación de ROS bloqueando la reacción de Fenton, al formar complejos estables con metales de transición. También podría bloquear los procesos de propagación de peroxidación lipídica al reaccionar con los peróxidos formados evitando su acción sobre otros lípidos (Wink y Mitchell, 1998). En nuestro caso, no parece que existan variaciones en la actividad de enzimas antioxidantes y niveles de MDA asociadas a una mayor presencia de iNOS, lo cual parece indicar que o bien los cambios en NO<sup>•</sup> no afectan a los procesos oxidativos o bien, de alguna manera, la presencia de la enzima no es indicativa de una mayor producción de NO<sup>•</sup>, lo cual puede deberse incluso a una inhibición de ésta por parte de su propio producto, el óxido nítrico (Wink y Mitchell, 1998).

En conclusión, se puede considerar que variaciones en la expresión de la iNOS pueden ser un reflejo de alteraciones en los mecanismos de defensa de los peces y de su estado de equilibrio; y de cómo puede haber un efecto conjunto entre una situación que podría ser estresante y la relación HUFAs/vitamina E en la dieta. Por otro lado, es interesante tener en cuenta que el papel regulador y defensivo de esta enzima, a la larga, puede favorecer un desequilibrio entre radicales libres y moléculas antioxidantes,

aunque en este caso no se pone de manifiesto posiblemente debido a fenómenos de autorregulación por parte del NO<sup>\*</sup> (Barroso *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2002).

## **VI.- CONCLUSIONES**



1.- Al someter a la trucha arco iris a condiciones de alta densidad se induce una reducción de la tasa de crecimiento debida, fundamentalmente, a una disminución de la ingesta.

2.- La selección de animales por su grado de respuesta al estrés resultó útil como estrategia para minimizar los efectos negativos del cultivo intensivo. De hecho, la selección de truchas por su baja respuesta al estrés se mostró positiva a nivel metabólico, hematológico y de utilización nutritiva de la dieta para el crecimiento, incluso en condiciones de estrés crónico por alta densidad. Por el contrario, los animales con alta respuesta de estrés mostraron los peores resultados en estas condiciones.

3.- No se observó una relación clara entre los niveles de cortisol y la respuesta fisiológica derivada del aumento de la densidad de peces. La ausencia de variaciones en los niveles plasmáticos de esta hormona en la mayoría de los grupos al final del experimento, podría ser consecuencia de procesos de aclimatación a la situación de estrés. Esto lleva a pensar que el uso de este parámetro como único criterio de evaluación de estrés crónico no sería válido.

4.- En términos generales, y desde el punto de vista práctico, el perfil de ácidos grasos de la dieta no afectó a los índices de crecimiento y utilización nutritiva, al estar cubiertas las necesidades de ácidos grasos esenciales. Por otra parte, la deficiencia de vitamina E o C no llegó a afectar al crecimiento de los animales en el tiempo de duración de los ensayos.

5.- La importancia de la relación vitamina E/HUFAs se puso claramente de manifiesto en truchas alimentadas con la dieta -E+HUFA. Este grupo presentó marcadas alteraciones histológicas, hematológicas y metabólicas, así como signos de estrés oxidativo, que se agudizaron en alta densidad, provocando una mayor mortalidad. La capacidad de la dieta para modular los efectos derivados del aumento de la densidad de peces, es un aspecto a considerar en la mejora de las condiciones de cultivo intensivo.

6.- El estudio de parámetros relacionados con el metabolismo de especies de oxígeno reactivo se muestra como una opción válida y útil en la evaluación del estado de bienestar de los animales, sumándose al resto de parámetros generalmente establecidos como marcadores de su estado fisiológico.



## VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- Adham, K.G., Hashem, H.O., Abu-Shabana, M. B. y Kamel, A.H. 2000. Vitamin C deficiency in the catfish *Clarias gariepinus*. *Aquacult. Nutr.*, 6:129-139.
- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods enzymol.*, 105: 121-126.
- Agrandi, E., Bonomi, L., Rigamonti, E., Liguori, M. y Bronzi, P. 1995. The effect of dietary lipids on tissue lipids and ammonia excretion in European eels (*Anguilla anguilla*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 111A: 445-451.
- Agrawal, N. K. y Mahajan, C. L. 1980. Hematological changes due to vitamin C deficiency in *Channa punctatus* Block. *J. Nutr.*, 110: 2172-2181.
- Aguirre, P y Gatlin III, D.M. 1999. Dietary vitamin C requirement of red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquacult. Nutr.*, 5: 247-249.
- Ahmad, S. 1995. Preface. En: *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*, pp: xi-xvii. Ed. Ahmad, S. Chapman & Hall. New York.
- Alanärä, A. y Brännäs, E. 1996. Dominance in demand-feeding behaviour in Arctic charr and rainbow trout: the effect of stocking density. *J. Fish Biol.*, 48:242-254.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E. y Knowles, R. G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem., J.*, 357: 593-615.
- Alexis, M. N., Nengas, I., Fountoulaki, E., Papoutsi, E., Andriopoulou, A., Koutsodimou, M., y Gaubaudan, J. 1999. Tissue ascorbic acid levels in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fingerlings fed diets containing different forms of ascorbic acid. *Aquaculture*, 179: 447-456.
- Andersen, D. E., Reid, S. D., Moon, T. W. y Perry, S. F. 1991. Metabolic effects associated with chronically elevated cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can J. Fish. Aquat. Sci.* Vol. 48: 1811-1817.
- Andersen, F., Lygren, B., Maage, A. y Waagbø, R. 1998. Interaction between two dietary levels of iron and two forms of ascorbic acid and the effect on growth, antioxidant status and some non-specific immune parameters in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Aquaculture*, 161: 437-451.
- Ando, K., Nagata, K., Beppu, M., Kikugawa, K., Kawabata, T., Hasegawa, K. y Suzuki, M. 1998. Effect of n-3 fatty acid supplementation on lipid peroxidation and protein aggregation in rat erythrocyte membranes. *Lipids*, 33: 505-512.
- Ando, K., Nagat, K., Yoshida, R., Kikugawa, K. y Suzuki, M. 2000. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on lipid peroxidation of rat organs. *Lipids*, 35: 401-407.
- Andrews, J. W. y Murai, T. 1975. Essentiality of vitamin C in feeds for intensively fed caged channel catfish. *J. Nutr.*, 103: 134-138.
- AOAC., 1990. Official methods of analysis. En: *Association of Official Analytical Chemist*. Ed. Helrich, K. Arlington, VA, USA.
- Aranishi, F., Mano, N., Nakane, M. y Hirose, H. 1998. Epidermal response of the Japanese eel to environmental stress. *Fish Physiol. Biochem.*, 19: 197-203.
- Arends, R. J., Mancera, J. M., Muñoz, J. L., Wendelaar-Bonga, S. E. y Flik, G. 1999. The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *J. Endocrinol.*, 163:149-157.

## VII.- Referencias bibliográficas

---

- Atalay, M., Laaksonen, D. E., Khanna, S., Kaliste-Korhonen, E., Hänninen, O. y Sen, C. K. 2000. Vitamin E regulates changes in tissue antioxidants induced by fish oil and acute exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 32: 601-607.
- Bagley, M. J., Bentley, B. y Gall, G. A. E. 1994. A genetic evaluation of the influence of stocking density on the early growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 121: 313-326.
- Bai, S. C. y Lee, K. J. 1998. Different levels of dietary DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate affect the vitamin E status of juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Aquaculture*, 161: 405-414.
- Bainy, A. C. D., Saito, E., Carvalho, P. S. M. y Junqueira, V. B. C. 1996. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquat. Toxicol.*, 34: 151-162.
- Balm, P. H. M. 1997. Immune-endocrine interactions. En: *Fish Stress and Health in Aquaculture*, pp: 196-221. Eds. Iwama G. K., Pickering A. D., Sumpter J. P. y Schreck C. B. Society for experimental biology, seminar series 62. Cambridge University Press. Cambridge.
- Balm, P. H. M y Pottinguer, T. G. 1995. Corticotrope and melanotrope POMC-derived peptides in relation to interrenal function during stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 98: 279-88.
- Barker, D. E., Khan, R. A. y Hooper, R. 1994. Bioindicators of stress in winter flounder, *Pleuronectes americanus*, captured adjacent to a pulp and paper mill in St. George's bay, Newfoundland. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 51: 2203-2209.
- Barroso, J. B., Carreras, A., Esteban, F. J., Peinado, M. A., Martínez-Lara, E., Valderrama, R., Jiménez, A., Rodrigo y Lupiáñez, J. A. 2000. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, 279: 650-656.
- Barton, B. A., Bollig, H., Hauskins, B. L. y Jansen, C. R. 2000. Juvenile pallid (*Scaphirhynchus albus*) and hybrid pallid x shovelnose (*S. albusxplatyrhynchus*) sturgeons exhibit low physiological responses to acute handling and severe confinement. *Comp. Biochem. Physiol.* 126A: 125-134.
- Barton, B. A. e Iwama, G.K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 1: 3-26.
- Barton, B. A., Rahn, A. B., Feist, G., Bolling, H. y Schreck, C. B. 1998. Physiological stress responses of the freshwater chondrosteian paddlefish (*Polyodon spathula*) to acute physical disturbances. *Comp. Biochem. Physiol.* 120A: 355-363.
- Barton, B. A., Schreck, C. B. y Barton, L. D. 1987. Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. *Dis. Aquat. Org.*, 2: 173-185.
- Basu, N., Kennedy, C. J. e Iwama, G. K. 2003. The effects of stress on the association between hsp70 and the glucocorticoid receptor in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.*, 134A: 655-663.
- Basu, N., Nakano, T., Grau, E. G. e Iwama, G. K. 2001. The effects of cortisol on heat shock protein 70 levels in two fish species. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 124: 97-105.
- Basu, N., Todgham, A. E., Ackerman, P. A., Bibeau, M. R., Nakano, K., Shulte, P. M. e Iwama, G. K. 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, 295: 173-183.
- Beauchamp, C.O. y Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 44: 276-287.

- Belanger, J.M, Son, J. H., Laugero, K. D., Moberg, G. P., Doroshov, S. I., Lankford, S. E. and Cech Jr., J. J. 2001. Effects of short-term management stress and ACTH injections on plasma cortisol levels in cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Aquaculture*, 203:165-176.
- Beckman, K. B. y Ames, B. N. 1998. The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiol. Rev.*, 75: 547-581.
- Bell, J. G. y Cowey, C. B. 1985. Roles of vitamin E and selenium in the prevention of pathologies related to fatty acid oxidation in salmonids. En: *Nutrition and Feeding in Fish*, pp: 333-347. Eds. Cowey, C. B., Mackie, A. M. y Bell, J. G. Academic Press. London.
- Bell, M.V., Henderson, R. J., Pirie, B. J. S. y Sargent, J. R. 1985. Growth, gill structure and fatty acid composition of phospholipids in the turbot (*Scophthalmus maximus*) in relation to dietary polyunsaturated fatty acid deficiencies. En: *Nutrition and Feeding in Fish*, pp: 365-369. Eds. Cowey, C. B., Mackie, A. M. y Bell, J. G. Academic Press. London.
- Bell, M. V., Henderson, R. J. y Sargent, J. R. 1986. The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83B: 711-719.
- Benedetti, A., Ferrali, M., Chieli, E. y Comporti, M. 1974. A study of the relationships between carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and liver damage in rats pretreated with vitamin E. *Chem. Biol. Interact.*, 9: 117-134.
- Benfey, T. J. y Biron, M. 2000. Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*, 184: 167-176.
- Bernier, N. J. y Perry, S. F. 1999. Cardiovascular effects of angiotensin II-mediated adrenaline release in rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, 202: 55-66.
- Bernier, N. J. y Peter, R. E. 2001. The hypothalamic-pituitary-interranal axis and the control of food intake in teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 129B: 639-644.
- Berson, A., De Beco, V., Lettéron, P., Robin, M. A., Moreau, C., El Kahwaji, J., Verthier, N., Feldmann, G., Fromenty, B. y Pessayre, D. 1998. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. *Gastroenterology*, 114:764-774.
- Billar, R. 1991. La salmonicultura en agua dulce. En: *Acuicultura II*, pp: 481-520. Ed. Barnabé, G. Editorial Omega. Barcelona.
- Biron, M. y Benfey, T. J. 1994. Cortisol, glucose and hematocrit changes during acute stress, cohort sampling, and the diel cycle in diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis* Mitchell). *Fish Physiol. Biochem.*, 13: 153-160.
- Björnsson, B. 1994. Effects of stocking density on growth rate of halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) reared in large circular tanks for three years. *Aquaculture*, 123: 259-270.
- Blaxhall, P. C. y Daisley, K. W. 1973. Routine haemathological methods for use with fish blood. *J. Fish Biol.*, 71: 309-315.
- Blom, J. H., Dabrowski, K., Rapp, J. D., Sakakura, Y. y Tsukamoto, K. 1999. Competition for space and food in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, as related to ascorbic acid status. *Aquaculture*, 180: 79-87.
- Bondar, R. J. L. y Mead, D. C. 1974. Evaluation of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* in the hexokinase method for determining glucose in serum. *Clin. Chem.*, 20: 586.

