

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y
ANTROPOLOGÍA FÍSICA

FUENTES ALTERNATIVAS DE PROTEÍNAS EN
ACUICULTURA. DISFUNCIONES ENDOCRINAS,
METABÓLICAS E INMUNO-HISTOPATOLÓGICAS

PEDRO GÓMEZ REQUENI

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

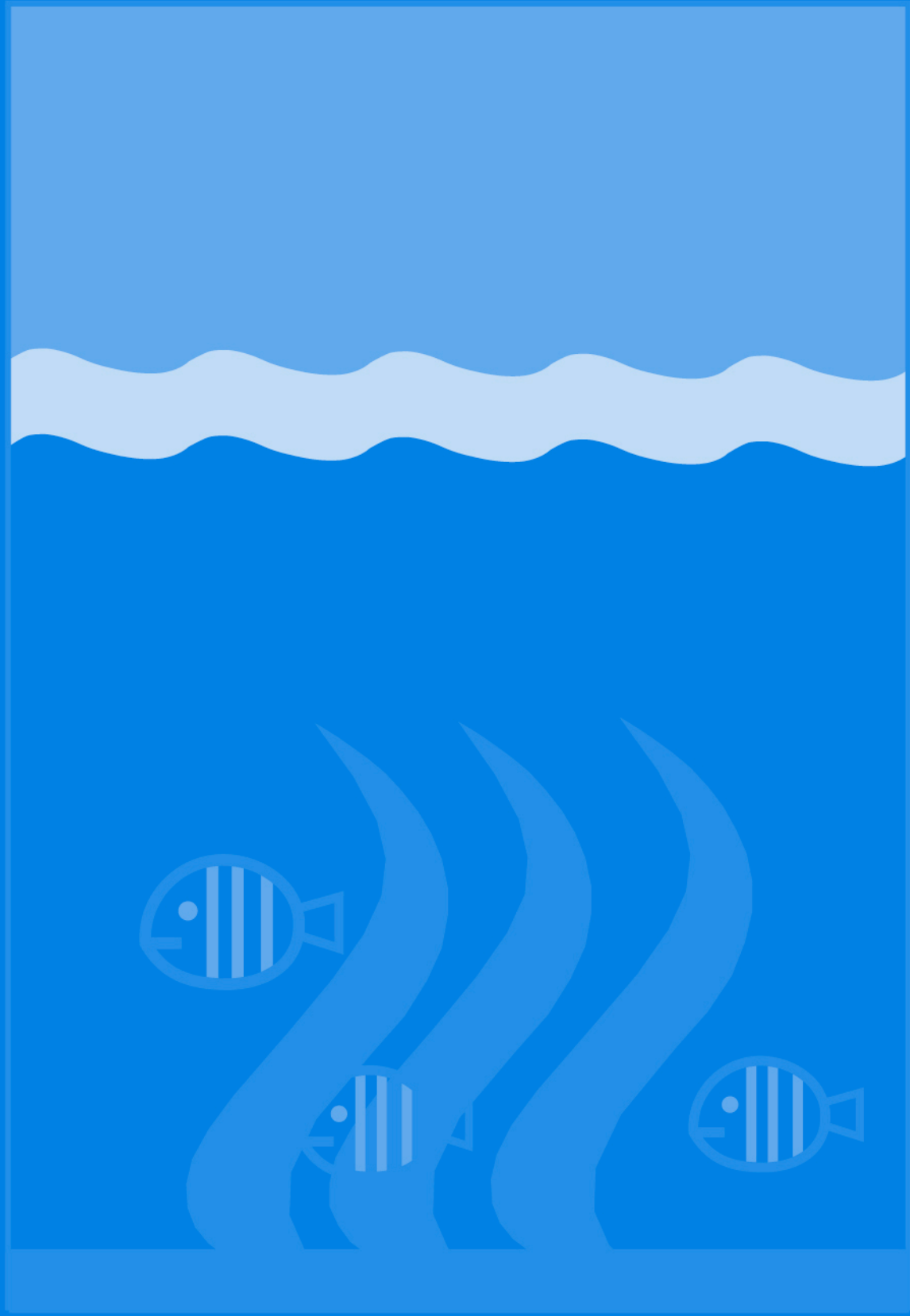
Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 24 de Febrer de 2006 davant un tribunal format per:

- D^a. Pilar Álvarez Pellitero
- D. Jose M. Bautista Santa Cruz
- D. Manuel J. Martínez Valdivia
- D. Manuel Yúfera Ginés
- D^a. M^a. Dolores Garcerá Zamorano

Va ser dirigida per:
D. Jaume Pérez Sánchez

©Copyright: Servei de Publicacions
Pedro Gómez Requeni

Depòsit legal:
I.S.B.N.:978-84-370-6678-3
Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115



Noviembre - 2005

Pedro Gómez Requeni

VNIVERSITAT Đ VALÈNCIA

(Đ) Facultat de Ciències Biològiques



FUENTES ALTERNATIVAS DE PROTEÍNAS EN ACUICULTURA.
DISFUNCIONES ENDOCRINAS, METABÓLICAS E
INMUNO-HISTOPATOLÓGICAS

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Instituto de Acuicultura de Torre la Sal



**FUENTES ALTERNATIVAS DE PROTEÍNAS EN
ACUICULTURA. DISFUNCIONES
ENDOCRINAS, METABÓLICAS E INMUNO-
HISTOPATOLÓGICAS**

Memoria presentada por Pedro Gómez Requeni para optar al
grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Valencia, Noviembre 2005

FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA FUNCIONAL I
ANTROPOLOGIA FÍSICA

**FUENTES ALTERNATIVAS DE PROTEÍNAS EN
ACUICULTURA. DISFUNCIONES
ENDOCRINAS, METABÓLICAS E INMUNO-
HISTOPATOLÓGICAS**

Memoria presentada por Pedro Gómez Requeni para optar al
grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Fdo.: Pedro Gómez Requeni

Valencia, Noviembre 2005

LA PRESENTE TESIS DOCTORAL HA SIDO DIRIGIDA
POR EL DOCTOR JAUME PÉREZ SÁNCHEZ,
INVESTIGADOR CIENTÍFICO DEL INSTITUTO DE
ACUICULTURA DE TORRE LA SAL (CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS), Y CUMPLE CON
TODOS LOS REQUISITOS EXIGIDOS POR LA
LEGISLACIÓN VIGENTE.

Fdo.: Jaume Pérez Sánchez

1. PROLOGO.....	1
1.1. Estado actual y perspectivas.....	3
1.2. Materias primas.....	6
1.3. Fuentes proteicas alternativas.....	15
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	19
3. MATERIAL Y METODOS.....	29
3.1. Condiciones de cultivo.....	31
3.2. Formulación y diseño de las dietas experimentales.....	34
3.2.1. Perfil aminoacídico.....	34
3.2.2. Fuente de proteína.....	36
3.3. Muestras.....	40
3.3.1. Biomasa.....	40
3.3.2. Composición corporal.....	40
3.3.3. Sangre.....	40
3.3.4. Tejidos.....	40
3.3.5. Excreción amoniaca.....	41
3.4. Análisis de composición corporal y aminoácidos tisulares.....	42
3.4.1. Determinación de nitrógeno (<i>Kjeldahl</i>).....	42
3.4.2. Extracción y determinación de lípidos totales (<i>Folch</i>).....	44
3.4.3. Cuantificación de cenizas.....	44
3.4.4. Aminoácidos tisulares.....	45
3.5. Actividades enzimáticas.....	47
3.5.1. Catabolismo aminoacídico.....	48
3.5.2. Enzimas lipogénicos.....	49
3.5.3. Enzimas glucolíticos.....	50
3.5.4. Enzimas gluconeogénicos.....	50
3.6. Metabolitos plasmáticos.....	51
3.6.1. Glucosa.....	51
3.6.2. Triglicéridos.....	51
3.6.3. Colesterol.....	52
3.7. Bioquímica de hormonas, receptores y proteínas de transporte.....	53
3.7.1. Radioyodación.....	53
3.7.2. Radioinmunoensayos.....	54
3.7.2.1. RIA de GH.....	57
3.7.2.2. RIA de IGF-I.....	60