## VII.- Referencias bibliográficas

---

- Bourne, P. K. 1986. Changes in haematological parameters associated with capture and captivity of the marine teleost, *Pleuronectes platessa* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 85A: 435-443.
- Boutard, V., Fouqueray, B., Philippe, C., Perez, J. y Baud, L. 1994. Fish oil supplementation and essential fatty acid deficiency reduce nitric oxide synthesis by rat macrophages. *Kidney Int.*, 46: 1280-1286.
- Braley, H. y Anderson, T. A. 1992. Changes in blood metabolite concentrations in response to repeated capture, anaesthesia and blood sampling in the golden perch, *Macquaria ambigua*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 103A: 445-450.
- Brown, C. R. y Cameron, J. N. 1991. The induction of specific dynamic action in de channel catfish by infusion of essential amino acids. *Physiol. Zool.*, 64: 276-297.
- Brown, J. A. y Whitehead, C. 1995. Catecholamine release and interrenal response of brown trout, *Salmo trutta*, exposed to aluminium in acidic water. *J. Fish Biol.*, 46: 524-535.
- Brown, G. C. 1995. Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur. J. Biochem.*, 232: 188-191.
- Bruce, M., Oyen, F., Bell, G., Asturiano, J. F., Farndale, B., Carrillo, M., Zanuy, S., Ramos, J. y Bromage, N. 1999. Development of broodstock diets for the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) with special emphasis on the importance of n-3 and n-6 highly unsaturated fatty acid to reproductive performance. *Aquaculture*, 117: 85-97.
- Buege, J. A. y Aust, S. D. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods. enzymol.*, 52: 302-310.
- Caballero, M. J., Obach, A., Rosenlund, G., Montero, D., Gisvold, M. y Izquierdo, M. S. 2002. Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 214: 253-271.,
- Cadenas, E. 1995. Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. En: *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. Cap.1, pp: 1-46. Ed. Ahmad, S. Chapman & Hall. New York.
- Cai, Z. y Curtis, L. R. 1990. Effects of diet and temperature on food consumption, growth rate and tissue fatty-acid composition of triploid grass carp. *Aquaculture*, 88: 313-327.
- Caldwell, C. A. y Hinshaw, J. 1994. Physiological and haematological responses in rainbow trout subjected to supplemental dissolved oxygen in fish culture. *Aquaculture*, 126: 183-193.
- Campbell, P. M., Pottinger, T. G. y Sumpter, J. P. 1994. Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. *Aquaculture*, 120: 151-169.
- Carbonell, J., Feliu, J. E., Marco, R. y Sols, A. 1973. Pyruvate kinase. Classes of regulatory isoenzymes in mammalian tissues. *Eur. J. Biochem.*, 37: 148-156.
- Carlberg, I. y Mannervik, B. 1975. Purification and characterization of the flavo enzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 250: 5475-5480.
- Carragher, J. F. y Rees, C. M. 1994. Primary and secondary stress responses in golden perch, *Macquaria ambigua*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 107A: 49-56.
- Castell, J. D. 1978. Review of lipid requirements of finfish. *EIFAC/FAO Symposium on finfish nutrition and feed technology*. Hamburg. West Germany, 20-23. June.

- Chakraborty, S., Nandi, A., Mukhopadhyay, M., Mukhopadhyay, C. K. y Chatterjee, I. B. 1994. Ascorbate protects guinea pig tissues against lipid peroxidation. *Free Rad. Biol. Med.*, 16: 417-426.
- Chan, D. K. O. y Woo, N. Y. S. 1978. Effect of cortisol on the metabolism of the eel, *Anguilla japonica*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 35: 205-215.
- Chávez de Martínez, M. C. 1990. Vitamin C requirement of the mexican native cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Gunther). *Aquaculture*, 86: 409-416.
- Chen, W. J. y Yeh, S. L. 2003. Effects of fish oil in parenteral nutrition. *Nutrition*, 19: 275-279.
- Chien, L.T., Hwang, D. F. y Jeng, S. S. 1999. Effect of thermal stress on dietary requirement of vitamin C in Thornfish *Terapon jarbua*. *Fish. Sci.*, 65: 731-735.
- Chiu, D. T. Y., van den Berg, J., Kuypers, F. A., Hung, I. J., Wei, J. S. y Liu, T. Z. 1996. Correlation of membrane lipid peroxidation with oxidation of hemoglobin variants: possibly related to the rates of hemin release. *Free Rad. Biol. Med.*, 21: 89-95.
- Choe, M., Jackson, C. y Yu, B. P. 1995. Lipid peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. *Free Radic. Biol. Med.*, 18: 977-984.
- Chow, C. K. 1991. Vitamin E and oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.*, 11: 215-232.
- Clerton, P., Troutaud, D., Verlhac, V., Gabaudan, J. y Deschaux, P. 2001. Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and head kidney leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.*, 11: 1-13.
- Cordellini, S. y Vassilieff, V. S. 1998. Decreased endothelium-dependent vasoconstriction to noradrenaline in acute-stressed rats in potentiated by previous chronic stress: nitric oxide involvement. *Gen. Pharmac.*, 30: 79-83.
- Cowey, C. B. 1986. The role of nutritional factors in the prevention of peroxidative damage to tissues. 1986. *Fish Physiol. Biochem.*, 2: 171-178.
- Cowey, C. B., Adron, J. W., Walton, M. J., Murray, J., Youngson, A. y Knox, D. 1981. Tissue distribution, uptake, and requirement for  $\alpha$ -tocopherol of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed diets with a minimal content of unsaturated fatty acids. *J. Nut.*, 111: 1556-1567.
- Cowey, C. B., Adron, J. W. y Youngson, A. 1983. The vitamin E requirement of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) given diets containing polyunsaturated fatty acids derived from fish oil. *Aquaculture*, 30: 85-93.
- Cowey, C. B., Degener, E., Tacon, A. G. J., Youngson, A. y Bell, J. G. 1984. The effect of vitamin E and oxidized fish oil on the nutrition of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) grown at natural varying water temperatur, *Br. J. Nutr.*, 51: 443-451.
- Cowey, C.B., de la Higuera, M. y Adron, J.W. 1977. The effect of dietary composition and of insulin on gluconeogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br. J. Nutr.*, 38, 385-395.
- Cowey, C.B. y Walton, M.J. 1989. Intermediary metabolism. En: *Fish Nutrition*, pp: 259-289. Ed. Halver, J.E. Academic Press, San Diego.
- Craig, S. R., Washburn, B. S. y Gatlin III, D. M. 1999. Effects of dietary lipids on body composition and liver function in juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Fish Physiol. Biochem.*, 21: 249-255.

## VII.- Referencias bibliográficas

---

- Cruz, E. M. y Ridha, M. 1991. Production of the tilapia *Oreochromis spilurus* Günter stocked at different densities in sea cages. *Aquaculture*, 99: 95-103.
- Dabrowski, K., El-Fiky, N., Köck, G., Frigg, M. y Wieser, W. 1990. Requirement and utilization of ascorbic acid and ascorbic sulfate in juvenile rainbow trout. *Aquaculture*, 91: 317-337.
- Dang, Z. C., Flik, G., Ducouret, B., Hogstrand, C., Wendelaar-Bonga, S. E. y Lock, R. A. C. 2000. Effects of copper on cortisol receptor and metallothionein expression in gills of *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Toxicol.*, 51: 45-54.
- D'Apollonia, S. y Anderson, P. D. 1980. Optimal assay conditions for serum and liver Glutamate oxaloacetate transaminase, Glutamate pyruvate transaminase, and Sorbitol dehydrogenase form the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Fish. Acuatic. Sci.*, 37: 163-169.
- Davies, K. J. A. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. 2000. *Biochem. Soc. Symp.*, 61: 1-31.
- Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum protein. *Ann. New York Acad. Sci.*, 121: 404-427.
- Davis, K. B. y Parker, N. C. 1990. Physiological stress in striped bass: effect of acclimation temperature. *Aquaculture*, 91: 349-358.
- Davis, K. B., Torrance, P., Parker, N. C. y Suttle, M. A. 1985. Growth, body composition, and hepatic tyrosine aminotransferase activity in cortisol-fed channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish. Biol.*, 27: 177-184.
- Davison, W. 1997. The effects of exercise training on teleost fish, a review of recent literature. *Comp. Biochem. Physiol.*, 117A: 67-75.
- Davison, W., Axelsson, M., Forster, M. y Nilsson, S. 1995. Cardiovascular responses to acute handling stress in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* are not mediated by circulatory catecholamines. *Fish Physiol. Biochem.*, 14: 353-357.
- Day, C. P. y James, O. F. W. 1998. Hepatic steatosis: Innocent bystander or guilty party?. *Hepatology*, 27: 1463-1466.
- De Boeck, G., Vlaeminck, A., van der Linden, A. y Blust, R. 2000. The energy metabolism of common carp (*Cyprinus carpio*) when exposed to salt stress: an increase in energy expenditure or effects of starvation?. *Physiol. Biochem. Zool.*, 73: 102-111.
- de la Higuera, M. y Cárdenas, P. 1986. Hormonal effects on gluconeogenesis from L-(U-<sup>14</sup>C) glutamate in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 85B: 517-521.
- de la Higuera, M., García Gallego, M., Sanz, A., Cardenete, G., Suarez, M. D. y Moyano, F. J. 1988. Evaluation of lupin seed meal as an alternative protein source in feeding of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 71: 37-50.
- Delgado, A., Estevez, A., Hortelano, P. y Alejandre, M. J. 1994. Analyses of fatty acids from different lipids in liver and muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Influence of temperature and fasting. *Comp. Biochem. Physiol.*, 108A: 673-680.
- del Moral Leal, M. L. 1999. Correlaciones morfofuncionales en el hígado de ratas sometidas a la ingesta de dietas hiperlipídicas. *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada.
- Diouf, B., Rioux, P., Blier, P. U. y Rajotte, D. 2000. Use of brook char (*Salvelinus fontinalis*) physiological responses to stress as a teaching exercise. *Adv. Physiol. Educ.*, 23: 18-23.



- Dugan, S.G. y Moon, T.W. 1998. Cortisol does not affect hepatic  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoreceptor properties in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.*, 18: 343-352.
- Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple *F* test. *Biometrics*, 11: 1-42.
- Dwight, J. F. y Hendry, B. M. 1995. Actions of arachidonic acid on erythrocyte membrane Rb permeability. *Clin. Chim. Acta*, 238: 197-197.
- Eaton, J. 1991. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: Mysteries of the bestiary. *J. Lab. Clin. Med.*, 118: 3.
- Einarsdóttir, I. E. y Nilssen, K. J. 1996. Stress responses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) elicited by water level reduction in rearing tanks. *Fish Physiol. Biochem.*, 15: 395-400.
- Elias, H. y Bengelsdorf, H. 1952. The structure of the liver of vertebrates. *Acta Anat.*, 14: 297.
- Ellis, T., North, B., Scott, A. P., Bromage, N. R., Porter, M., y Gadd, D. 2002. The relationship between stocking density and welfare in farmed rainbow trout. *J. Fish Biol.*, 61: 493-531.
- Escudero, A., Montilla, J. C., García, J. M., Sánchez-Quevedo, M. C., Periago, J. L., Hortelano, P. y Suárez, M. D. 1998. Effect of dietary (n-9), (n-6) and (n-3) fatty acids on membrane lipid composition and morphology of rat erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1394: 65-73.
- Everse, J. y Hsia, N. 1997. The toxicities of native and modified hemoglobins. *Free Rad. Biol. Med.*, 22: 1075-1099.
- Fabbri, E., Capuzzo, A. y Moon, T. W. 1998. The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: An overview. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120C: 177-192.
- Farias-Eisner, R., Chaudhuri, G., Aeberhard, E., Fukuto, J. M. 1996. The chemistry and tumoricidal activity of nitric-oxide hydrogen-peroxide and the implications to cell resistance susceptibility. *J. Biol. Chem.*, 271: 6144-6151.
- Farwer, S. R. 1994. The vitamin E nutritional status of rats fed on diets high in fish oil. *Brit. J. Nut.*, 72: 127-145.
- Fatima, M., Ahmad, I., Sayeed, I., Athar, M. y Raisuddin, S. 2000. Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues. *Aquat. Toxicol.*, 49: 243-250.
- Farrell, A. P., Johansen, J. A. y Suarez, R. K. 1992. Effects of exercise-training on cardiac performance and muscle enzymes rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol. Biochem.*, 19: 303-312.
- Felton, G. W. 1995. Oxidative stress of vertebrates and invertebrates. En: *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. Cap. 10, pp: 356-434. Ed. Ahmad, S. Chapman & Hall. New York.
- Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M. S., Robaina, L., Valencia, A., Salhi, M. y Vergara, J. M. 1995. Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 132: 325-337.
- Fevolden, S. E., Nordmo, R., Refstie, T. y Røed, K. H. 1993a. Disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) selected for high or low responses to stress. *Aquaculture*, 109: 215-224.
- Fevolden, S. E., Refstie, T. y Gjerde, B. 1993b. Genetic and phenotypic parameters for cortisol and glucose stress response in Atlantic salmon and rainbow trout. *Aquaculture*, 118: 205-216.

## VII.- Referencias bibliográficas

---

- Fevolden, S. E., Refstie, T. y Røed, K. H. 1991. Selection for high and low cortisol stress response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 95: 53-65.
- Fevolden, S. E., Refstie, T. y Røed, K. H. 1992. Disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for stress response. *Aquaculture*, 104: 19-29.
- Fevolden, S. E. y Røed, K. H. 1993c. Cortisol and immune characteristics in rainbow trout (*O. mykiss*) selected for high or low tolerance to stress. *J. Fish Biol.*, 43: 919-930.
- Fevolden, S. E., Røed, K. H. y Fjalestad, T. K. 2002. Selection response of cortisol and lysozyme in rainbow trout and correlation to growth. *Aquaculture*, 205: 61-75.
- Fitzgerald, J. P. 1992. Comparative analysis of superoxide dismutase activities in a range of temperate and tropical teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 101B: 111-114.
- Flos, R. 1994. El estrés en los cultivos de peces: Impacto en la producción y estrategias correctoras. Aulas del mar. Acuicultura: Cultivo, alimentación y genética de peces, pp: 169-183. Eds. Zamora, S., Perez, F. y García, M. P. Univ. Murcia.
- Flos, R., Reig, L., Torres, P. y Tort, L. 1988. Primary and secondary stress responses to grading and hauling in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture*, 71: 99-106.
- Foo, J. T. W. y Lam, T. J. 1993a. Retardation of ovarian growth and depression of serum steroid levels in tilapia *Oreochromis mossambicus*, by cortisol implantation. *Aquaculture*, 115: 133-143.
- Foo, J. T. W. y Lam, T. J. 1993b. Serum cortisol response to handling stress and the effect of cortisol implantation on testosterone level in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*, 115: 145-158.
- Foster, G. D. y Moon, T. W. 1986. Cortisol and liver metabolism of immature American eels, *Anguilla rostrata* (LeSueur). *Fish Physiol. Biochem.*, 1: 113-124.
- Frei, B., England, L. y Ames, B. N. 1989. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 6377-6381.
- Fridovich, I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.*, 247: 1-11.
- Frigg, M., Prabucki, A. L. y Ruhdel, E. U. 1990. Effect of dietary vitamin E levels on oxidative stability on trout fillets. *Aquaculture*, 84: 145-158.
- Frischknecht, R. T., Wahli, W. y Meier, W. 1994. Comparison of pathological changes due to deficiency of vitamin C, vitamin E and combinations of vitamins C and E in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, 17: 31-45.
- Fromenty, B. y Pessayre, 1995. Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.*, 67:101-154.
- Fromenty, B. y Pessayre, 1997. Impaired mitochondrial function in microvesicular steatosis. Effects of drugs, ethanol, hormones and cytokines. *J. Hepatol.*, 26: 43-53.
- Fryer, J. N. y Lederis, K. 1986. Control of corticotropin secretion in teleost fishes. *Am. Zool.*, 26: 1017-1026.
- Furimsky, M., Moon, T. W. y Perry, S. F. 1997. Calcium signalling in isolated single chromaffin cells of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Comp. Physiol.* 166: 396-404.

- Furones, M. D., Alderman, D. J., Bucke, D., Fletcher, T. C., Knox, D. y White, A. 1992. Dietary vitamin E and the response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to infection with *Yersinia ruckeri*. *J. Fish Biol.*, 41: 1037-1041.
- Gamperl, A. K., Vijayan, M. M. y Boutilier, R. G. 1994. Epinephrine, norepinephrine, and cortisol concentrations in cannulated seawater-acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following black-box confinement and epinephrine injection. *J. Fish. Biol.*, 45: 313-324.
- Gapasin, R. S. J., Bombeo, R., Lavens, P., Sorgeloos, P. y Nelis, H. 1998. Enrichment of live food with essential fatty acids and vitamin C: effects on milkfish (*Chanos chanos*) larval performance. *Aquaculture*, 162: 269-286.
- García-Gallego, M. 1992. Alimentación lipídica en peces. Aulas del mar. Acuicultura: Cultivo y alimentación de peces, pp: 161-182. Eds. Zamora, S., Perez Llamas, F. y García Riera, M. P. Univ. Murcia.
- García-Rejón, L. y Morales, A.E. 1989a. El estrés en los peces. I.-Respuestas fisiológicas. *Ars Pharmaceutica*. Tomo XXX, Núms. 1-2: 141-148.
- García-Rejón, L. y Morales, A.E. 1989b. El estrés en los peces. II.- Factores estresantes comunes en los peces cultivados. *Ars Pharmaceutica*. Tomo XXX, Núms. 3-4: 279-289.
- Gatlin III, D. M., Bai, S. C. y Erickson, M. C. 1992. Effects of dietary vitamin E and synthetic antioxidants on composition and storage quality of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. 1992. *Aquaculture*, 106: 323-332.
- Gatlin III, D. M., Poe, W. E., Wilson, R. P., Ainsworth, A. J. y Bowser, P. R. 1986. Effects of stocking density and vitamin C status on vitamin E-adequate and vitamin E-deficient fingerling channel catfish. *Aquaculture*, 56: 187-195,
- Gatta, P.P., Pirini, M., Testi, S., Vignola, G. y Monetti, P. G. 2000. The influence of different levels of dietary vitamin E on sea bass *Dicentrarchus labrax* flesh quality. *Aquacult. Nutr.*, 6: 47-52.
- George, S., Riley, C., McEvoy, J. y 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. y Taylor, S. 2000b. Dietary effects on xenobiotic-induced oxidative damage in 'O' group plaice. *Mar. Environ. Res.*, 50: 80-81.
- Gilchrist, B. J., Tipping, D. R., Hake, L., Levy, A. y Baker, B. I. 2000. The effects of acute and chronic stresses on vasotocin gene transcripts in the brain of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Neuroendocrinol.*, 12: 795-801.
- Gjedrem, T. 1992. Breeding plans for rainbow trout, *Aquaculture*, 100: 73-83.
- Gjedrem, T., Salte, R. y Gjøen, H. M. 1991. Genetic variation in susceptibility of Atlantic salmon to furunculosis. *Aquaculture*, 97: 1-6.
- Goede, R. W. y Barton, B. A. 1990. Organismic indices and an autopsy-based assessment as indicators of health and condition of fish. *Am. Fish. Soc. Symp.*, 8:93-108.
- Gökkuşu, C. y Mostafazadeh, T. 2003. Changes of oxidative stress in various tissues by long-term administration of vitamin E in hypercholesterolemic rats. *Clin. Chim. Acta*, 328: 155-161.
- Golod, E. A. 1997. The membrane phospholipid peroxidation and Ca<sup>2+</sup> dependent ATPase activity on the microsomal fractions isolated from rat renal tissue in thermal ischemia with and without alpha-tocopherol protection. *Urol. Nefrol.* (Mosc),5: 5-9.

## VII.- Referencias bibliográficas

---

- Góth, L. 2000. Lipid and carbohydrate metabolism in acatalasemia. *Clin. Chem.*, 46: 564-566.
- Grant, B. F. y Mehrle, P. M. 1973. Endrin toxicosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Bd. Can.* 30: 31-40.
- Green, J. A. y Baker, B. I. 1991. The influence of repeated stress on the release of melanin-concentrating hormone in the rainbow trout. *J. Endocrinol.*, 128: 261-266.
- Green, J. A., Baker, B. I. y Kawauchi, H. 1992. The effect of rearing rainbow trout on black or white backgrounds and their secretion of melanin-concentrating hormone and their sensitivity to stress. *J. Endocrinol.*, 128: 267-274.
- Gregory, T. R. y Wood, C. M. 1998. Individual variation and interrelationships between swimming performance, growth rate, and feeding in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 55: 1583-1590.
- Gregory, T. R. y Wood, C. M. 1999. The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming performance of juvenile rainbow trout. *Physiol. Biochem. Zool.*, 72: 286-295.
- Guerriero, G., Di Finizio, A. y Ciarcia, G. 2002. Stress-induced changes of plasma antioxidants in aquacultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 132A: 205-211.
- Gwoździński, K., Roche, H. y Pérès, G. 1992. The comparison of the effects of heavy metal ions on the antioxidant enzyme activities in human and fish *Dicentrarchus labrax* erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 102C: 57-60.
- Hai, D. Q., Varga, Sz. I. y Matkovics, B. 1997. Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 117C: 83-88.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. 2000. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3ª ed. Oxford University Press. Oxford.
- Halver, J. E. 1972. The Vitamins. En: *Fish Nutrition*, pp:30-103. Ed. Halver, J. E. Academic Press. New York & London.
- Halver, J. E. Recent advances in vitamin nutrition and metabolism in fish. 1985. En: *Nutrition and feeding in fish*, pp: 415-429. Ed. Cowey, C. B., Mackie, A. M. y Bell, J. C. Academic Press. London.
- Hamre, K., Hjeltne, B., Kryvi, H., Sandberg, S., Lorentzen, M. y Lie, Ø. 1994. Decreased concentration of hemoglobin, accumulation of lipid oxidation products and unchanged skeletal muscle in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed low dietary vitamin E. *Fish Physiol. Biochem.*, 12: 421-429.
- Hamre, K. y Lie, O. 1995.  $\alpha$ -Tocopherol levels in different organs of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Effect of smoltification, dietary levels of n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E. *Comp. Biochem. Physiol.*, 111A: 547-554.
- Hamre, K., Waagbø, R., Berge, R. K. y Lie, Ø. 1997. Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *Free Rad. Biol. Med.*, 22: 137-149.
- Hansen, H. J. M. y Abraham, S. 1989. Compartmentation of gluconeogenesis in the fasted eel (*Anguilla anguilla*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 92B: 697-703.
- Hardie, L. J., Fletcher, T. C. y Secombes, C. J. 1990. The Effect of Vitamin E on the immune response of the Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 87: 1-13.

- Hårding, J. 1978. Maturation of circulating red blood cells in young Baltic salmon (*Salmo salar* L.). *Acta Physiol. Scand.*, 102: 290-300.
- Harris, W. S. 1996. n-3 fatty acids and lipoproteins: Comparison of results from human and animal studies. *Lipids*, 31: 243-252.
- Harris, J. y Bird, D. J. 2000. Modulation of the fish immune system by hormones. *Vet. Immunol. Immunop.*, 77: 163-176.
- Hathaway, C. B. y Epple, A. 1989. The sources of plasma catecholamines in the American eel, *Anguilla rostrata*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 74: 418-30.
- Heath, D. D., Bernier, N. J., Heath, J. W. e Iwama, K. G. 1993. Genetic, environmental, and interaction effects on growth and stress response of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) fry. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50: 435-442.
- Henderson, I. W. y Garland, H. O. 1980. The interrenal gland in pisces. Part 2. Physiology. En: *General, Comparative and Clinical Endocrinology of the Adrenal Cortex*, Vol. 3, pp: 474-523. Academic Press, London.
- Henderson, R. J. y Sargent, J. R. 1985. Fatty acid metabolism in fish. En: *Nutrition and Feeding in Fish*, pp:349-364. Eds. Cowey, C. B., Mackie, A. M. y Bell, J. G. Academic Press. London.
- Henderson, R. J., Tillmanns, M. M. y Sargent, J. R. 1996. The lipid composition of two species of Serrasalmid fish in relation to dietary polyunsaturated fatty acids. *J. Fish Biol.*, 48: 522-538.
- Hengsawat, K., Ward, F. J. y Jaruratjamonr, P. 1997. The effect of stocking density on yield, growth and mortality of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell 1822) cultured in cages. *Aquaculture*, 152: 67-76.
- Henrique, M. M. F., Gomes, E. F., Gouillou-Coustans, M. F., Oliva-Teles, A. y Davies, S. J. 1998. Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 161: 415-426.
- Hermes-Lima, M., Storey, J. M. y Storey, K. B. 1998. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120B: 437-448.
- Hesthagen, T. y Johnsen, B. O. 1992. Effects of fish density and size on survival, growth and production of hatchery-reared brown trout (*Salmo trutta* L.) in lakes. *Fish. Res.*, 15: 147-156.
- Hidalgo, J., Campmany, L., Borrás, M., Garvey, J. S. y Armario, A. 1988. Metallothionein response to stress in rats: role of free radical scavenging. *Am. J. Physiol.*, 255: 518-524.
- Hidalgo, M. C., Expósito, A., Palma, J. M. y de la Hígera, M. 2002. Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 34: 183-193.
- Hillgartner, F. B., Salati, L. M. y Goodridge, A. G. 1995. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiol. Rev.*, 75:47-76.
- Hilton, J. W., Cho, C. Y. y Slinger, S. J. 1978. Effect of graded levels of supplemental ascorbic acid in practical diets fed to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 35: 431-436.
- Hobby, A. C., Pankhurst, N. W. y Haddy, J. A. 2000. The effect of short term confinement stress on binding characteristics of sex steroid binding protein (BSP) in female black bream (*Acanthopagrus butcheri*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 125A: 85-94.

## VII.- Referencias bibliográficas

---

- Höglund, E., Kolm, N. y Winberg, S. 2001. Stress-induced changes in brain serotonergic activity, plasma cortisol and aggressive behavior in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) in counteracted by L-DOPA. *Physiol. Behav.*, 74: 381-389.
- Holm, J. C., Refstie, T. y Bo, S. 1990. The effect of fish density and feeding regimes on individual growth rate and mortality on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 89: 225-232.
- Horrocks, L. A. y Yeo, Y. K. 1999. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol. Res.*, 40: 211-225.
- Hossain, M. A. R., Beveridge, M. C. M. y Haylor, G. S. 1998. The effects of density, light and shelter on the growth and survival of African catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) fingerlings. *Aquaculture*, 160: 251-258.
- Houston, A. H., Dobric, N. y Kahurananga, R. 1996a. The nature of hematological response in fish. Studies on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to simulated winter, spring and summer conditions. *Fish Physiol. Biochem.*, 15: 339-347.
- Houston, A. H., Roberts, W. C. y Kennington, J. A. 1996b. Hematological response in fish: pronephric and splenic involvements in the goldfish, *Carassius auratus* L. *Fish Physiol. Biochem.*, 15: 481-489.
- Huang, C. H., Huang, M. C. y Hou, P. C. 1998. Effect of dietary lipids on fatty acid composition and lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120B: 331-336.
- Huber, M., Dalla Via, J. y Wieser, W. 1989. Fish intermediary metabolism and recovery after acute handling stress. *Aquaculture- A biotechnology in progress*. De Pauw, N., Jaspers, E., Ackefors, H., Wilkins, N. (Eds). *Eur. Aquacult. Soc.*, Bredene, Belgium.
- Ibeas, C., Cejas, J., Gómez, T., Jerez, S. y Lorenzo, A. 1996. Influence of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids levels on juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth and tissue fatty acid composition. *Aquaculture*, 142: 221-235.
- Ibrahim, W., Lee, U. S., Yeh, C. C., Szabo, J., Bruckner, G. y Chow, C. K. 1997. Oxidative stress and antioxidant status in mouse liver: Effects of dietary lipid, vitamin E and iron. *J. Nutr.*, 127: 1401-1406.
- Ibrahim, W., Lee, U. S., Szabo, J., Bruckner, G. y Chow, C. K. 1999. Oxidative stress and antioxidant status in mouse kidney: Effects of dietary lipid and vitamin E plus iron. *J. Nutr. Biochem.*, 10: 674-678.
- Irwin, S., O'Halloran, J. y Fitzgerald, R. D. 1999. Stocking density, growth and growth variation in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (Rafinesque). *Aquaculture*, 178: 77-88.
- Ito, T., Murata, H., Tsuda, T., Yamada, T., Yanauchi, K., Ukawa, M., Yamaguchi, T., Yoshida, T. y Sakai, T. 1999. Effects of  $\alpha$ -tocopherol levels in extrusion pellets on *in vivo* lipid peroxidation levels and antioxidant activities in cultured yellowtail *seriola quinqueradiata* injected with the causative bacteria of fish jaundice. *Fish. Sci.*, 65: 679-683.
- Iversen, M., Finstad, B. y Nilssen, K. J. 1998. Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture*, 168: 387-394.
- Jackson, M. J. 1994. Symposium on "Antioxidants". Can dietary micronutrients influence tissue antioxidant capacity?. *Proc. Nutr. Soc.*, 53: 53-57.
- Janssens, P.A. y Waterman, J. 1988. Hormonal regulation of gluconeogenesis and glycogenolysis in carp (*Cyprinus carpio*) liver pieces cultured *in vitro*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 91A: 451-455.