3.7.3. Ensayo de radiorreceptores de GH.....	63
3.7.4. <i>Western Blot</i> (IGFBPs).....	65
3.8. Expresión génica (GHR e IGFs).....	66
3.8.1. Extracción de ARN.....	66
3.8.2. PCR en tiempo real.....	66
3.9. Inmuno-histopatología.....	68
3.9.1. Cortes histológicos.....	68
3.9.2. Ensayos inmunológicos.....	68
3.9.2.1. Lisozima.....	68
3.9.2.2. Complemento.....	68
3.9.2.3. Mieloperoxidasa.....	69
3.9.2.4. Estallido respiratorio.....	70
3.10. Análisis estadístico.....	71
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	73
4.1. Optimización del perfil aminoacídico de la dieta en piensos de engorde de dorada.....	75
4.1.1. Introducción.....	77
4.1.2. Diseño experimental.....	80
4.1.3. Resultados.....	82
4.1.4. Discusión.....	96
4.1.4.1. Crecimiento y excreción amoniaca.....	96
4.1.4.2. Metabolismo intermediario.....	97
4.1.4.3. Sistema somatotrópico.....	104
4.2. Nivel crítico de sustitución y viabilidad a largo plazo en la dorada.....	107
4.2.1. Introducción.....	109
4.2.2. Diseño experimental.....	111
4.2.3. Resultados.....	116
4.2.3.1. Engorde 2a.....	116
4.2.3.2. Engorde 3.....	126
4.2.3.3. Engorde 4.....	134
4.2.4. Discusión.....	136
4.2.4.1. Potencial de crecimiento y nivel crítico de sustitución: alteraciones de la ingesta y del sistema somatotrópico...	136
4.2.4.2. Alteraciones inmuno-histopatológicas.....	141
4.3. Disfunciones del sistema somatotrópico de la trucha por dietas basadas en harinas vegetales.....	149
4.3.1. Introducción.....	151
4.3.2. Material y métodos.....	156
4.3.2.1. Diseño experimental.....	156
4.3.2.2. Clonación y secuenciación del GHR de trucha.....	157

4.3.2.3. Estructura y análisis filogenético de los GHRs.....	158
4.3.2.4. <i>Northern Blot</i>	158
4.3.3. Resultados.....	160
4.3.3.1. Caracterización molecular del GHR de trucha.....	160
4.3.3.2. Crecimiento y regulación nutricional del sistema somatotrópico.....	165
4.3.4. Discusión.....	172
5. CONCLUSIONES.....	177
6. BIBLIOGRAFIA.....	181
7. APENDICES.....	223

- P. Gómez-Requeni**, M. Mingarro, S. Kirchner, J.A. Calduch-Giner, F. Médale, G. Corraze, S. Panserat, S.A.M. Martin, D.F. Houlihan, S. Kaushik, J. Pérez-Sánchez, 2003. Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotropic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 220, 749-767.
- P. Gómez-Requeni**, M. Mingarro, J.A. Calduch-Giner, F. Médale, S.A.M. Martin, D.F. Houlihan, S. Kaushik, J. Pérez-Sánchez, 2004. Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 232, 493-510.
- A. Sitjà-Bobadilla, S. Peña-Llopis, **P. Gómez-Requeni**, F. Médale, S. Kaushik, J. Pérez-Sánchez, 2005. Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 249, 387-400.
- P. Gómez-Requeni**, J. Calduch-Giner, S. Vega-Rubín de Celis, F. Médale, S.J. Kaushik, J. Pérez-Sánchez, 2005. Regulation of somatotropic axis by dietary factors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nut.* 94, 353-361.

Tabla 1.1. Analítica de harinas y aceites procedentes de Europa y Sudamérica.....	11
Tabla 2.1. Organigrama resumen del conjunto de experiencias desarrolladas en dorada y trucha.....	27
Tabla 3.1. Ingredientes y composición química de las dietas utilizadas en el engorde 1 de dorada.....	35
Tabla 3.2. Ingredientes y composición química de las dietas utilizadas en los engordes 2a, 3 y 4 de dorada.....	37
Tabla 3.3. Ingredientes, composición química y coeficientes de digestibilidad aparentes (CDA) de las dietas utilizadas en el engorde 2b de trucha.....	39
Tabla 3.4. Representación esquemática (I) de los RIAs de GH e IGF-I.....	56
Tabla 3.5. Representación esquemática (II) de los RIAs de GH e IGF-I.....	56
Tabla 3.6. Secuencias de los cebadores utilizados para determinar la expresión génica de GHR e IGFs en dorada y trucha.....	67
Tabla 4.1. Composición química de las dietas utilizadas en el engorde 1 de dorada.....	80
Tabla 4.2. Datos de crecimiento y composición corporal (engorde 1 de dorada).....	83
Tabla 4.3. Enzimas hepáticos involucrados en el catabolismo aminoacídico (engorde 1 de dorada).....	87
Tabla 4.4. Aminoácidos libres en el músculo esquelético (engorde 1 de dorada).....	89
Tabla 4.5. Enzimas lipogénicos, glucolíticos y gluconeogénicos (engorde 1 de dorada).....	91
Tabla 4.6. Composición química de las dietas utilizadas en los engordes 2a, 3 y 4 de dorada.....	111
Tabla 4.7. Requerimientos y composición aminoacídica de las dietas en los engordes 2a, 3 y 4 de dorada.....	113
Tabla 4.8. Datos de crecimiento y composición corporal (engorde 2a de dorada).....	117
Tabla 4.9. Aminoácidos libres en el músculo esquelético (engorde 2a de dorada).....	118

Tabla 4.10. Enzimas hepáticos involucrados en el catabolismo aminoacídico (engorde 2a de dorada).....	119
Tabla 4.11. Crecimiento, contenido graso del hígado y niveles circulantes de glucosa, colesterol y proteínas (engorde 3 de dorada).....	127
Tabla 4.12. Datos de crecimiento y composición corporal (engorde 4 de dorada).....	135
Tabla 4.13. Composición química y coeficientes de digestibilidad aparentes (CDA) (engorde 2b de trucha).....	156
Tabla 4.14. Datos de crecimiento y retención de nutrientes (engorde 2b de trucha).....	165
Tabla 4.15. Expresión génica de GHRs e IGFs en hígado, músculo esquelético y tejido adiposo (engorde 2b de trucha).....	169

Figura 1.1. Producción pesquera y acuícola a nivel mundial.....	3
Figura 1.2. Producción, capturas y consumo mundial de pescado.....	4
Figura 1.3. Rutas biosintéticas de PUFAs C ₂₀ y C ₂₂ a partir de precursores de C ₁₈ n-3, n-6 y n-9.....	7
Figura 1.4. Evolución del precio de las harinas de pescado en Europa.....	15
Figura 1.5. Perfil aminoacídico de proteínas vegetales y harinas de pescado.....	17
Figura 3.1. Tanques experimentales de 500 litros.....	31
Figura 3.2. Tanques experimentales de 3000 litros.....	32
Figura 3.3. Tanques experimentales de 1000 litros.....	33
Figura 3.4. Tanques experimentales de 90 litros.....	41
Figura 3.5. Cromatograma de aminoácidos libres del músculo esquelético de doradas alimentadas con la dieta FM (engorde 2a).....	46
Figura 3.6. Representación esquemática de los RIAs.....	54
Figura 3.7. Curva de desplazamiento de GH recombinante de dorada.....	57
Figura 3.8. <i>Western-blot</i> de extracto hipofisario de dorada.....	58
Figura 3.9. Curva de desplazamiento de GH recombinante de trucha.....	59
Figura 3.10. Curva de desplazamiento de IGF-I recombinante de pagro.....	61
Figura 3.11. Curva de desplazamiento de IGF-I recombinante de trucha.....	62
Figura 4.1. Curva de crecimiento de doradas en cultivo en las instalaciones del IATS (CSIC, Castellón).....	78
Figura 4.2. Excreción amoniacal instantánea y acumulada (engorde 1 de dorada).....	85
Figura 4.3. Niveles circulantes de glucosa y TG (engorde 1 de dorada).....	93
Figura 4.4. Niveles circulantes de GH, receptores hepáticos de GH y niveles circulantes de IGF-I (engorde 1 de dorada).....	95
Figura 4.5. Esquema representativo de los procesos de transaminación y desaminación oxidativa.....	97
Figura 4.6. Representación esquemática de la vía lipogénica.....	100
Figura 4.7. Diagrama representativo de las vías glucolítica y gluconeogénica.....	103
Figura 4.8. Secreción y modos de acción de la GH.....	105

Figura 4.9. Niveles circulantes de glucosa, TG y colesterol (engorde 2a de dorada).....	121
Figura 4.10. Niveles circulantes de GH e IGF-I (engorde 2a de dorada).....	123
Figura 4.11. Receptores hepáticos de GH (engorde 2a de dorada).....	124
Figura 4.12. Expresión de GHR e IGF-I (engorde 2a de dorada).....	125
Figura 4.13. Secciones histológicas de hígado e intestino (engorde 3 de dorada).....	129
Figura 4.14. Lisozima sérica y ACH ₅₀ (engorde 3 de dorada).....	131
Figura 4.15. Actividad MPO en riñón y en plasma (engorde 3 de dorada)..	132
Figura 4.16. Estallido respiratorio en leucocitos aislados del riñón anterior (engorde 3 de dorada).....	133
Figura 4.17. Peso corporal e ingesta (engorde 4 de dorada).....	137
Figura 4.18. Expresión de LPL en tejido adiposo e hígado.....	147
Figura 4.19. Organización intrón-exón de los GHRs.....	153
Figura 4.20. Representación esquemática de los GHRs de peces con isoformas truncadas y largas.....	154
Figura 4.21. Representación esquemática de la estrategia de PCR seguida para la clonación y secuenciación del GHR de trucha.....	161
Figura 4.22. Alineamiento aminoacídico del GHR de trucha y la secuencia consenso de GHRs de peces no salmónidos.....	162
Figura 4.23. <i>Northern blot</i> de ARN hepático (engorde 2b de trucha).....	163
Figura 4.24. Arbol filogenético de GHRs.....	164
Figura 4.25. Niveles circulantes de GH, receptores hepáticos de GH y niveles circulantes de IGF-I (engorde 2b de trucha).....	167
Figura 4.26. <i>Western ligand blot</i> de IGFBPs (engorde 2b de trucha).....	171

Ac: Anticuerpo.
ADN: Acido desoxirribonucleico.
Ag: Antígeno.
Ala: Alanina.
ALAT: Alanina aminotransferasa.
AOAC: Asociación Oficial de Químicos Analíticos.
Arg: Arginina.
ARN: Acido ribonucleico.
ASAT: Aspartato aminotransferasa.
Asn: Asparagina.
Asp: Aspartato o ácido aspártico.
CDA: Coeficiente de digestibilidad aparente.
CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
CTAB: Bromuro de cetiltrimetil amonio.
DAA: Aminoácidos no esenciales.
DHA: Acido docosahexanoico (22:6n-3).
DTT: Ditioneitol.
EDTA: Acido etilendiamino tetraacético.
EET: Encefalopatía Espongiforme Transmisible.
EGTA: Acido etilenglicol-bis amino tetraacético.
EPA: Acido eicosapentanoico (20:5n-3).
EQT: Equivalentes Tóxicos.
FAA: Aminoácidos libres totales.
FAS: Acido graso sintasa.
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
FE: Conversión del alimento.
FET: Factores de Equivalencia Tóxica.
GDH: Glutamato deshidrogenasa.
GH: Hormona de crecimiento.
GHR: Receptor de GH.
GHRH: Hormona liberadora de GH.
GK: Glucoquinasa.
Gln: Glutamina.
Glu: Glutamato o ácido glutámico.
Gly: Glicina.
G6Pasa: Glucosa-6-fosfatasa.
G6PD: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.
GSH: Glutati6n reducido.
GSSG: Glutati6n oxidado.

HBSS: Solución salina equilibrada de Hanks.
His: Histidina.
HSI: Índice hepatosomático.
Hyp: Hidroxiprolina.
IAA: Aminoácidos esenciales.
IATS: Instituto de Acuicultura de Torre la Sal.
IFFO: Organización Internacional de Harinas y Aceites de Pescado.
IGF-I: Somatomedina.
IGFBP: Proteína de transporte de IGFs.
IgG: Inmunoglobulina G.
Ile: Isoleucina.
LPL: Lipoproteína lipasa.
Lys: Lisina.
ME: Enzima málico.
MeHg: Metil-mercurio.
Met: Metionina.
MFI: Índice de grasa mesentérica.
MPO: Mieloperoxidasa.
MS: Materia seca.
NBT: Azul de nitro-tetrazolio.
NRC: Consejo Nacional de Investigación.
NRS: Suero pre-inmune de conejo.
Nt: Nucleótidos.
OMS: Organización Mundial de la Salud.
Pb: pares de bases.
PCB: Policlorobifenilo.
PCDD: Policlorodibenzo-*p*-dioxina.
PCDF: Policlorodibenzofurano.
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.
Phe: Fenilalanina.
PER: Eficiencia proteica.
PM: Peso corporal medio.
PMA: Acetato de forbol miristato.
PPAR: Factor transcripcional liberador de peroxisomas.
Pro: Prolina.
PUFA: Acido graso poli-insaturado.
RIA: Radioinmunoensayo.
SCAN: Comité Científico de Nutrición Animal.
Ser: Serina.

SGR: Tasa específica de crecimiento.
SRBC: Eritrocitos de oveja.
Tau: Taurina.
2,3,7,8-TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina.
TDI: Ingesta Diaria Tolerable.
TG: Triglicéridos.
Thr: Treonina.
TMB: 3,3',5,5'-tetrametil bencidina.
TNF: Factor de necrosis tumoral.
Trp: Triptófano.
Tyr: Tirosina.
UE: Unión Europea.
UI: Unidades Internacionales.
Val: Valina.
VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.



Prólogo

1.1. Estado actual y perspectivas

En la actualidad, la acuicultura* proporciona el 25% del pescado destinado al consumo humano (Hossain y cols., 2001). La producción global de este sector se ha triplicado en 15 años, pasando de 10 Mt[†] al final de la década de los 80 a 29 Mt en 1997 (FAO[‡], 2002). Este aumento en la producción acuícola contribuyó a que en dicho año la producción de pescado a nivel mundial alcanzara un máximo histórico de 122 Mt (**Fig. 1.1**). Los cambios climáticos sufridos en el Sureste del Pacífico, afectado severamente por el fenómeno de “El Niño”, provocó durante los años siguientes (1997 y 1998) un descenso en el número de capturas (Cheng y cols., 2003a), estabilizándose desde entonces en unas cifras de 85-95 Mt anuales.

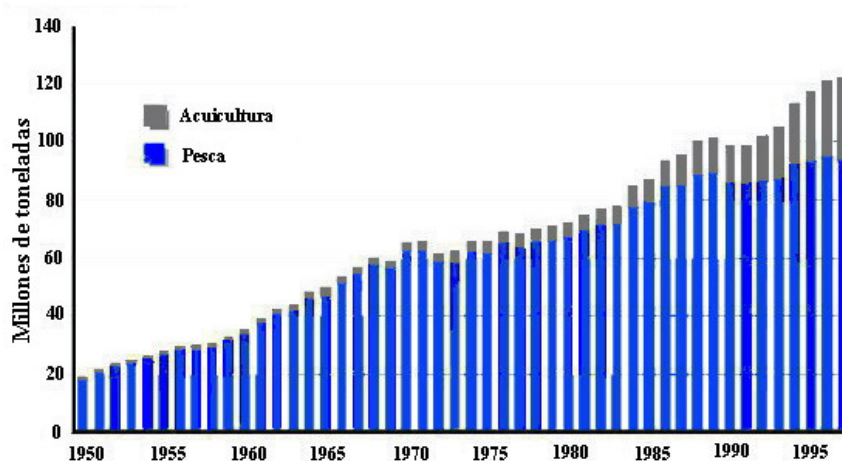


Fig. 1.1: Producción pesquera y acuícola a nivel mundial (FAO, 2002).