- Jobling, M. 1995. Simple indices for the assessment of the influences of the social environment on growth performance, exemplified by studies on Arctic charr. *Aquacult. Int.*, 3: 60-65.
- John, S., Kale, M., Rathore, N. y Bhatnagar, D. 2001. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J. Nut. Biochem.*, 12: 500-504.
- Jönsson, A. C., Wahlquist, I. y Hansson, T. 1983. Effects of hypophysectomy and cortisol on the catecholamine biosynthesis and catecholamine content in chromaffin tissue from rainbow trout. *Salmo gairdneri. Gen. Comp. Endocrinol.*, 51: 278-285.
- Jørgensen, E. H., Christiansen, J. S. y Jobling, M. 1993. Effects of stocking density on food intake, growth performance and oxygen consumption in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture*, 110: 191-204.
- Jørgensen, E. H. y Jobling, M. 1993. The effects of exercise on growth, food utilisation and osmoregulatory capacity of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 116: 233-246.
- Kagawa, N., Ryo, K. y Mugiya, Y. 1999. Enhanced expression of stress protein 70 in the brains of goldfish, *Carassius auratus*, reared with bluegills, *Lepomis macrochirus*. *Fish Physiol. Biochem.*, 21: 103-110.
- Kanazawa, A. 1985. Essential fatty acid and lipid requirement of fish. En: *Nutrition and Feeding in Fish*, pp: 281-298. Eds. Cowey, C. B., Mackie, A. M. y Bell, J. G. Academic Press. London.
- Kanazawa, A. 1997. Effects of docosahexaenoic acid and phospholipids on stress tolerance of fish. *Aquaculture*, 155: 129-134.
- Karplus, I., Dopfer, D., y Goldan O. 2000. The effect of food competition and relative size of group members on growth of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Fish Physiol. Biochem.*, 22: 119-123.
- Keys, A. y Kimura, N. 1970. Diets of middle-aged farmers in Japan. *An. J. Clin. Nut.*, 23: 212-223.
- Keen, A. M., Steele, C. y Houston, A. H. 1989. The circulating erythrocytes of rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94A: 699-711.
- Khair-El-Din, T., Sicher, S. C., Vazquez, M. A., Cheng, G. W., Stallworth, K. A., Kitamura, K., Miller, R. T. y Lu, C. Y. 1996. Transcription of the murine iNOS gene is inhibited by docosahexaenoic acid, a major constituent of fetal and neonatal sera as well as fish oils. *J. Exp. Med.*, 183: 1241-1246.
- Khan, M. N., Reddy, P. K., Renaud, R. L. y Leatherland, J. F. 1997. Effect of cortisol on the metabolism of 17-hidroxyprogesterone by Arctic charr and rainbow trout embryos. *Fish Physiol. Biochem.*, 16: 197-209.
- Kielar, M. L., Jeyarajah, D. R., Penfield, J. G. and Lu, C. Y. 2000. Docosahexaenoic acid decreases IRF-1 mRNA and thus inhibits activation of both the IRF-E and NFkappa d response elements of the iNOS promoter. *Transplantation*, 27: 2131-2137.
- Kiessling, A., Pickova, J., Johansson, L., Åsgård, T., Storebakken, T. y Kiessling, K-H. 2001. Changes in fatty acid composition in muscle and adipose tissue of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to ration and age. *Food Chem.*, 73: 271-284.
- Kirkman, N. H. y Gaetanni, G. F. 1984. Catalase: A tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81: 4343-4347.
- Kirkman, N. H., Rolfo, M., Ferraris, A. M., Gaetani, G. F. 1999. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J. Biol. Chem.*, 247: 13908-13914.

## VII.- Referencias bibliográficas

---

- Kiron, V., Fukuda, H., Takeuchi, T. y Watanabe, T. 1995. Essential fatty acid nutrition and defence mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 111A: 361-367.
- Kjartansson, H., Fivelstad, S., Thomassen, J. M. y Smith, M. J. 1988. Effects of different stocking densities on physiological parameters and growth of adult Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared in circular tanks. *Aquaculture*, 73: 261-274.
- Knights, B. 1985. Feeding behaviour and fish culture. En: *Nutrition and Feeding in Fish*, pp: 333-347. Eds. Cowey, C. B., Mackie, A. M. y Bell, J. G. Academic Press. London.
- Kolayli, S., Keha, E. 1999. A comparative study of antioxidant enzyme activities in freshwater and seawater-adapted rainbow trout. *J. Biochem. Molec. Toxicol.*, 13: 334-337.
- Kolkovski, S., Czesny, S., Yackey, C., Moreau, R., Cihla, F., Mahan, D. y Dabrowski, K. 2000. The effect of vitamins C and E in (n-3) highly unsaturated fatty acids-enriched *Artemia nauplii* on growth, survival, *Stizostedion vitreum* larvae. *Aquacult. Nutr.*, 6: 199-206.
- Kono, Y. y Fridovich, I. 1982. Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.*, 257: 5751-5754.
- Kowen, W. M., Tandler, A., Kissil, G. Wm., Sklan, D., Friezlander, O. y Harel, M. 1990. The effect of dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids on growth, survival and swim bladder development in *Sparus aurata* larvae. *Aquaculture*, 91: 131-141.
- Kraul, S., Brittain, K., Cantrell, R., Nagao, T., Ako, H., Ogasawara, A. y Kitagawa, H. 1993. Nutritional factors affecting stress resistance in the larval mahimahi *Coryphaena hippurus*. *J. World Aquacult. Soc.*, 24: 186-193.
- Kroes, R., Schaefer, E. J., Squire, R. A. y Williams, G. M. 2003. A review of the safety of DHA45-oil. *Food Chem. Toxicol.*, 41: 1433-1446.
- Krumschnabel, G. y Lackner, R. 1993. Stress responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* alevins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104A: 777-783.
- Kurata, M., Suzuki, M., Haruta, K. y Takeda, K. 1994. Relationship between erythrocyte deformability and glutathione under oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.*, 107A: 7-12.
- Laidley, C. W. y Leatherland, J. F. 1988. Circadian studies of plasma cortisol, thyroid hormone, protein, glucose and ion concentration, liver glycogen concentration and liver and spleen weight in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Comp. Biochem. Physiol.*, 89A: 495-502.
- Laidley, C. W., Woo, P. T. K. y Leatherland, J. F. 1988. The stress-response of rainbow trout to experimental infection with the blood parasite *Cryptobia salmositica* Katz, 1951. *J. Fish Biol.* 32: 253-261.
- Laing, K. J., Hardie, L. J., Aartsen, W., Grabowski, P. S. y Secombes, C. J. 1999. Expression of an inducible nitric oxide synthase gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Comp. Immunol.*, 23: 71-85.
- Lane, H. C., Weaver, J. W., Benson, J. A. y Nichols, H. A. 1982. Some age related changes of adult rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, following starvation and bleeding. *J. Fish Biol.*, 17: 75-81.
- Lappivaara, J. 2001. Effects of acute handling stress on whitefish *Coregonus lavaretus* after prolonged exposure to biologically treated and untreated bleached kraft mill effluent. *Arch. Environ. Con. Tox.*, 41: 55-64.
- Larsen, P. C. y Sniezsko, S. F. 1961. Comparison of various methods of determination of haemoglobin in trout blood. *Prog. Fish. Cult.*, 23: 8-17.



- Lay, P. A. y Baldwin, J. 1999. What determines the size of teleost erythrocytes? Correlations with oxygen transport and nuclear volume. *Fish Physiol. Biochem.*, 20: 31-35.
- Latzko, E. y Gibbs, M. 1970. Alkaline C-Fructose-1,6-di-phosphatase. En: *Methods of enzymatic analysis*, Vol. 2, pp: 881-884. Ed. Bergmeyer, H. U. Academic Press. London.
- Leach, G. J. y Taylor, M. H. 1980. The role of cortisol in stress-induced metabolic changes in *Fundulus heteroclitus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 42: 219-227.
- Leach, G. J. y Taylor, M. H. 1982. The effect of cortisol treatment on carbohydrate and protein metabolism in *Fundulus heteroclitus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 48: 76-83.
- Leatherland, J. F. 1993. Stocking density and cohort sampling effects on endocrine interactions in rainbow trout. *Aquacult. Int.*, 1: 137-156.
- Leatherland, J. F. y Cho, C. Y. 1985. Effect of rearing density on thyroid and interrenal gland activity and plasma and hepatic metabolite levels in rainbow trout. *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish. Biol.*, 27: 583-592.
- Lecklin, T., Tuominen, A. and Nikinmaa, M. 2000. The adrenergic volume changes of immature and mature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes. *J. Exp. Biol.*, 203: 3025-3031.
- Lefrançois, C., Claireaux, G., Mercier, C. y Aubin, J. 2001. Effect of density on the routine metabolic expenditure of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 195: 269-277.
- Lehninger, A. L. (1986). *Principios de bioquímica*, Cap. 20. Ediciones Omega, S. A. Barcelona.
- Lemaire, P., Drai, P., Mathieu, A., Lemaire, S., Carrière, S., Giudicelli, J. y Lafaurie, M. 1991. Changes with different diets in plasma enzymes (GOT, GPT, LDH, ALP) and plasma lipids (cholesterol, triglycerides) of sea-bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 93: 63-75.
- Lenaz, G. 1998. Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Biochim. Biophys. Acta*, 1366: 53-67.
- Leopold, J. A. y Loscalzo, J. 2000. Cyclic strain modulates resistance to oxidant stress by increasing G6PDH expression in smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.*, 279: H2477-H2485.
- Lepage, O., Overli, O., Peterson, E., Järvi, T. y Winberg, S. 2000. Differential stress coping in wild and domesticated sea trout. *Brain Behav. Evolut.*, 56: 259-238.
- Lethimonier, C., Flouriot, G., Valotaire, Y., Kah, O. y Ducouret, B. 2000. Transcriptional interference between glucocorticoid receptor and estradiol receptor mediates the inhibitory effect of cortisol on fish vitellogenesis. *Biol. Reprod.*, 62: 1763-1771.
- Lettéron, P., Fromenty, B., Terris, B., Degott, C. y Pessayre, D. 1996. Acute and chronic hepatic steatosis lead to *in vivo* lipid peroxidation in mice. *J. Hepatol.*, 24: 200-208.
- Lidman, U., Dave, G., Johansson-Sjöbeck, M. L., Larsson, A. y Lewander, K. 1979. Metabolic effects of cortisol in the European eel, *Anguilla anguilla* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 63A: 339-344.
- Lie, Ø., Sandvin, A. y Waagbø, R. 1993. Influence of dietary fatty acids on the lipid composition of lipoproteins in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiol. Biochem.*, 12: 249-260.
- Liebler, D. C. y Reed, D. J. 1997. Free-radical defense and repair mechanisms. En: *Free Rad. Toxicol.* Cap. 8, pp: 141-171. Ed. Wallace, K. B. Taylor & Francis. USA.

## VII.- Referencias bibliográficas

---

- Lied, E. y Braaten, B. 1984. The effect of feeding and starvation and different ratios of protein-energy to total energy in the feed on the excretion of ammonia in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 78A: 49-52.
- Lim, C. y Lovell, R. T. 1978. Phylogeny of vitamin C deficiency syndrome in channel catfish. *J. Nutr.*, 108: 1137-1141.
- Lindström-Seppä, P., Roy, S., Huuskonen, S., Tossavainen, K., Ritola, O. y Marin, E. 1996. Biotransformation and glutathione homeostasis in rainbow trout exposed to chemical and physical stress *Mar. Environ. Res.*, 42: 323-327.
- Logue, J. A., Howell, B. R., Bell, J. G. y Cossins, A. R. 2000. Dietary n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid deprivation, tissue lipid composition, *ex vivo* prostaglandin production, and stress tolerance in juvenile dover sole (*Solea solea* L.). *Lipids*, 35: 745-755.
- Löhr, G. W. y Waller, H. D. 1960. Glucose 6-phosphate dehydrogenase. En: *Methods of enzymatic análisis*, Vol. 2: 636-641, Ed. Bergemeyer, H. U. Academic Press. London.
- López-Torres, M., Pérez-Campo, R., Cadenas, S., Rojas, C. y Barja, G. 1993. A comparative study of free radicals in vertebrates-II. Non-enzymatic antioxidants and oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105B: 757-763.
- Love, R. M. 1970. Chemistry and anatomy. En: *The chemical biology of fishes*. Vol. 1, Cap. 1, pp: 1-35. Ed. Academic Press. London.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, J. L. y Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Luostarinen, R. L., Laasonen, K. y Calder, P. C. 2001.  $\alpha$ -tocopherol concentrations, lipid peroxidation and superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in rat heart and liver after feeding stabilized and unstabilized fish oil. *Nut. Res.*, 21: 1529-1544.
- Lushchak, V. I., Lushchak, L. P., Mota, A. A. y Hermes-Lima, M. 2001. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, 280: 100-107.
- Mæland, A., Waagbø, R. 1998. Examination of the qualitative ability of some cold water marine teleosts to synthesise ascorbic acid. *Comp. Biochem. Physiol.*, 121A: 249-255.
- Mansouri, A., Demeilliers, C., Amsellem, S., Pessayre, D. y Fromenty, B. 2001. Acute ethanol administration oxidatively damages and depletion mitochondrial DNA in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 298: 737-743.
- Marchand, F. y Boisclair, D. 1998. Influence of fish density on the energy allocation pattern of juvenile brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Can. J. Aquat. Sci.* 55: 796-805.
- Martínez, F. J., García-Riera, M. P., Canteras, M., De Costa, J. y Zamora, S. 1994. Blood parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Simultaneous influence of various factors. *Comp. Biochem. Physiol.*, 107A: 95-100.
- Martínez-Álvarez, R. M., Hidalgo, M. C., Domezain, A., Morales, A. E., García-Gallego, M. y Sanz, A. 2002. Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. *J. Exp. Biol.*, 205: 3699-3706.
- Mathiyalagan, A., Reddy, P. K. y Lam, T. J. 1996. Effects of cortisol on growth and development in tilapia larvae, *Oreochromis mossambicus*. *Fish Physiol. Biochem.*, 15: 453-458.