* Cría o cultivo de organismos acuáticos con técnicas encaminadas a aumentar, por encima de las capacidades naturales del medio, la producción de los organismos en cuestión; éstos serán, a lo largo de toda la fase de cría o de cultivo y hasta el momento de su recogida, propiedad de una persona física o jurídica. (Reglamento (CE) n° 2792/1999 del Consejo, de 17 de diciembre de 1999).

[†] Millones de toneladas.

[‡] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

El estado de explotación en el que se encuentran las principales reservas pesqueras no ha experimentado grandes variaciones desde principios de la década de los 90. Por tanto, en la actualidad, un 24% se encuentran moderadamente explotadas, un 52% se están explotando a su máximo nivel, otro 16% están siendo ya sobreexplotadas y el 8% restante se encuentran agotadas o en fase de recuperación (FAO, 2004).

Por el contrario, la acuicultura es el sector de producción primaria que ha experimentado un mayor crecimiento en el último decenio, oscilando éste alrededor del 11% anual (Tidwell y Allan, 2001). Según la FAO, en el año 2030 la mitad del pescado consumido provendrá de la acuicultura (**Fig. 1.2**). Sin embargo, tal y como suele practicarse, la acuicultura es una posible solución pero también un factor contribuyente al colapso de las pesquerías en todo el mundo (Hardy, 1999).

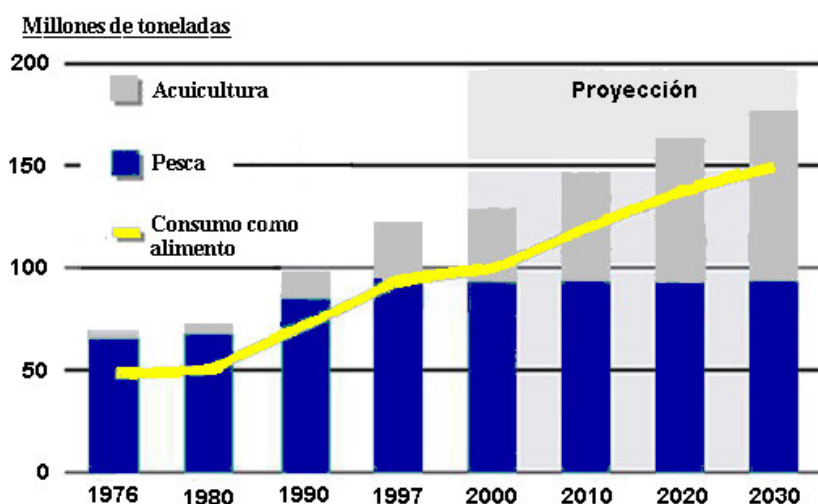


Fig. 1.2: Producción, capturas y consumo mundial de pescado (FAO, 2002).

Anualmente se destinan alrededor de 27 Mt de pescado (un tercio del total de las capturas) a la fabricación de harinas y aceites (Francis y cols., 2001). Las harinas se fabrican mediante cocción, prensado y secado de triturados de pescado con poco o ningún valor para el hombre (anchoveta, capelina y sábalo), así como de los desechos generados tras la fabricación de alimentos destinados al consumo humano. Los aceites, por su parte, son sub-productos del proceso de prensado (FAO, 1986). Así pues, si a los 27 Mt de pescado procedentes de las pesquerías le sumamos los 6 Mt generados como desechos industriales, obtenemos un total de 33 Mt destinados a servir como materia prima para la fabricación de piensos. De este modo, finalizado todo el proceso de elaboración, anualmente se generan 6,2 Mt de harinas y 1,2 Mt de aceites de pescado en unas 400 fábricas repartidas por todo el mundo, principalmente en Perú, Chile, Islandia, Dinamarca y Noruega (Hardy, 1999; Zaldívar, 2002).

La acuicultura es una de las actividades industriales que actualmente refleja una mayor demanda de harinas y aceites de pescado (Mundheim y cols., 2004). La proporción de estos ingredientes en los piensos destinados a la acuicultura es también mayor que en los destinados a la cría de aves de corral y de ganado. De hecho, la partida de harinas de pescado destinada a la acuicultura pasó de un 10% en 1988 a un 17% en 1994 (Naylor y cols., 2000). Este paulatino aumento alcanzó el 35% en el año 2003, y se prevé que rebase el 48% en el 2010.

De este modo, se pone de manifiesto que la actividad piscícola no puede estar únicamente basada en las reservas finitas de pescado procedentes de las pesquerías ya que, como se reseñó anteriormente, muchas de ellas se encuentran totalmente explotadas, sobreexplotadas e incluso agotadas (NRC, 1999; FAO, 2004). Este hecho es especialmente relevante si tenemos en cuenta que de acuerdo con los actuales cánones se precisan de 2 a 5 kg de pescado (de pesquerías) para producir 1 kg de pescado de crianza (Tacon, 1997a; Naylor y cols., 2000).

1.2. Materias primas

El pescado es la fuente más importante de ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) omega-3 de cadena larga [ácido eicosapentanoico (20:5n-3, EPA); ácido docosahexanoico (22:6n-3, DHA)] en la dieta humana (Sargent y cols., 1999; Sidhu, 2003). Al igual que en muchos vertebrados terrestres, estos ácidos grasos son esenciales para los peces de origen marino, y debido a que no son capaces de sintetizarlos por ellos mismos deben ser obtenidos a través de la dieta (Sargent y cols., 1989; Bell y cols., 1996; Parpoura y Alexis, 2001).

La esencialidad de estos ácidos grasos en los peces marinos radica en su imposibilidad para sintetizarlos y elongarlos a partir del ácido linolénico (18:3n-3) (Fountoulaki y cols., 2003). Por el contrario, la mayoría de los peces de agua dulce son capaces de realizar la conversión de 18:3n-3 a 20:5n-3 y a 22:6n-3 (Sargent y cols., 2002) (**Fig. 1.3**). Esta diferencia, fundamental a la hora de determinar los requerimientos en ácidos grasos, es consecuencia de que el EPA y el DHA son muy abundantes en el medio marino (Kanazawa, 1985). Su origen son las diatomeas y los dinoflagelados, que son la base de la cadena trófica marina (Sargent y cols., 2002; Tocher, 2003).

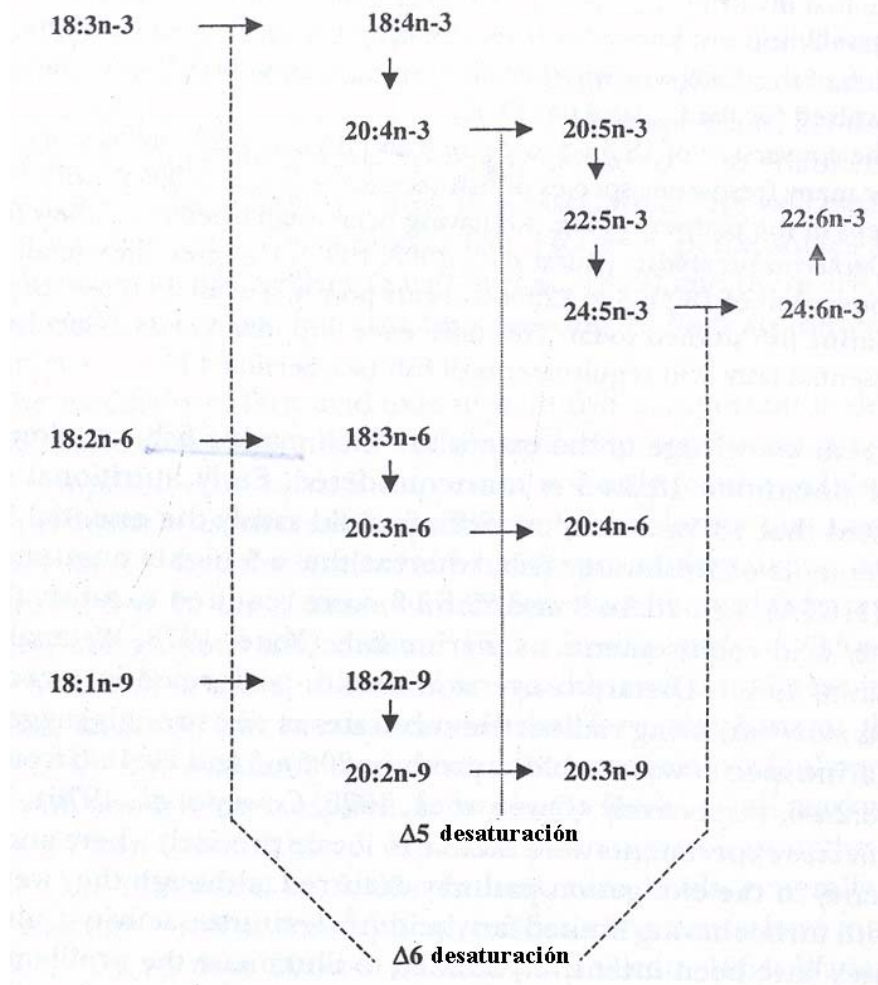


Fig. 1.3: Rutas biosintéticas de PUFA C₂₀ y C₂₂ a partir de precursores de C₁₈ n-3, n-6 y n-9. Las flechas verticales representan reacciones de elongación (hacia abajo) o acortamiento (hacia arriba) de la cadena. Las flechas horizontales representan reacciones de desaturación (modificado de Sargent y cols., 2002).

Por consiguiente, los peces marinos tienen un superávit de EPA y DHA en su dieta natural. Por el contrario, la presa natural (particularmente invertebrados) de una gran parte de peces de agua dulce no es rica en DHA, pero sí en 18:2n-6, 18:3n-3 y, en menor medida, en EPA (Sargent y cols., 1999). De este modo, aunque los peces de agua dulce originalmente evolucionaron en el océano, volvieron a la biosfera terrestre donde la conversión de 18:3n-3 y EPA a DHA es necesaria (Sargent y cols., 1995, 2002).

En la dieta humana, la relación entre ácidos grasos omega-6 y omega-3 es tan importante como el propio contenido en omega-3 (De Deckere y cols., 1998; Horrocks y Yeo, 1999; Simopoulos, 1999). El consumo regular de productos marinos mantiene el cociente omega-3/omega-6 en una proporción de aproximadamente 4:1 (Bell y cols., 1998; Refsgaard y cols., 1998; Aursand y cols., 2000; Simopoulos, 2002), pudiendo prevenirse de este modo el desarrollo de diversas enfermedades (Martino y cols., 2002). Por tanto, la utilización de fuentes alternativas de materias primas en los piensos de engorde en acuicultura está condicionada por la necesidad de mantener unos niveles elevados de EPA y DHA en el producto final destinado al consumo (Sargent y Tacon, 1999; Bell y cols., 2003; Tocher, 2003).

Sin embargo, las materias primas de origen marino pueden ser fuentes potenciales de residuos químicos y metales pesados (Hansen y cols., 1976; Hendricks, 2002). En ocasiones, estos contaminantes son fruto de una contaminación natural pero, en cualquier caso, su eliminación a escala industrial es harto difícil por lo que se impone la práctica de estrictos criterios de selección y control. Este hecho es especialmente importante cuando se tienen en consideración los grupos más vulnerables de consumidores a los que van dirigidos estos productos, como son los niños y las mujeres embarazadas (Jacobson y Jacobson, 1996; Sidhu, 2003). A este respecto han surgido dos problemas de singular importancia que son objeto de controversia en debates científicos, revistas especializadas y diversos foros de opinión (p.e., the Fish Information Network: <http://www.gafta.com/fin/fin.html>):

1. Presencia de dioxinas, policlorobifenilos (PCBs) y metales pesados en el pescado.
2. Relación entre los productos de origen animal y la aparición de Encefalopatía Espongiforme Transmisible (EET).

Dioxinas, PCBs y metales pesados

Bajo el término “dioxinas” se agrupan los compuestos pertenecientes a dos estructuras químicas bien diferenciadas, policlorodibenzo-*p*-dioxinas (PCDDs) y policlorodibenzofuranos (PCDFs), que pertenecen al grupo de contaminantes orgánicos lipofílicos y persistentes. A ellos nos referiremos de modo genérico como “dioxinas” (Baars y cols., 2004), que junto con los PCBs se han asociado con inmunotoxicidad y carcinogénesis (Svensson y cols., 1994, 1995), produciendo también efectos adversos sobre la reproducción y varias funciones endocrinas (Papadopoulos y cols., 2004).

La toxicidad de las dioxinas difiere considerablemente de unos congéneres a otros, siendo el compuesto más tóxico el 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (2,3,7,8-TCDD) (Walker y Peterson, 1991; Spitsbergen y cols., 1991). Por consiguiente, para facilitar la comparación de datos analíticos es conveniente expresar los niveles de contaminantes como “Equivalentes Tóxicos” (EQT).

Esta conversión está basada en la asunción de que todos los congéneres muestran efectos cualitativos similares, pero con intensidades diferentes (Van den Berg y cols., 1998). Dicha diferencia se expresa mediante “Factores de Equivalencia Tóxica” (FET), que muestran la relación entre la toxicidad del congénere en estudio y la toxicidad del compuesto más tóxico (2,3,7,8-TCDD), al que se le asigna arbitrariamente un valor de 1 (Judd y cols., 2004).

La multiplicación de la cantidad de cada congénere en la muestra problema por su valor FET nos da el valor EQT.

$$\text{EQT} = \Sigma(\text{PCDDi} \times \text{FETi}) + \Sigma(\text{PCDFi} \times \text{FETi}) + \Sigma(\text{PCBi} \times \text{FETi})$$

Los valores FET más usados para las dioxinas son los propuestos por un grupo de expertos de la OMS* (Van den Berg y cols., 1998). Por tanto, es frecuente encontrar los EQT expresados como EQT-OMS.

El Reglamento (CE) 2375/2001 (que modifica el Reglamento (CE) 466/2001) establece un límite máximo de dioxinas (suma de PCDDs y PCDFs) de 4 pg EQT-OMS/g peso fresco para la carne de pescado, productos de la pesca y sus derivados. En 1998, la OMS propuso para el hombre una ingesta diaria tolerable (TDI) de dioxinas y PCBs de 1-4 pg EQT-OMS/kg de peso corporal (Van Leeuwen y cols., 2000). A su vez, el Comité Científico de la Alimentación Humana fijó en el año 2001 una ingesta máxima semanal de dioxinas y PCBs de 14 pg EQT-OMS/kg de peso corporal.

Un trabajo publicado recientemente en la revista *Science* (Hites y cols., 2004) asegura que los salmones de cultivo muestran niveles de contaminantes (dioxinas y PCBs) mucho más elevados que los salmones capturados en su hábitat natural. Este estudio también afirma que la cantidad de contaminantes en salmones europeos (principalmente en el Reino Unido e Islas Feroe) es superior a la de los salmones cultivados en Sudamérica. La razón que se atribuye a este hecho es que los salmones de piscifactoría son alimentados con harinas y aceites de pescado que a su vez están contaminados (Jacobs y cols., 1997, 1998).

Efectivamente, los piensos procedentes de fábricas europeas muestran unos niveles de contaminación más elevados que los procedentes de industrias sudamericanas (**Tabla 1.1**). Sin embargo, el resultado de este estudio ha sido abiertamente criticado por gobiernos, científicos de prestigio y diversas

* Organización Mundial de la Salud.

organizaciones (p.e., Salmon of the Americas: <http://www.salmonoftheamericas.com/index.html>) que alegan que los niveles de contaminantes están por debajo de los niveles máximos establecidos tanto por la OMS como por la UE*; debiendo prevalecer los efectos beneficiosos del consumo de pescado sobre los hipotéticos efectos perniciosos derivados de la acumulación de contaminantes en su carne (Childs y cols., 1990; Uauy y Valenzuela, 2000).