- Maule, A. G. y Schreck, C. B. 1990. Glucocorticoid receptors in leukocytes and gill of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 77: 448-455.
- Maule, A. G. y Schreck, C. B. 1991. Stress and cortisol treatment changed affinity and number of glucocorticoid receptors in leukocytes and gill of coho salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 84: 83-93.
- Maule, A. G., Tripp, R. A., Kaattari, S. L. y Schreck, C. B. 1989. Stress alters immune function and disease resistance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Endocrinol.*, 120: 135-142.
- Maydani, M., Natiello, F., Golding, B., Free, N., Woods, M., Schaefer, E., Blumberg, J. B. y Gorbach, S. L. 1991. Effect long-term fish oil supplementation on vitamin E status and lipid peroxidation in women. *J. Nutr.*, 121: 484-491.
- Maydani, S. N., Shapiro, A. C., Maydani, M., Macauley, J. B. y Blumberg, J. B. 1987. Effect of age and dietary fat (fish, corn and coconut oils) on tocopherol status of C57BL/6Nia mice, *Lipids*, 22: 345-350.
- Mazor, D., Brill, G., Shorer, Z., Moses, S. y Mayerstein, N. 1997. Oxidative damage in red cells of vitamin E deficient patients. *Clin. Chim. Acta*, 265: 131-137.
- Mazur, C. F. e Iwama, G. K. 1993. Effect of handling and stocking density on hematocrit, plasma cortisol, and survival in wild and hatchery-reared chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture*, 112: 291-299.
- Mazur, C. F., Tillapaugh, D., Brett, J. R. e Iwama, G. K. 1993a. The effect of feeding level and rearing density on growth, feed conversion and survival in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) reared in salt water. *Aquaculture*, 117: 129-140.
- Mazur, C. F., Tillapaugh, D. e Iwama, G. K. 1993b. The effects of feeding level and rearing density on the prevalence of *Renibacterium salmoninarum* in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) reared in salt water. *Aquaculture*, 117: 141-147.
- Mc. Cord, J.M. y Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte. *J. Bio. Chem.*, 244: 6049-6055.
- Mc. Donald, D. G. y Robinson, J. C. 1993. Physiological responses of Lake trout to stress: effects of water hardness and genotype. *Trans. Am. Fish Soc.*, 122: 1146-1155.
- Mc. Geer, J. C., Baranyi, L. e Iwama, G. K. 1991. Physiological responses to challenge tests in six stocks of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* Vol. 48: 1761-1771.
- Mc. Kenzie, D. J., Piraccini, G., Taylor, E. W., Steffensen, J. F., Bronzi, P. y Bolis, L. 1994. Effect of dietary lipids on responses to stress in fish. En: *High Performance Fish (Proc. Int. Fish Physiol. Symp., July 1994, University of British Columbia)*, pp: 431-436. Ed. MacKInlay, D. D. Fish Physiology Association. Vancouver.
- Medale, F., Parent, J. P. y Vellas, F. 1987. Responses to prolonged hypoxia by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) I. Free amino acids and proteins in plasma, liver and white muscle. *Fish Physiol. Biochem.*, 3: 183-189.
- Merchie, G., Lavens, P. y Sorgeloos, P. 1997. Optimization of dietary vitamin C in fish and crustacean larvae: a review. *Aquaculture*, 155: 165-181.
- Mesa, M. G., Poe, T. P., Maule, A. G. y Schreck, C. B. 1998. Vulnerability to predation and physiological stress responses in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) experimentally infected with *Renibacterium salmoninarum*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55: 1599-1606.

## VII.- Referencias bibliográficas

---

- Metón, I., Fernández, F. y Baanante, I. V. 2003. Short- and long-term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 225: 99-107.
- Milligan, C. L. 1997. The role of cortisol in amino acid mobilization and metabolism following exhaustive exercise in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*). *Fish Physiol. Biochem.*, 16: 119-128.
- Milligan, C.L. y Wood, C.M. 1986. Intracellular and extracellular acid-base status and H<sup>+</sup> exchange with the environment after exhaustive exercise in the rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, 123: 93-121.
- Moccia, R. D., Hung, S. S. O., Slinger, S. J. y Ferguson, H. W. 1984. Effect of oxidized fish oil, vitamin E and ethoxyquin on the histopathology and haematology of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, 7: 269-282.
- Montero, D., Izquierdo, M. S., Tort, L., Robaina, L. y Vergara, J. M. 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiol. Biochem.*, 20: 53-60.
- Montero, D., Kalinowski, T., Obach, A., Robaina, L., Tort, L., Caballero, M. J. e Izquierdo, M. S. 2003. Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health. *Aquaculture*, 225: 353-370.
- Montero, D., Robaina, L. E., Socorro, J., Vergara, J. M., Tort, L. y Izquierdo, M.S. 2001a. Alteration of liver and muscle fatty acid composition in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles held at high stocking density and fed an essential fatty acid deficient diet. *Fish Physiol. Biochem.*, 24: 63-72.
- Montero, D., Tort, L., Izquierdo, M. S., Robaina, L. y Vergara, J. M. 1998. Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead seabream caused by  $\alpha$ -tocopherol and n-3 HUFA dietary deficiencies. *Fish Physiol. Biochem.*, 18: 399-407.
- Montero, D., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J. M. e Izquierdo, M. S. 2001b. Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish Shellfish Immunol.*, 11: 473-490.
- Moon, T. W., Busby, E. R., Cooper, G. A. y Mommsen, T. P. 1999. Fish hepatocyte glycogen phosphorylase - a sensitive indicator for hormonal modulation. *Fish Physiol. Biochem.*, 21: 15-24.
- Morales, A. E, García-Rejón, L. y de la Higuera, M. 1990. Influence of handling and/or anaesthesia on stress response in rainbow trout. Effects on liver primary metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.*, 95A: 87-93.
- Moreau, R., Dabrowski, K., Czesny, S. y Cihla, F. 1999. Vitamin C-vitamin E interaction in juvenile lake sturgeon (*Acipenser fulvescens* R.), a fish able to synthesize ascorbic acid. *J. Appl. Ichthyol.*, 15: 250-257.
- Moreno, J. J. y Mitjavila, M. T. 2003. The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (Review). *J. Nut. Biochem.*, 14: 182-195.
- Morgan, J. D. e Iwama, G. K. 1996. Cortisol-induced changes in oxygen consumption and ionic regulation in coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*) parr. *Fish Physiol. Biochem.* 15: 385-394.
- Motais, R., Borgese, F., Fievet, B. y García-Romeu, F. 1992. Regulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and pH in erythrocytes of fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 102A: 597-602.
- Mourente, G., Tocher, D. R., Díaz-Salvago, E., Grau, A. y Pastor, E. 1999. Study of the n-3 highly unsaturated fatty acids requirement and antioxidant status of *Dentex dentex* larvae at the *Artemia* feeding stage. *Aquaculture*, 179: 291-307.

- Mourente, G., Díaz-Salvago, E., Tocher, D. R. y Bell, J. G. 2000. Effects of dietary polyunsaturated fatty acid/vitamin E (PUFA/tocopherol) ratio on antioxidant defence mechanisms of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., *Osteichthyes*, *Sparidae*). *Fish Physiol. Biochem.*, 23: 337-351.
- Mouri, K., Ikesu, H., Esaka, T. y Igarashi, O. 1984. The influence of marine oil intake upon levels of lipids,  $\alpha$ -tocopherol and lipid peroxidation in serum and liver of rats, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 30: 307-318.
- Munck, A., Guyre, P. M., Holbrook, N. J. 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine Rev.* 5: 25-44.
- Nagababu, E., Manoharan, P. T. y Rifkind, J. M. 1997. Superoxide formed by the reaction of ferrylhemoglobin with hydrogen peroxide causes heme degradation. *4<sup>th</sup> Annual Meeting of the Oxygen Society. Nov. 20-24, Abstract 1-2*: 35.
- Nagababu, E. y Rifking, J. M. 2000. Heme degradation during autoxidation of oxyhemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 273: 839-845.
- Nagae, M., Fuda, H., Ura, K., Kawamura, H., Adachi, S., Hara, A. y Yamauchi, K. 1994. The effect of cortisol administration on blood plasma immunoglobulin M (IgM) concentrations in masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Fish Physiol. Biochem.*, 13: 41-48.
- Nair, V., Cooper, C. S., Vietti, D. E. y Turner, G. A. 1986. The chemistry of lipid peroxidation metabolites: Crosslinking reactions of malondialdehyde. *Lipids*, 21: 6-10.
- Nakamura, T., Tanaka, R., Higo, Y., Taira, K. y Takeda, T. 1998. Lipid peroxide levels in tissues of live fish. *Fish. Sci.*, 64: 617-620.
- Nakano, T., Miura, Y., Wazawa, M., Sato, M. y Takeuchi, M. 1999. Red yeast *Phaffia rhodozyma* reduces susceptibility of liver homogenate to lipid peroxidation in rainbow trout. *Fish. Sci.*, 65: 961-962.
- Narnaware, Y., Baker, B. J. y Tomlinson, M. G. 1994. The effect of various stresses, corticosteroids and adrenergic agents phagocytosis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol. Biochem.*, 13: 31-40.
- Niki, E., Yamamoto, Y., Takahashi, M., Yamamoto, Y., Komuro, E., Miki, M., Yasuda, H. y Mino, M. 1988. Free radical-mediated damage of blood and its inhibition by antioxidants. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 34: 507-512.
- Nikinmaa, M. 1990. Vertebrate red blood cells. *Zoophysiology* Vol. 28. Springer-Verlag, Berling. Hidelgerg, New york.
- Nilsson, S. 1984. Adrenergic control systems in fish. *Mar. Biol. Lett.*, 5: 127-146.
- Oarada, M., Furukawa, H., Majima, T. y Miyazawa. 2000. Fish oil diet affects on oxidative senescence of red blood cells linked to degeneration of spleen cells in mice. *Biochim. Biophys. Acta*, 1487: 1-14.
- Obach, A. y Laurencin, F. B. 1992. Effects of dietary oxidized fish oil and deficiency of anti-oxidants on the immune response of turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture*, 107: 221-228.
- Olivereau, M. y Olivereau, J. 1988. Localization of CRF-like immunoreactivity in the brain and pituitary of teleost fish. *Peptides*, 9: 13-21.
- Olivereau, M. y Olivereau, J. 1990. Effect of pharmacological adrenalectomy on corticotropin-releasing factor (CRF)-like and arginine vasotocin (AVT) immunoreactivities in the brain and pituitary of eel: immunocytochemical study. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 80: 199-215.

## VII.- Referencias bibliográficas

---

- Olsen, Y. A., Einarsdottir, I. E. y Nilssen, K. J. 1995. Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon, *Salmo salar*, prevents plasma cortisol increase during stress. *Aquaculture*, 134: 155-168.
- Olsen, Y. A. y Henderson, R. J. 1997. Muscle fatty acid composition and oxidative stress indices of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.) in relation to dietary polyunsaturated fatty acid levels and temperature. *Aquacult. Nutr.*, 3: 227-238.
- Olsen, R. E., Løvaas, E. y Lie, Ø. 1999. The influence of temperature, dietary polyunsaturated fatty acids,  $\alpha$ -tocopherol and spermine on fatty acid composition and indices of oxidative stress in juvenile Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.). *Fish Physiol. Biochem.*, 20: 13-29.
- Ornstein, L. 1964. Disc electrophoresis: Background and theory. *Ann. New York Acad. Sci.*, 121: 404-427.
- Oruç, E. Ö. y Üner, N. 2000. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 127C: 291-296.
- Otto, M. E. y Moon, T. W. 1996. Endogenous antioxidant systems of two teleost fish, the rainbow trout and the black bullhead, and the effect of age. *Fish Physiol. Biochem.*, 15: 349-358.
- Ottolenghi, C., Puviani, A. C., Gavioli, M. E., Fabbri, E., Brighenti, L. y Plisetskaya, E. M. 1989. Glycogenolytic action of glucagon-family peptides and epinephrine on catfish hepatocytes. *Fish Physiol. Biochem.*, 6: 387-394.
- Øverly, O., Harris, C. A. y Winberg, S. 1999. Short-term effects of fights for social dominance and the establishment of dominant-subordinate relationships on brain monoamines and cortisol in rainbow trout. *Brain Behav. Evol.*, 54: 263-275.
- Øverly, O., Pottinger, T. G., Carrick, T. R., Øverly, E. y Winberg, S. 2001. Brain monoaminergic activity in rainbow trout selected for high and low stress responsiveness. *Brain Behav. Evolut.*, 57: 214-224.
- Øverly, O., Pottinger, T. G., Carrick, T. R., Øverly, E. y Winberg, S. 2002. Differences in behaviour between rainbow trout selected for high- and low-stress responsiveness. *J. Exp. Biol.*, 205: 391-395.
- Paglia, D. E. y Valentine, W. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, 70: 158-169.
- Pankhurst, N. W. y van der Kraak, G. 1997. Effects of stress on reproduction and growth of fish. En: *Fish Stress and Health in Aquaculture*, pp: 81-86. Eds. Iwama, G. K., Pickering, A. D., Sumpter, J. P. y Schreck, C. B. Society for experimental biology, seminar series 62. Cambridge University Press.
- Pankhurst, N. W., Wells, R. M. G. y Carragher, J. F. 1992. Effects of stress on plasma cortisol levels and blood viscosity in blue mao mao, *Scorpius violaceus* (Hutton), a marine teleost. *Comp. Biochem. Physiol.*, 101A: 335-339.
- Palace, V. P., Baron, C. L. y Klaverkamp. 1998. An assessment of Ah-inducible phase I and phase II enzymatic activities and oxidative stress indices in adult lake trout (*Salvelinus namaycush*) from Lake Ontario and Lake Superior. *Aquat. Toxicol.*, 42: 149-168.
- Palace, V. P. y Klaverkamp. 1993. Variation of hepatic enzymes in three species of freshwater fish from Precambrian shield lakes and the effect of cadmium exposure. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104C: 147-154.
- Papoutsoglou, S. E., Miliou, H., Chadio, S., Karakatsouli, N. y Zarkada, A. 1999. Studies on stress responses and recovery from removal in gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.) using recirculated seawater system. *Aquacult. Eng.*, 21: 19-32.