Tabla 1.1: Analítica de harinas y aceites procedentes de Europa y Sudamérica (SCAN, 2000).

	Sudamérica	Europa
Aceite de pescado	0,8	3,5
(ng EQT-OMS/kg grasa)	3,0	24
	13	100
Harina de pescado	0,11	0,18
(ng EQT-OMS/kg materia seca)	0,70	6,10
	1,26	28,2

* Unión Europea.

Los efluentes procedentes de procesos industriales y agrícolas, además de pesticidas y otros compuestos altamente tóxicos, también pueden contener metales pesados (Langston, 1990; George, 1990). En este contexto, el mercurio es un tóxico medioambiental muy nocivo que suele llegar al ser humano a través del pescado y sus derivados (OMS, 1989).

El mercurio y el metil-mercurio (MeHg, la forma tóxica del mercurio) están presentes casi exclusivamente en los productos procedentes del medio marino (Choi y Cech, 1998; Tressou y cols., 2004), por lo que éstos llegan a representar hasta el 85% de los casos de contaminación por mercurio (Tchounwou y cols., 2003). Este biocontaminante afecta al desarrollo del sistema nervioso, provocando en el hombre perturbaciones psicológicas, ataxia, pérdida de visión y locomoción y un debilitamiento general (Storelli y cols., 2005). Existen trabajos en donde también se indica su potencial genotóxico en una amplia variedad de organismos, incluyendo el hombre (Betti y cols., 1992) y especies acuáticas (Bolognesi y cols., 1999).

El MeHg es un sub-producto de la acción microbiana en el ecosistema acuático (Jensen y Jernelov, 1969; Rudd, 1970; Wood, 1974). Esta forma de mercurio se bioacumula en la cadena alimenticia, encontrándose los niveles más elevados en el músculo de peces con una gran actividad física (Bloom, 1992; Knobeloch y cols., 2005). Endo y cols. (2003) destacan los valores encontrados en el músculo de delfines capturados en Japón (56,8 µg/g de peso húmedo) y en el Mediterráneo (81,2 µg/g de peso húmedo). Estos niveles superan claramente (150-200 veces) el valor máximo permitido para consumo humano (0,4 µg/g de peso húmedo) por el gobierno japonés.

La Decisión de la Comisión Europea 93/351 del 19 de mayo de 1993 establece como límite 0,5 µg de mercurio/g de peso húmedo, aunque para algunas especies se permiten valores de hasta 1 µg/g (Storelli y cols., 2005). En base a ello, el Comité de Expertos en Alimentación de la FAO/OMS recomienda una ingesta semanal de 300 µg de mercurio por persona, de los cuales un máximo de 100 µg pueden corresponder a MeHg.

Estas cantidades equivalen a una ingesta de 5 µg/kg de peso corporal de mercurio y de 1,6 µg/kg de MeHg (OMS, 2003). No obstante, una ingesta diaria de 100 g de salmonete de fango (*Mullus barbatus*), cantidad habitual en algunas poblaciones de la cuenca mediterránea (Buzina y cols., 1995; Valentino y cols., 1995), supone una ingesta total de mercurio (4,60-5,72 µg/kg de peso corporal) y de MeHg (4,60-5,13 µg/kg de peso corporal) claramente superior al límite máximo aconsejable.

Encefalopatía Espongiforme Transmisible (EET)

Las EETs son enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por la acumulación de una isoforma anormal de proteína de la célula anfitriona en el sistema nervioso central (Agrimi y cols., 2003). Según la “hipótesis del prión”, esta isoforma sería el principal (incluso el único) componente de los agentes etiológicos de las EETs (Prusiner, 1998).

Actualmente no existe ninguna prueba epidemiológica que demuestre que la harina de pescado transmita la EET a rumiantes u otros animales. Tampoco existen evidencias epidemiológicas de la transmisión a humanos de ninguna variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob que utilice el pescado o sus derivados como vector (Globefish, 2001). A pesar de ello, el Consejo de la UE publicó el 4 de diciembre del 2000 la Decisión 2000/766/CE, por la cual se prohíbe la utilización de productos animales en alimentación animal. Esta Decisión ha sido posteriormente modificada por la Orden 2002/248/CE.

La prohibición incluye la utilización de harinas de pescado en la alimentación de rumiantes, pero no prohíbe su uso en cerdos, aves de corral o peces (siempre que exista certificación de que procede de una planta procesadora especializada en harinas de pescado). El hecho de que la prohibición sólo afecte a los rumiantes se debe a que a menudo se utilizaban las harinas fabricadas a partir de carne o hueso de estos animales para adulterar las harinas de pescado. Para que esta prohibición se anule, se necesita la elaboración de métodos fiables para discriminar en los piensos de engorde la presencia de harinas procedentes de diferentes orígenes animales.

1.3. Fuentes proteicas alternativas

Además de los inconvenientes ya reseñados acerca de la utilización de harinas y aceites de pescado en acuicultura, existen razones puramente comerciales que dificultan su uso y alientan la búsqueda de fuentes alternativas de materias primas.

El precio de las harinas de pescado, en relación a otros constituyentes proteicos, sigue un comportamiento cíclico en gran parte debido a las fluctuaciones con las que se manifiestan algunos fenómenos naturales (p.e., el fenómeno de “El Niño”) (Sargent y Tacon, 1999). Independientemente de estos ritmos, el precio de estos ingredientes sufre un paulatino aumento desde hace unos años (**Fig. 1.4**), y todo parece indicar que este incremento continuará si la demanda de estos productos sigue creciendo (Barlow, 2000).

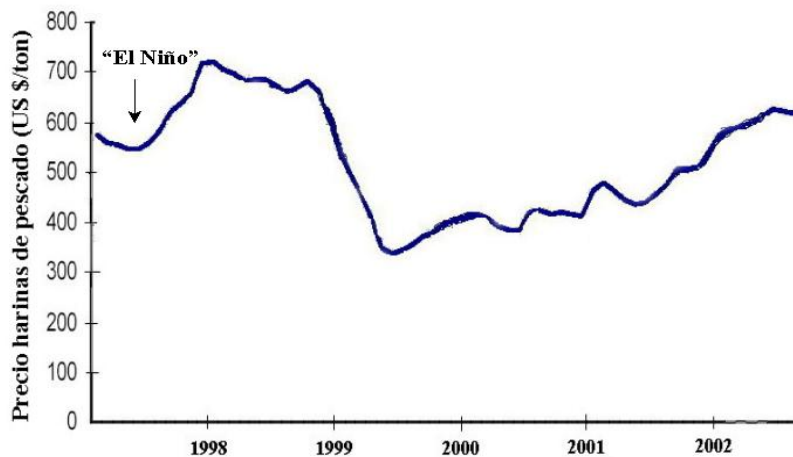


Fig. 1.4: Evolución del precio de las harinas de pescado en Europa (IFFO, 2002).

Teniendo en cuenta que los costes de alimentación suponen entre el 30-50% del total de los costes de producción (Alexis y Nengas, 2001), la tendencia al alza de los precios de las harinas de pescado podría minar la rentabilidad de muchas empresas del sector. La alarma que esta subida de precios genera en los empresarios ha desencadenado un esfuerzo generalizado por encontrar sustitutos a los ingredientes derivados del pescado (Higgs y cols., 1995; Hardy, 1996; Mwachireya y cols., 1999; Sargent y Tacon, 1999). Estos sustitutos incluyen alimentos fabricados a partir de derivados animales, tanto invertebrados (zooplancton, crisálida de gusano de seda o lombriz) (Kibria y cols., 1999; Plascencia-Jatomea y cols., 2002) como vertebrados (sangre, hígado, carne o hueso) (Alexis y cols., 1985; Millamena y Golez, 2001), proteínas de organismos unicelulares (hongos o bacterias) (Oliva-Teles y Gonçalves, 2001; Li y Gatlin III, 2003), semillas (soja, girasol, colza o algodón) (Kissil y cols., 2000; Pereira y Oliva-Teles, 2002), legumbres (soja, alubias o guisantes) (Nengas y cols., 1996; Thiessen y cols., 2003) y otros productos de origen vegetal (gluten de maíz, trigo o concentrados proteicos) (Regost y cols., 1999; Burel y cols., 2000).

Sin embargo, gran parte de estas alternativas presentan una serie de inconvenientes. Según Tacon (1994), la disponibilidad de proteínas procedentes de organismos unicelulares es limitada, costosa y de calidad variable. El uso de productos derivados de animales terrestres también es desaconsejable, debido a posibles contaminaciones microbianas. De este modo, los mayores esfuerzos se han centrado en los ingredientes de origen vegetal (Kaushik, 1990; Tacon, 1994).

Varios estudios indican que la inclusión de proteínas vegetales en los piensos podría disminuir el contenido de fósforo en los efluentes y, en consecuencia, el potencial riesgo de eutrofización (Ballestrazzi y cols., 1994; Hardy, 1995; Burel y cols., 2000). En cualquier caso, el éxito alcanzado con estos ingredientes es variable, y sólo en algunos casos se ha conseguido que un alto porcentaje de sustitución de las harinas de pescado por ingredientes vegetales no tenga efectos adversos sobre el crecimiento (Kaushik y cols., 1995, 2004; Watanabe y cols., 1998).

La baja palatabilidad y digestibilidad de los ingredientes de origen vegetal, junto con su alto contenido en carbohidratos y la presencia de factores anti-nutricionales (inhibidores de proteasas, fitatos, fitoestrógenos, alcaloides, alergógenos, etc.) son algunos de los factores que limitan esta sustitución (Alexis y Nengas, 2001; Francis y cols., 2001). Además, el pobre perfil aminoacídico de algunas proteínas de origen vegetal aconseja la utilización de diferentes combinaciones para simular el perfil aminoacídico de las harinas de pescado (Fig. 1.5).

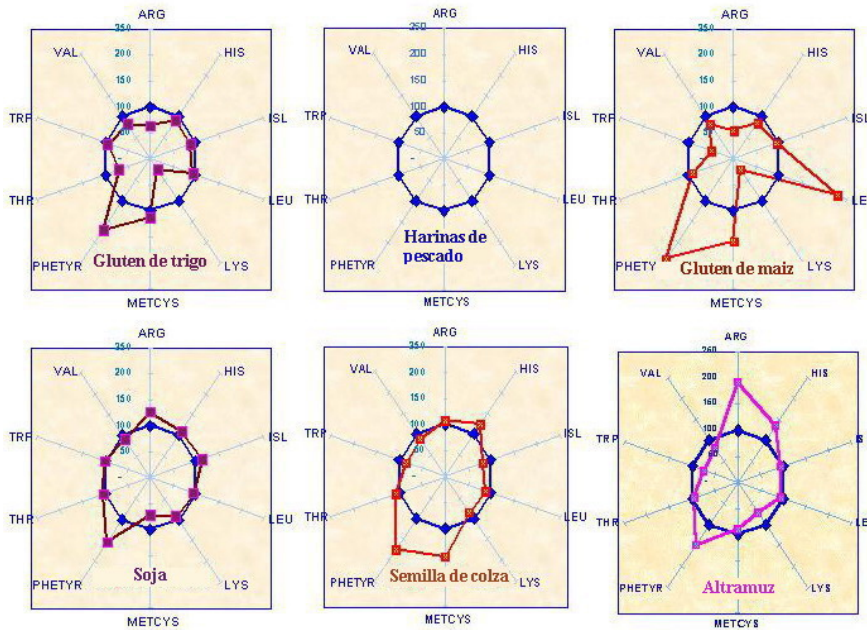


Fig. 1.5: Perfil aminoacídico de proteínas vegetales y harinas de pescado (azul).

Estos inconvenientes han sido paliados, hasta cierto punto, mediante la inclusión en la dieta de aminoácidos sintéticos y potenciadores de sabor. Además, se han desarrollado varios tratamientos para eliminar diferentes factores anti-nutricionales (Gomes y cols., 1995; Dias y cols., 1997; Tacon, 1997b). También se especula con desarrollar nuevas cepas de plantas con un menor contenido en fitatos y otros compuestos indeseables (Chamberlain, 2000; Sanden y cols., 2004). Pero a pesar de que el crecimiento de los animales es posiblemente el factor más importante, éste no es el único elemento que debe ser tenido en consideración a la hora de evaluar posibles sustitutos de las harinas de pescado. Es por ello que los efectos sobre el sistema inmunológico y la calidad del producto final deben ser también estudiados en profundidad (Brandsen y cols., 2001).



Objetivos y Plan de trabajo

La UE, sensible a la necesidad de encontrar fuentes alternativas de materias primas para piensos de engorde en acuicultura, ha financiado una red temática denominada “Fish Oil and Meal Replacement” (FORM, <http://www.formnetwork.net/>). Esta red (2003-2006) constituye un foro de discusión de todos los participantes en proyectos europeos del V Programa Marco, cuyas líneas de investigación están centradas en el desarrollo y explotación de fuentes alternativas de proteínas y aceites de pescado:

- **RAFOA:** Researching alternatives to fish oil for aquaculture.
- **PEPPA:** Perspectives of plant protein usage in aquaculture.
- **GUTINTEGRITY:** Gastrointestinal functions and feed intake regulation in Salmonids: impact of dietary vegetable lipids.
- **PUFAFEED:** Feed for aquatic animals that contains cultivated marine microorganisms as alternatives for fish oil.
- **FPPARS:** Cloning and functional analysis of fish peroxisome proliferator-activated receptors: the transcriptional control of lipid metabolism in farmed fish species.

Los trabajos que han servido de base para la realización de la presente Tesis Doctoral se realizaron en el marco del proyecto PEPPA (Q5RS-2000-30068; 2000-2004). En él participaron las siguientes universidades, centros de investigación y empresas:

- Laboratoire de Nutrition des Poissons (INRA-IFREMER, Saint-Pée-sur-Nivelle, France).
- Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (CSIC, Castellón, España).
- Departamento de Fisiología (Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, España).
- IBL Integratieve Zoologie (Universiteit Leiden, Netherlands).

- Department of Zoology (University of Aberdeen, Scotland).
- Dipartimento di Scienze Zootecniche (Università degli studi di Firenze, Italy).
- GIRA Consommateur (Ferney-Voltaire, France).

El objetivo básico de este proyecto consistió en establecer el nivel máximo de sustitución de las harinas de pescado por proteínas de origen vegetal sin detrimento del potencial de crecimiento, del estado de inmunocompetencia y de la calidad del producto final destinado al consumo humano. Como especies modelo de peces marinos y dulceacuícolas se utilizaron la dorada (*Sparus aurata*) y la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) respectivamente. Para ello, se desarrollaron diferentes experiencias de engorde en las instalaciones de cultivo del Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (IATS, CSIC) y de la Unidad Mixta INRA-IFREMER de Saint-Pée-sur-Nivelle (Francia).

Los resultados obtenidos a la largo del desarrollo del proyecto PEPPA han sido objeto de más de 20 publicaciones en revistas internacionales. Algunas de ellas constituyen la base de la presente Tesis Doctoral, que se ha centrado en la dorada, aunque también se han abordado a título comparativo diferentes aspectos relacionados con el sistema somatotrópico en respuesta a la sustitución total o parcial de las harinas de pescado por mezclas de proteínas vegetales:

- **P. Gómez-Requeni**, M. Mingarro, S. Kirchner, J.A. Caldach-Giner, F. Médale, G. Corraze, S. Panserat, S.A.M. Martin, D.F. Houlihan, S. Kaushik, J. Pérez-Sánchez, 2003. Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotropic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 220, 749-767.