- Papoutsoglou, S. E., Papapaskeva-Papoutsoglou, E. y Alexis, M. N. 1987. Effect of density on growth rate and production of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) over a full rearing period. *Aquaculture*, 66: 9-17.
- Papoutsoglou, S. E., Papapaskeva-Papoutsoglou, E. G. y Dendrinou, P. K. 1979. Studies on the effect of density on body composition, growth rate and survival of rainbow trout fry, reared in semiclosed system. *Thalassographica*, 1: 43-56.
- Papoutsoglou, S. E., Tziha, G., Vrettos, X. y Athanasiou. 1998. Effects of stocking density on behavior and growth rate of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles reared in a closed circulated system. *Aquacult. Eng.*, 18: 135-144.
- Parihar, M. S. y 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., Navas, J. I., Toribio, F. y López-Barea, J. 1995. Indicadores bioquímicos de estrés en doradas (*Sparus aurata*). *Actas del V Congreso Nacional de Acuicultura*, pp: 754-759. Barcelona España.
- Paxton, R., Gist, D. H. y Umminger, B. L. 1984. Serum cortisol levels in thermally-acclimated goldfish (*Carassius auratus*) and killifish (*Fundulus heteroclitus*): implications in control of hepatic glycogen metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.*, 78B: 813-816.
- Pearce, J., Harris, J. E. y Davies, S. J. 2003. The effect of vitamin E on the serum complement activity of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquacult. Nutr.*, 9: 337-340.
- Pedrajas, J. R., Gavilanes, F., López-Barea, J. y Peinado, J. 1998. Incubation of superoxide dismutase with malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal forms new active isoforms and adducts. An evaluation of xenobiotics in fish. *Chem.Biol. Interact.* 115: 1-17.
- Pedrajas, J. R., López-Barea, J. y Peinado, J. 1996. Dieldrin induces peroxisomal enzymes in fish (*Sparus aurata*) liver. *Comp. Biochem. Physiol.*, 115C: 125-131.
- Pedrajas, J. R., Peinado, J. y López-Barea, J. 1993. Purification of CuZn-superoxide dismutase isoenzymes from fish liver: appearance of new isoforms as a consequence of pollution. *Free Rad. Res. Comms.*, 19: 29-41.
- Pedrajas, J. R., Peinado, J. y López-Barea, J. 1995. Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of CuZn-superoxide dismutase as potential biomarkers. *Chem. Biol. Interact.*, 98: 267-282.
- Perry, S. F. y Bernier, N. J. 1999. The acute humoral adrenergic stress response in fish: facts and fiction. *Aquaculture*, 177: 285-295.
- Perry, S. F., Fritsche, R., Kinkead, R. y Nilsson, S. 1991. Control of catecholamine release *in vivo* and *in situ* in the Atlantic cod (*Gadus morhua*) during hypoxia. *J. Exp. Biol.*, 155: 549-66.
- Perry, S. F. y Reid, S. D. 1993.  $\beta$ -adrenergic signal transduction in fish: interactive effects of catecholamines and cortisol. *Fish Physiol. Biochem.*, 11: 195-203.
- Peter, R. E. 1979. The brain and feeding behaviour. En: *Fish Physiology, vol. VIII: Bioenergetics and growth*. Cap. 3, pp: 121-153. Eds. Hoar, W. S., Randall, D. J. y Brett, J. R. Academic Press. London & New York.
- Peterson, M. S. y Brown-Peterson, N. 1992. Growth under stressed conditions in juvenile channel catfish *Ictalurus Punctatus* (rafinesque) as measured by nucleic acids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 103A: 323-327.

## VII.- Referencias bibliográficas

---

- Petit, J. F., Nicaise, M., Lepoivre, M., Guissani, A., Lemaire, G. 1996. Protection by glutathione against the antiproliferative effects of nitric oxide. Dependence on kinetics of NO release. *Biochem. Pharmacol.*, 52: 205-212.
- Pickering, A. D. 1992. Rainbow trout husbandry: management of the stress response. *Aquaculture*, 100: 125-139.
- Pickering, A. D. 1993a. Growth and stress in fish production. *Aquaculture*, 111: 51-63.
- Pickering, A. D. 1993b. Endocrine-induced pathology in stressed salmonid fish. *Fish. Res.*, 17: 35-50.
- Pickering, A. D. y Pottinger, 1987. Crowding causes prolonged leucopenia in fish despite interrenal acclimation. *J. Fish Biol.*, 30: 701-712.
- Pickering, A. D. y Pottinger, T. G. 1989. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol. Biochem.*, 7: 253-258.
- Pickering, A. D., Pottinger, T. G., Sumpter, J. P., Carragher, J. F. y Le-Bail, P. Y. 1991. Effects of acute and chronic stress on the levels of circulating growth hormone in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 83: 86-93.
- Pickering, A. D. y Stewart, A. 1984. Acclimation of the interrenal tissue of the brown trout, *Salmo trutta* L., to chronic crowding stress. *J. Fish. Biol.*, 24: 731-740.
- Plisetskaya, E. M., Moon, T. W., Larsen, D. A., Foster, G. D y Dickhoff, W. W. 1994. Liver glycogen, enzyme activities, and pancreatic hormones in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) during their first summer in seawater. *Can. J. Aquat. Sci.*, 51: 567-576.
- Ploch, S. A., Lee, Y. P., MacLean, E. y di Giulio, R. T. 1999. Oxidative stress in liver of brown bullhead and channel catfish following exposure to *tert*-butyl hydroperoxide. *Aquat. Toxicol.*, 46: 231-240.
- Plotsky, P. M., Cunningham, E. T. y Widmaier, E. P. 1989. Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. *Endocr. Rev.*, 10: 437-458.
- Poston, H. A., Combs, G. F. Jr. y Leibovitz, L. 1976. Vitamin E and selenium interrelations in the diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*): gross, histological and biochemical deficiency signs. *J. Nut.*, 106: 892-904.
- Pottinger, T. G. 1990. The effect of stress and exogenous cortisol on receptor-like binding of cortisol in the liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 78: 194-203.
- Pottinger, T. G., Balm, P. H. M. y Pickering, A.D. 1995. Sexual maturity modifies the responsiveness of the pituitary-interrenal axis to stress in male rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 98: 311-320.
- Pottinger, T. G. y Carrick, T. R. 1999a. A comparison of plasma glucose and plasma cortisol as selection markers for high and low stress-responsiveness in female rainbow trout. *Aquaculture*, 175: 351-363.
- Pottinger, T. G. y Carrick, T. R. 1999b. Modification of the plasma cortisol response to stress in rainbow trout by selective breeding. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 116: 122-132.
- Pottinger, T. G. y Carrick, T. R. 2001a. Stress responsiveness affects dominant-subordinate relationships in rainbow trout. *Horm. Behav.*, 40: 419-427.
- Pottinger, T. G. y Carrick, T. R. 2001b. ACTH does not mediate divergent stress responsiveness in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.*, 129A: 399-404.



- Pottinger, T. G., Carrick, T. R., Appleby, A. y Yeomans, W. E. 2000. High blood cortisol levels and low cortisol receptor affinity: is the chub, *Leuciscus cephalus*, a cortisol-resistant teleost?. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 120: 108-117.
- Pottinger, T. G., Knudsen, F. R. y Wilson, J. 1994a. Stress-induced changes in the affinity and abundance of cytosolic cortisol-binding sites in the liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), are not accompanied by changes in measurable nuclear binding. *Fish Physiol. Biochem.*, 12: 499-511
- Pottinger, T. G. y Moran, T. A. 1993. Differences in plasma cortisol and cortisone dynamics during stress in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Fish Biol.*, 43: 121-30.
- Pottinger, T. G., Moran, T. A. y Morgan, J. A. W. 1994b. Primary and secondary indices of stress in the progeny of rainbow trout selected for high and low responsiveness to stress. *J. Fish Biol.*, 44: 149-163.
- Pottinger, T. G. y Pickering, A. D. 1992. The influence of social interaction on the acclimation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) to chronic stress. *J. Fish Biol.*, 41: 435-447.
- Pottinger, A. D. y Pickering T. G. 1997. Genetic basis to the stress response: selective breeding for stress-tolerant fish. En: *Fish Stress and Health in Aquaculture*, pp:171-193. Eds. Iwama G. K., Pickering, A. D., Sumpter, J. P. y Schreck, C. B. Society for experimental biology, seminar series 62. Cambridge University Press. Cambridge.
- Pottinger, A. D., Pickering T. G. y Hurley, M. A. 1992. Consistency in the stress response of individuals of two strains of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 103: 275-289.
- Price, E. O. 1984. Behavioural aspects of animal domestication. *Q. Rev. Biol.*, 59: 1-32.
- Procarione, L. S., Barry, T. P. y Malison, J. A. 1999. Effects of high rearing densities and loading rates on the growth and stress responses of juvenile rainbow trout. *N. Am. J. Aquacult.*, 61: 91-96.
- Puangkaew, J., Kiron, V., Somamoto, T., Okamoto, N., Satoh, S., Takeuchi, T. y Watanabe, T. 2004. Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. *Fish Shellfish Immunol.*, 16: 25-39
- Rainuzzo, J. R., Reitan, K. I. y Olsen, Y. 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: A review. *Aquaculture*, 153: 103-115.
- Ramasarma, T. 1982. Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in biomembranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 694: 69-93.
- Rand-Weaver, M., Pottinger, T. G. y Sumpter, J. P. 1993. Plasma somatolactin concentrations in salmonid fish are elevated by stress. *J. Endocrinol.*, 138: 509-515.
- Rawn, J. D. 1989. *Bioquímica*. Vol 1, Cap. 15. Interamericana. McGraw-Hill, Interamericana de España.
- Refstie, T. 1990. Application of breeding schemes. *Aquaculture*, 85:163-169.
- Regost, C., Arzel, J., Robin, J., Rosenlund G. y Kaushik, S. J. 2003. Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*): 1. Growth performance, flesh fatty acid profile, and lipid metabolism. *Aquaculture*, 217: 465-482.
- Reid, S. G., Bernier, N.J. y Perry, S. F. 1998. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120C: 1-27.
- Reid, S. G., Furimsky, M. y Perry, S. F. 1994. The effects of repeated physical stress or fasting on catecholamines storage and release in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Fish Biol.*, 45: 365-78.

## VII.- Referencias bibliográficas

---

- Reid, S. G. y Perry, S. F. 1991. The effects and physiological consequences of raised levels of cortisol on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocyte  $\beta$ -adrenoreceptors. *J. Exp. Biol.*, 158: 217-240.
- Renaud, J. M. y Moon, T. W. 1980. Characterization of gluconeogenesis in hepatocytes isolated from the American eel, *Anguilla rostrata* Lesueur. *J. Comp. Physiol.*, 135: 115-125.
- Reubush, K. J. y Heath, A. G. 1996. Metabolic responses to acute handling by fingerling inland and anadromous striped bass. *J. Fish Biol.*, 49: 830-841.
- Reubush, K. J. y Heath, A. G. 1997a. Effects of recovery water salinity on secondary responses of hybrid striped bass fingerlings. *Prog. fish-cult.*, 59: 188-197.
- Reubush, K. J. y Heath, A. G. 1997b. Secondary stress responses to acute handling in striped bass (*Morone saxatilis*) and hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). *AJVR*, Vol. 58, n° 12:1451-56.
- Roberts, R. J. y Bullock, A. M. 1989. Nutritional Pathology. En: *Fish Nutrition*, 2ª ed., pp: 424-469. Ed. Halver, J. E. Academic Press. London.
- Rodríguez, C., Pérez, J. A., Badía, P., Izquierdo, M. S., Fernández-Palacios, H. y Lorenzo Hernández. 1998. The n-3 highly unsaturated fatty acids requirements of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae when using an appropriate DHA/EPA ratio in the diet. *Aquaculture*, 169: 9-23.
- Roehrig, K. L. y Allred, J. B. 1974. Direct enzymatic procedure for the determination of liver glycogen. *Anal. Biochem.*, 58: 414-421.
- Roem, A. J., Kohler, C. C. y Stickney, R. R. 1990. Vitamin E requirements of the blue tilapia, *Oreochromis aureus* (Steindachner), in relation to dietary lipid level. *Aquaculture*, 87: 155-164.
- Roméo, M., Bennani, N., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M. y Girard, J. P. 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquat. Toxicol.*, 48: 185-194.
- Ross, S. W., Dalton, D. A., Kramer, S. y Christensen, B. L. 2001. Physiological (antioxidant) responses of estuarine fishes to variability in dissolved oxygen. *Comp. Biochem. Physiol.*, 130C: 289-303.
- Ross, R. M. y Watten, B. J. 1998. Importance of rearing-unit desing and stocking density to the behavior, growth and metabolism of lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Aquacult. Eng.*, 19: 41-56.
- Rotllant, J., Balm, P. H., Pérez-Sánchez, J., Wendelaar-Bonga, S. E. y Tort, L. 2001. Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 121: 333-342.
- Rotllant, J., Balm, P. H. M., Ruane, N. M., Pérez-Sánchez, Wendelaar-Bonga, S. E. y Tort, L. 2000. Pituitary proopiomelanocortin-derived peptides and hypothalamus-pituitary-interrenal axis activity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during prolonged crowding stress: differential regulation of adrenocorticotropin hormone and  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone release by corticotropin-releasing hormone and thyrotroping-releasing hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 119: 152-163.
- Rotllant, J., Pavlidis, M., Kentouri, M., Abad, M. E. y Tort, L. 1997. Non-specific immune responses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress. *Aquaculture*, 156: 279-290.
- Ruane, N. M., Nolan, D. T., Rotllant, J., Tort, L., Balm, P. H. M. y Wendelaar-Bonga, S. E. 1999. Modulation of the response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) to confinement, by an ectoparasitic (*Argulus foliaceus* L.) infestation and cortisol feeding. *Fish Physiol. Biochem.*, 20: 43-51.

- Ruane, N. M., Huisman, E. A. y Komen, J. 2002. The influence of feeding history on the acute stress response of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 210: 245-257.
- Ruane, N. M. y Komen, H. 2003. Measuring cortisol in the water as an indicator of stress caused by increased loading density in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 218: 685-693.
- Rudneva, I. I. 1997. Blood antioxidant system of Black Sea elasmobranch and teleost. *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.
- Ruiz-Gutiérrez, V., Pérez-Espinosa, A., Vázquez, C. M. y Santa-María, C. 1999. Effects of dietary fats (fish, olive and high-oleic-acid sunflower oils) on lipid composition and antioxidant enzymes in rat liver. *Br. J. Nutr.*, 82: 233-241.
- Russanov, E., Zaporowska, H., Ivancheva, E., Kirkova, M. y Konstantinova, S. 1994. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in vanadate-treated rats. *Comp. Biochem. Physiol.*, 107C: 415-421.
- Ruyter, B., Rosjo, O., Einen, y Thomassen, M. S. 2000a. Essential fatty acids in Atlantic salmon: time course of changes in fatty acid composition of liver, blood and carcass induced by a diet deficient in n-3 and n-6 fatty acids. *Aquacult. Nutr.*, 6: 109-117.
- Ruyter, B., Rosjo, O., Einen, y Thomassen, M. S. 2000b. Essential fatty acids in Atlantic salmon: effects of increasing dietary doses of n-6 and n-3 fatty acids on growth, survival and fatty acid composition of liver, blood and carcass. *Aquacult. Nutr.*, 6: 119-127.
- Sadler, J., Wells, R. M. G., Pankhurst, P. M. and Pankhurst, N. W. 2000. Blood oxygen transport, rheology and haematological responses to confinement stress in diploid and triploid Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 184: 349-361.
- Saeij, J. P. J., Verburg-van Kemenade, L. B. M., van Muiswinkel, W. B. y Wiegertjes, G. F. 2003. Daily handling stress reduces resistance of carp to *Trypanoplasma borreli*: *in vitro* modulatory effects of cortisol on leukocyte function and apoptosis. *Dev. Comp. Immunol.*, 27: 233-245.
- Sahyoun, N. R. 1997. Vitamin C: What do we know and how much do we need?. *Nutr. Epidemiol.*, 13: 835-836.
- Sakakura, Y., Koshio, S., Iida, Y., Tsukamoto, K., Kida, T. y Blom, J. H. 1998. Dietary vitamin C improves the quality of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) seedlings. *Aquaculture*, 161: 427-436.
- Salonius, K. e Iwama, G. K. 1993. Effects of early rearing environment on stress response, immune function, and disease resistance in juvenile coho (*Oncorhynchus kisutch*) and chinook salmon (*O. Tshawytscha*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50: 759-766.
- Saltman, P. 1989. Oxidative stress: A radical view. *Seminars in Hematology*, 26: 249-256.
- Sampath-Kumar, R., Lee, S. T. L, Tan, C.H., Munro, A. D. y Lam, T. J. 1997. Biosynthesis *in vivo* and excretion of cortisol by fish larvae. *J. Exp. Zool.*, 277: 337-344.
- Sánchez-Muros, M.J. 1990. Capacidad de adaptación del metabolismo intermediario de la trucha a variaciones en la composición de la dieta. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Sandnes, K., Hansen, T., Killie, J. E. A. y Waagbø, R. 1990. Ascorbate-2-sulphate as a dietary vitamin C source for Atlantic salmon (*Salmo salar*): 1. Growth, bioactivity, haematology and humoral immune response. *Fish Physiol. Biochem.*, 8: 419-427.

## VII.- Referencias bibliográficas

---

- Sant'Ana, L. S. y Mancini-Filho, J. 2000. Influence of the addition of antioxidants *in vivo* on the fatty acid composition of fish fillets. *Food Chem.* 68: 175-178.
- Sargent, J., Henderson, R. J. y Tocher, D. R. 1989. The Lipids. En: *Fish Nutrition*, 2ª ed., pp: 154-209. Ed. Halver, J. E. Academic Press. London.
- Sato, M., Yoshinaka, R. e Ikeda, S. 1978. Dietary ascorbic acid requirement of rainbow trout for growth and collagen formation. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 44: 1029-1035.
- Satoh, S., Takeuchi, T. y Watanabe, T. 1987. Requirement of *Tilapia* for  $\alpha$ -tocopherol. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53: 119-124.
- Scaife, J. R., Onibi, G. E., Murray, I., Fletcher, T. C. y Houlihan, D. F. 2000. Influence of  $\alpha$ -tocopherol acetate on the short-and long-term storage properties of fillets from Atlantic salmon *Salmo salar* fed a high lipid diet. *Aquacult. Nutr.*, 6: 65-71.
- Schoonbee, H. J., Barham, W. T. y Visser, J. G. J. 1989. An evaluation of the effects of handling, exercise, and transport stress on selected blood parameters of *Oreochromis mossambicus* (Peters). De Pauw, N., Jaspers, E., Ackefors, H., Wilkins, N. (Eds). *Eur. Aquacult. Soc.*, Bredene, Belgium.
- Schlenk, D., Wolford, L., Chelius, M., Steevens, J. y Chan, K. M. 1997. Effect of arsenite, arsenate, and the herbicide monosodium methyl arsonate (MSMA) on hepatic metallothionein expression and lipid peroxidation in channel catfish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 118C: 177-183.
- Schreck, C. B., Contreras-Sanchez, W. y Fitzpatrick, M. S. 2001. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture*, 197: 3-24.
- Schreck, C. B., Jonsson, L., Feist, G. y Reno, P. 1995. Conditioning improves performance of juvenile Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, to transportation stress. *Aquaculture*, 135: 99-110.
- Schreck, C. B., Patino, R., Pring, C. K., Winton, J. R. y Holway, J. E. 1985. Effects of rearing density on indices of smoltification and performance of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Aquaculture*, 45: 345-358.
- Schreck, C. B. y Lorz, H. W. 1978. Stress response of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) elicited by cadmium and copper and potential use of cortisol as an indicator of stress. *J. Fish Res. Bd. Can.* 35: 1124-1129.
- Scott, E. M. y Harrington, J. P. 1990. Comparative studies of catalase and superoxide dismutase activity within salmon fish erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 95B: 91-93.
- Scott, M., Lubin, B., Zuo, L. y Kuypers, F. 1991. Erythrocyte defence against hydrogen peroxide: Preminent importance of catalase. *J. Lab. Clin. Med.*, 118: 7.
- Sehgal, H. S. y Toor, H. S. 1995. Effect of stocking density on ovarian maturation, offspring fitness and growth of common carp. *Aquaculture*, 129: 113-117.
- Selye, H. 1973. The evolution of the stress concept. *Am. Sci.*, 61: 692-699.
- Sheridan, M. A. 1986. Effects of thyroxin, cortisol, growth hormone, and prolactin on lipid metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, during smoltification. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 64: 220-238.
- Shiau, S. Y. y Hsu, C. Y. 2002. Vitamin E sparing effect by dietary vitamin C in juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Aquaculture*, 210: 335-342.
- Shiibashi, T. e Iida, T. 2001. NADPH and NADH serve as electron donor for the superoxide-generating enzyme in tilapia (*Oreochromis niloticus*) neutrophils. *Dev. Comp. Immunol.*, 25: 461-465.

- Shikata, T. 1998. Carbohydrate and aminoacid metabolism in the liver of masu salmon *Oncorhynchus masou* in the early period of seawater migration. *Fish. Sci.*, 64: 487-491.
- Shimeno, S. 1991. Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. En: *Handbook of Nutrient Requirements of Finfish*, pp: 181-191. Ed. Wilson, R. P. CRC Press. Boca Raton.
- Sies, H. 1985. Oxidative stress: introductory remarks. *Oxidative stress*, pp:1-8. Academic Press, London,
- Skjervold, P. O., Fjæra, S. O. y Østby, P. B. 1999. Rigor in Atlantic salmon as affected by crowding stress prior to chilling before slaughter. *Aquaculture*, 175: 93-101.
- Skjervold, P. O., Fjæra, S. O., Østby, P. B. y Einen, O. 2001. Live-chilling and crowding stress before slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 192: 265-280.
- Sloman, K. A., Gilmour, K. M., Taylor, A. C. y Metcalfe, N. B. 2000. Physiological effects of dominance hierarchies within groups of brown trout, *Salmo trutta*, held under simulated natural conditions. *Fish Physiol. Biochem.*, 22: 11-20.
- Sloman, K. A., Metcalfe, N. B., Taylor, A. C. y Gilmour, K. M. 2001. Plasma cortisol concentrations before and after social stress in rainbow trout and brown trout. *Physiol. Biochem. Zool.*, 74: 383-389.
- Soengas, J. L., Rey, P., Rozas, G., Andrés, M. D. y Aldegunde, M. 1992. Effects of cortisol and thyroid hormone treatment on the glycogen metabolism of selected tissues of domesticated rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 101: 317-328.
- Soengas, J. L., Barciela, P., Fuentes, J., Otero, J., Andrés, M. D. y Aldegunde, M. 1993a. The effect of seawater transfer in liver carbohydrate metabolism of domesticated rainbow trout; (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 105B:337-343.
- Soengas, J. L., Barciela, P., Fuentes, J., Otero, J., Andrés, M. D. y Aldegunde, M. 1993b. Changes in muscle carbohydrate metabolism in domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after transfer to seawater. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104B: 173-179.
- Soengas, J. L., Aldegunde, M. y Andrés, M. D. 1995. Gradual transfer to seawater of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on liver carbohydrate metabolism. *J. Fish Biol.*, 47: 466-478.
- Soliman, A. K., Jauncey, K. y Roberts, R. J. 1994. Water-soluble vitamin requirements of tilapia: ascorbic acid (vitamin C) requirement of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquacult. Fish Manage.*, 25: 269-278.
- Speckner, W., Schindler, J. F. y Albers, C. 1989. Age-dependent changes in volume and haemoglobin content of erythrocytes in the carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Exp. Biol.*, 141: 133-149.
- Spotte, S. y Anderson, G. 1989. Plasma cortisol changes in seawater-adapted mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) exposed to ammonia. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 2065-2069.
- Srivastava, A. S., Oohara, I., Suzuki, T. y Singh, S. N. 1998. Activity and expression of glutamate oxaloacetate transaminase during the reproductive cycle of a fresh water fish *Labeo rohita*. *Fish. Sci.*, 64: 621-626.
- Srivastava, S. y Sahai, I. 1987. Effects of loading density on carbohydrate metabolism and hematology in the indian freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Aquaculture*, 66: 275-286.
- Stahl, W. y Sies, H. 1997. Antioxidant defence: vitamin E and C and carotenoids. *Diabetes*, S1: 4-8.

## VII.- Referencias bibliográficas

---

- Staurnes, M., Sigholt, T., Pedersen, H. P. y Rustad, T. 1994. Physiological effects of simulated high-density transport of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 119: 381-391.
- Stéphan, G., Guillaume, J. y Lamour, F. 1995. Lipid peroxidation in turbot (*Scophthalmus maximus*) tissue: effect of dietary vitamin E and dietary n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids. 1995. *Aquaculture*, 30: 251-268.
- Sugita, T., Shimeno, S., Nakano, N., Hosokawa, H. y Masumoto, T. 2000. Response of enzyme activities and metabolic intermediate resting in muscle and hepatopancreas of carp. *Fish. Sci.*, 66: 594-598.
- Sumpter, J. P. 1997. The endocrinology of stress. En: *Fish Stress and Health in Aquaculture*, pp:102-108. Eds. Iwama G. K., Pickering A. D., Sumpter J. P. y Schreck C. B. Society for experimental biology, seminar series 62. Cambridge University Press. Cambridge.
- Sumpter, J. P., Dye, H.M y Benfey, T. J. 1986. The effects of stress on plasma ACTH,  $\alpha$ -MSH and endorphin in brown trout *Salmo trutta* L. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 59: 257-65.
- Swift, D. J. 1983. Blood component value changes in the atlantic mackerel (*Scomber scombrus* L.) subjected to capture, handling and confinement. *Comp. Biochem. Physiol.*, 76A: 795-802.
- Tago, A., Yamamoto, Y., Teshima, S. y Kanazawa, A. 1999. Effects of 1,2-di-20:5-phosphatidylcholine (PC) and 1,2-di-22:6-PC on growth and stress tolerance of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae. *Aquaculture*, 179: 231-239.
- Takahashi, A., Ogasawara, T., Kawauchi, H. y Hirano, T. 1991. Effects of stress and fasting on plasma growth hormone levels in the immature rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57: 231-235.
- Takama, K., Suzuki, T., Yoshida, K., Arai, H. y Mitsui, T. 1999. Phosphatidylcholine levels and their fatty acid compositions in teleost tissues and squid muscle. *Comp. Biochem. Physiol.*, 124B: 109-116.
- Tanaka, R., Higo, Y., Murata, H. y Nakamura, T. 1999. Accumulation of hydroxy lipids in live fish with oxidative stress. *Fish. Sci.*, 65: 796-797.
- Tang, X. F., Zhou, D. Y. y Kang, G. F. 2002. Effect of inducible nitric oxide on intracellular homeostasis of hepatocytes. *Di Yi Jun Da Xue Xue Bao*, 22: 117-120.
- Tappel, A. L. 1968. Will antioxidant nutrients slow aging processes?. *Geriatrics*, 23: 97-105.
- Tengerdy, R. P. 1989. Vitamin E, immune response, and disease resistance. *Ann. New York Acad. Sci.*, 570: 335-344.
- Thomas, P. y Robertson, L. 1991. Plasma cortisol and glucosa stress responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS-222, quinaldine sulfate and metomidate. *Aquaculture*, 96: 69-86.
- Thompson, I., White, A., Fletcher, T. C., Houlihan, D.F. y Secombes C.J. 1993. The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets containing different amounts of vitamin C. *Aquaculture*, 114: 1-18.
- Thorarinnsson, R., Landolt, M. L., Elliott, D. G., Pascho, R. J. y Hardy, R. W. 1994. Effect of dietary vitamin E and selenium on growth, survival and the prevalence of *Renibacterium salmoninarum* infection in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture*, 121: 343-358.
- Tian, W. N., Braunstein, L. D., Apse, K., Pang, J., Rose, M., Tian, X. y Stanton, R. C. 1999. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *Am. J. Physiol.*, 276: C1121-C1131.

- Tidwell, J. H. y Webster, C. D. 1993. Effects of stocking density and dietary protein on green sunfish (*Lepomis cyanellus*) x bluegill (*L. macrochirus*) hybrids overwintered in ponds. *Aquaculture*, 113: 83-89.
- Tocher, D. R., Carr, J. y Sargent, J. R. 1989. Polyunsaturated fatty acid metabolism in fish cells: differential metabolism of (n-3) and (n-6) series acids by cultured cells originating from a freshwater teleost fish and from a marine teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94B: 367-374.
- Tocher, D. R. y Dick, J. R. 1990. Incorporation and metabolism of (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acids in phospholipid classes in cultured Atlantic salmon (*Salmo salar*) cells. *Comp. Biochem. Physiol.*, 96B: 73-79.
- Tocher, D. R., Mourente, G., van der Eecken, A., Evjemo, J. O., Díaz, E., Bell, J. G., Geurden, I., Lavens, P. y Olsen, Y. 2002. Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.), halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquacult. Nutr.*, 8: 195-207.
- Torres, P., Tort, L., Planas, J. y Flos, R. 1986. Effects of confinement stress and additional zinc treatment on some blood parameters in the dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83A: 89-92.
- Tort, T., Kargacin, B., Torres, P., Giralt, M. y Hidalgo, J. 1996. The effect of cadmium exposure and stress on plasma cortisol, metallothionein level and oxidative status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Comp. Biochem. Physiol.*, 114C: 29-34.
- Tran, T. N., Fryer, J. N., Lederis, K. and Vaudry, H. 1990. CRF, Urotensin I, and sauvagine stimulate the release of POMC-derived peptides from goldfish neurointermediate lobe cells. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 78: 351-360.
- Trenzado, C. E., Carrick, T. R y Pottinger, T. G. 2003. Divergence of endocrine and metabolic responses to stress in two rainbow trout lines selected for differing cortisol responsiveness to stress. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 133: 332-340.
- Tsuzuki, M. Y., Ogawa, K., Strüssmann, C. A., Maita, M. y Takashima, F. 2001. Physiological responses during stress and subsequent recovery at different salinities in adult pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture*, 200: 349-362.
- Turunen, T., Käkälä, A. y Hyvärinen, H. 1994. Trawling stress and mortality in undersized (< 40 cm) brown trout (*Salmo trutta* L.). *Fish. Res.*, 19: 51-64.
- Udilova, N., Jurek, D., Marian, B., Gille, L., Schulte-Hermann, R. y Nohl, H. 2003. Induction of lipid peroxidation in biomembranes by dietary oil components. *Food Chem. Toxicol.*, 41: 1481-1489.
- Upston, J. M., Terentis, A. C. y Stocker, R. 1999. Tocopherol-mediated peroxidation of lipoproteins: implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement. *FASEB J.*, 13: 977-994.
- van der Boon, J., van den Thillart, G. E. J. M. y Addink, A.D.F. 1991. The effects of cortisol on intermediary metabolism in teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100A: 47-53.
- Vanizor, B., Örem, A., Karahan, S. C., Kiran, E., Erem, C., Aliyazicioğlu, R. y Uydu, H. A. 2001. Decreased nitric oxide end-products and its relationship with high density lipoprotein and oxidative stress in people with type 2 diabetes without complications. *Diabetes Res. Clin. Pr.*, 54: 33-39.
- van Weerd, J. H. y Komen, J. 1998. The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120A: 107-112.

## VII.- Referencias bibliográficas

---

- Varghese, S. y Oommen, O. V. 2000. Long-term feeding of dietary oils alters lipid metabolism, lipid peroxidation, and antioxidant enzyme activities in a teleost (*Anabas testudineus* Bloch). *Lipids*, 35: 757-762.
- Vazzana, M., Cammarata, M., Cooper, E. L. y Parrinello. 2002. Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. *Aquaculture*, 210: 231-243.
- Venkatraman, J. T., Angkeow, P., Satsangi, N. y Fernandes, G. 1998. Effects of dietary n-6 and n-3 lipids on antioxidant defense system in livers of exercised rats. *J. Am. Coll. Nutr.*, 17: 586-594.
- Vermette, M. G. y Perry, S. F. 1988. Effects of prolonged epinephrine infusion on blood respiratory and acid-base states in the rainbow trout:  $\alpha$  and  $\beta$  effects. *Fish Physiol. Biochem.*, 4: 189-202.
- Vijayan, M. M., Ballantine, J. S. y Leatherland, J. F. 1990. High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture*, 88: 371-381.
- Vijayan, M. M., Ballantine, J. S. y Leatherland, J. F. 1991. Cortisol-induced changes in some aspects of intermediary metabolism of *Salvelinus fontinalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 82: 476-486.
- Vijayan, M. M., Foster, G. D. y Moon, T. W. 1993a. Effects of cortisol on hepatic carbohydrate metabolism and responsiveness to hormones in the sea raven, *Hemirhamphus intermedius*. *Fish Physiol. Biochem.*, 12: 327-335.
- Vijayan, M. M. y Leatherland, J. F. 1989. Cortisol-induced changes in plasma glucose, protein, and thyroid hormone levels, and liver glycogen content of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum). *Can. J. Zool.*, 67: 2746-2750.
- Vijayan, M. M. y Leatherland, J. F. 1990. High stocking density affects cortisol secretion and tissue distribution in brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *J. Endocrinol.*, 124: 311-318.
- Vijayan, M. M., Maule, A. G., Schreck, C. B. y Moon, T. W. 1993b. Hormonal control of hepatic glycogen metabolism in food-deprived, continuously swimming coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 1676-1682.
- Vijayan, M. M., Mommsen, T. P., Glémet, H. C. y Moon, T. W. 1996. Metabolic effects of cortisol treatment in a marine teleost, the sea raven. *J. Exp. Biol.*, 199: 1509-1514.
- Vijayan, M. M. y Moon, T. W. 1992. Acute handling stress alters hepatic glycogen metabolism in food-deprived rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49: 2260-2266.
- Vijayan, M. M., Pereira, C. y Moon, T. W. 1994. Hormonal stimulation of hepatocyte metabolism in rainbow trout following an acute handling stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 108C: 321-329.
- Vijayan, M. M., Pereira, C., Grau, E. G. e Iwama, G. K. 1997. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. *Comp. Biochem. Physiol.*, 116C: 89-95.
- Villarini, M., Moretti, M., Damiani, E., Greci, L., Santroni, A. M., Fedeli, D. y Falcioni, G. 1998. Detection of DNA damage in stressed trout nucleated erythrocytes using the comet assay: protection by nitroxide radicals. *Free Rad. Biol. Med.*, 24: 1310-1315.
- Virtanen, E. y Forsman, L. 1987. Physiological responses to continuous swimming in the wild salmon (*Salmo salar* L.) parr and smolt. *Fish Physiol. Biochem.*, 4: 157-163.
- Voces, J., Alvarez, A. I., Vila, L., Ferrando, A., Cabral de Oliveira, C. y Prieto, J. G. 1999. Effects of administration of the standardized Panax ginseng extract G115 on hepatic antioxidant function after exhaustive exercise. *Comp. Biochem. Physiol.*, 123C: 175-184.



- Wagner, G. F. y McKeown, B. A. 1986. Development of a salmon growth hormone radioimmunoassay. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 62: 452-458.
- Walker, M. W., Kinter, M. T., Roberts, R. J., Spitz, D. R. 1995. Nitric oxide-induced cytotoxicity: Involvement of cellular resistance to oxidative stress and the role of glutathione in protection. *Pediat. Res.*, 37: 44-47.
- Waring, C. P., Stagg, R. M. y Poxton, M. G. 1996. Physiological responses to handling in the turbot. *J. Fish Biol.*, 48: 161-173.
- Watanabe, T. 1987. Requerimientos de ácidos grasos y nutrición lipídica en peces. En: *Nutrición en Acuicultura II*, pp: 99-149. Eds. Espinosa de los Monteros, J. y Labarta, U. Madrid.
- Watanabe, T., Takeuchi, T., Matsui, M., Ogino, C. y Kawabata, T. 1977. Effect of  $\alpha$ -tocopherol deficiency on carp. VII. The relationship between dietary levels of linoleate and  $\alpha$ -tocopherol requirement. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 43: 935-946.
- Watanabe, T., Takeuchi, T., Wada, M. y Uehara, R. 1981. The relationship between dietary lipid levels and  $\alpha$ -tocopherol requirement of rainbow trout. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 47: 1463-1471.
- Watanabe, W. O., Clark, J. H., Dunham, J. B., Wicklund, R. I. y Olla, B. L. 1990. Culture of Florida red tilapia in marine cages: the effect of stocking density and dietary protein on growth. *Aquaculture*, 90: 123-134.
- Watson, R. R. y Petro, T. M. 1982. Cellular immune responses, corticosteroid levels, and resistance to *Listeria monocytogenes* and murine leukemia in mice fed a high vitamin E diet. *Ann. New York Acad. Sci.*, 393: 205-208.
- Webster, C. D. y Lowell, T. 1990. Response of striped bass larvae fed brine shrimp from different sources containing different fatty acid compositions. *Aquaculture*, 90: 49-61.
- Wendelaar-Bonga, S. E. 1997. The stress-response in fish. *Physiol. Rev.*, 77: 591-625.
- Wedemeyer, G. A. 1996. *Physiology of fish in intensive culture systems*. Northwest Biological Science Center. National Biological Service. U.S. Department of the Interior. Chapman & Hall. International Thompson Publishing.
- Wedemeyer, G. A. 1997. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. En: *Fish Stress and Health y Aquaculture*, pp:35-70. Eds. Iwama, G. K., Pickering, A. D., Sumpter, J. P. y Schreck, C. B. Society for experimental biology, seminar series 62. Cambridge University Press. Cambridge.
- Weil, L. S., Barry, T. P. y Malison, J. A. 2001. Fast growth in rainbow trout is correlated with a rapid decrease in post-stress cortisol concentrations. *Aquaculture*, 193: 373-380.
- Wendelaar-Bonga, S. E. 1997. The stress-response in fish. *Physiol. Rev.*, 77: 591-625.
- Weisiger, R. y Fridovich, I. 1973. Mitochondrial superoxide dismutase site of synthesis and intramitochondrial localization. *J. Biol. Chem.*, 248: 4793-4796.
- Westers, H. 1984. *Principles of Intensive Fish Culture (a manual for Michigan's state fish hatcheries)*. Michigan Department of Natural Resources, Lansing, Michigan.
- White, A. y Fletcher, T. C. 1985. The influence of hormone and inflammatory agents on C-reactive protein, cortisol and alanine aminotransferase in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 80C: 99-104.

## VII.- Referencias bibliográficas

---

- White, A. y Fletcher, T. C. 1986. Serum cortisol, glucose and lipids in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) exposed to starvation and aquarium stress. *Comp. Biochem. Physiol.*, 84A: 649-653.
- Wihelm Filho, W. D., Giulivi, C. y Boveris, A. 1993. Antioxidant defenses in marine fish—I. Teleost. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106C: 409-413.
- Wilkie, M. P., Brobbel, M.A., Davison, K., Forsyth, L. y Tufts, B.L. 1997. Influences of temperature upon the postexercise physiology of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 54: 503-511.
- Winberg, S. y Nilsson, G. E. 1993. Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behaviour and stress reactions, with particular reference to fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106C: 597-614.
- Wink, D. A. y Mitchell, J. B. 1998. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Rad. Biol. Med.*, 25: 434-456.
- Wink, D. A., Nims, R. W., Darbyshire, J. F., Christodoulou, D., Hanbauer, I., Cox, G. W., Laval, F., Laval, J., Cook, J. A., Krishna, M. C., DeGraff, W., Mitchell, J. B. 1994. Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at natural pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O<sub>2</sub> reaction. *Chem. Res. Toxicol.*, 7: 519-525.
- Winterbourn, C. C. 1994. Oxidative reactions of hemoglobin. *Methods enzymol.*, 186: 265-272.
- Woodall, A. N., Ashley, L. M., Halver, J. E., Olcott, H. S. y van der Veen, J. 1964. Nutrition of salmonoid fishes: XIII. The  $\alpha$ -tocopherol requirement of chinook salmon. *J. Nutr.*, 84: 125-135.
- Woodward, B. 1994. Dietary vitamin requirements of cultured young fish, with emphasis on quantitative estimates for salmonids. *Aquaculture*, 124: 133-168.
- Yamada, T., Volker, C., Levy, A. y Grisham, M. B. 1991. The effects of sulfasalazine metabolites on hemoglobin-catalyzed lipid peroxidation. *Free Rad. Biol. Med.*, 10: 41-49.
- Yigit, S., Yurdakök, M., Kiliç, K., Oran, O., Erdem, G., Tekinalp, G. 1999. Serum malondialdehyde concentration in babies with hyperbilirubinaemia. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.*, 80: 235-237.
- Young, P. S. y Cech, J.J. Jr. 1993. Effects of exercise conditioning on stress responses and recovery in cultured and wild young-of-the-year striped bass, *Morone saxatilis*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 2094-2099.
- Young, P. S. y Cech, J.J. Jr. 1994. Effects of different exercise conditioning velocities on the energy reserves and swimming stress responses in young-of-the-year striped bass (*Morone saxatilis*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51: 1528-1534.
- Zonneveld, N. y Fadholi, R. 1991. Feed intake and growth of the red tilapia at different stocking densities in ponds in Indonesia. *Aquaculture*, 99: 83-94.