- **P. Gómez-Requeni**, M. Mingarro, J.A. Calduch-Giner, F. Médale, S.A.M. Martin, D.F. Houlihan, S. Kaushik, J. Pérez-Sánchez, 2004. Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 232, 493-510.
- **P. Gómez-Requeni**, J. Calduch-Giner, S. Vega-Rubín de Celis, F. Médale, S.J. Kaushik, J. Pérez-Sánchez, 2005. Regulation of somatotropic axis by dietary factors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br. J. Nut.* 94, 353-361.
- A. Sitjà-Bobadilla, S. Peña-Llopis, **P. Gómez-Requeni**, F. Médale, S. Kaushik, J. Pérez-Sánchez, 2005. Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 249, 387-400.

Trabajos relacionados en los que el doctorando ha participado activamente:

- S. Vega-Rubín de Celis, **P. Gómez**, J.A. Calduch-Giner, F. Médale, J. Pérez-Sánchez, 2003. Expression and characterisation of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) somatolactin (SL): Assessment of *in vivo* metabolic effects. *Mar. Biotechnol.* 5, 92-101.
- P. Peyon, S. Vega-Rubín de Celis, **P. Gómez-Requeni**, S. Zanuy, J. Pérez-Sánchez, M. Carrillo, 2003. In vitro effect of leptin on somatolactin release in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): dependence on the reproductive status and interaction with NPY and GnRH. *Gen. Comp. Endocrinol.* 132, 284-292.

- J. Pérez-Sánchez, J.A. Calduch-Giner, M. Mingarro, S. Vega-Rubín de Celis, **P. Gómez-Requeni**, A. Saera-Vila, A. Astola, M.M. Valdivia, 2002. Overview of fish growth hormone family. New insights in genomic organization and heterogeneity of growth hormone receptors. *Fish Physiol. Biochem.* 27, 243-258. Publicación especial “Fish Growth and Metabolism. Experimental, Nutritional and Hormonal Regulation”. Plisetskaya, E.M. (Ed.) (publicado en el 2004).
- S. Vega-Rubín de Celis, P. Rojas, **P. Gómez-Requeni**, A. Albalat, J. Gutiérrez, F. Médale, S.J. Kaushik, I. Navarro, J. Pérez-Sánchez, 2004. Nutritional assessment of somatolactin function in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): Concurrent changes in somatotropic axis and pancreatic hormones. *Comp. Biochem. Physiol.* 138A, 533-542.
- A. Albalat, **P. Gómez-Requeni**, P. Rojas, F. Médale, S. Kaushik, G.J. Vianen, G. Van den Thillart, J. Gutiérrez, J. Pérez-Sánchez, I. Navarro, 2005. Nutritional and hormonal control of lipolysis in isolated gilthead sea bream (*Sparus aurata*) adipocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289, 259-265.
- A. Saera-Vila, J.A. Calduch-Giner, **P. Gómez-Requeni**, F. Médale, S. Kaushik, J. Pérez-Sánchez, 2005. Molecular characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) lipoprotein lipase. Transcriptional regulation by season and nutritional condition in liver and extrahepatic sites. *Comp. Biochem. Physiol.* 142B, 224-232.
- M. de Francesco, G. Parisi, J. Pérez-Sánchez, **P. Gómez-Requeni**, F. Médale, S.J. Kaushik, M. Mecatti, B.M. Poli, 2005. Effect of high level fish meal replacement by plant proteins in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on growth and body/fillets quality traits. *Aquacult. Nutr.* (aceptado).

Objetivos

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, los objetivos básicos de la presente Tesis Doctoral son:

- Optimizar el perfil aminoacídico de los piensos de engorde.
- Definir el nivel crítico de sustitución de harinas de pescado por proteínas de origen vegetal.
- Establecer la viabilidad de dicha sustitución tanto a corto como a largo plazo.
- Validar el uso de marcadores bioquímicos y moleculares como trazadores del estado nutricional de peces en cultivo.

Plan de trabajo

Los objetivos planteados se abordaron de manera secuencial en diferentes experiencias de engorde (**Fig. 2.1**), en las que se hizo especial hincapié en el estudio de la regulación nutricional y hormonal del crecimiento, y del metabolismo proteico y lipídico.

Engorde 1

Este engorde se llevó a cabo con juveniles de dorada (14-15 g) durante aproximadamente 12 semanas (abril-julio del 2001). El objetivo básico fue evaluar el efecto tanto del perfil aminoacídico de la dieta (músculo *vs.* organismo completo) como del cociente IAA/DAA* sobre el crecimiento y la conversión del alimento.

* IAA: aminoácidos esenciales, DAA: aminoácidos no esenciales.

Engorde 2

A partir de los resultados obtenidos en el engorde 1, y de otros equivalentes en trucha, se diseñaron nuevas dietas para evaluar los efectos de la sustitución de harinas de pescado por ingredientes vegetales, y así establecer el nivel óptimo de sustitución tanto en dorada (engorde 2a) como en trucha (engorde 2b).

La duración de estos engordes fue de aproximadamente 12 semanas en dorada (abril-julio del 2002) y de 11 semanas en trucha (marzo-junio del 2002).

Engorde 3

Como prolongación del engorde 2a, en el engorde 3 (abril-septiembre 2003) se evaluó el efecto de la sustitución proteica sobre el estado de inmunocompetencia, la arquitectura hepática y la integridad gastrointestinal de juveniles de dorada en cultivo.

Engorde 4

A partir de dietas seleccionadas en los engordes 2 y 3, en un cuarto y último engorde, se evaluó la viabilidad de la sustitución a lo largo de todo un ciclo de engorde (agosto 2002-julio 2003).

EXPERIENCIA	OBJETIVO			
		2001	2002	2003
ENGORDE 1	Perfil aminoacídico óptimo	XXXX		
ENGORDE 2b	Nivel crítico de sustitución a corto plazo (trucha)		XXX	
ENGORDE 2a	Nivel crítico de sustitución a corto plazo (dorada)		XXX	
ENGORDE 3	Histopatología e inmunocompetencia		XXXXXX	
ENGORDE 4	Viab. del nivel crítico de sustitución a largo plazo		XXXXX	XXXXXX

Tabla 2.1: Organigrama resumen del conjunto de experiencias desarrolladas en dorada (X) y trucha (X).



Material y Métodos

3.1. Condiciones de cultivo

Los juveniles de dorada utilizados en el engorde 1 procedieron de un stock atlántico (Tinamenor, Santander). Las doradas empleadas en los engordes 2a, 3 y 4 procedieron de un stock sud-atlántico (Cupimar, Cádiz).

Una vez en las instalaciones del IATS, y tras un periodo de aclimatación de aproximadamente 20 días, los animales fueron distribuidos al azar en tanques experimentales. El alimento fue distribuido 1 ó 2 veces al día en función de la edad y la época del año.

En los engordes 1 y 2, los juveniles de dorada (14-17 g) fueron distribuidos en 12 tanques de 500 litros a razón de 90 peces/tanque (**Fig. 3.1**). Las diferentes dietas experimentales fueron suministradas hasta saciedad visual (3 tanques/dieta). El flujo de agua fue aproximadamente de 20 l/min y el contenido en oxígeno disuelto no fue inferior al 80% de saturación. La temperatura y el fotoperiodo siguieron los cambios naturales (abril-julio) en nuestra latitud (40° 5'N, 0° 10'E).



Fig. 3.1: Tanques experimentales de 500 litros (IATS, Castellón).

En el engorde 3 se mantuvieron las mismas condiciones de cultivo que en los engordes 1 y 2, prolongándose el periodo experimental de abril a septiembre.

El engorde 4 se llevó a cabo a lo largo de todo un ciclo de engorde en tanques de 3000 litros, a razón de 120 peces/tanque (agosto-julio) (**Fig. 3.2**).



Fig. 3.2: Tanques experimentales de 3000 litros (IATS, Castellón).

En las instalaciones de cultivo del INRA-FREMER se llevaron a cabo las diferentes experiencias de engorde con juveniles de trucha arco iris. Estos engordes fueron equivalentes a los realizados en dorada, aunque en el marco de la presente Tesis Doctoral sólo nos centraremos en los resultados obtenidos en el engorde 2, que hemos denominado 2b para diferenciarlo del engorde 2a de dorada.

En este engorde, los juveniles de trucha arco iris (19 g) fueron distribuidos en tanques de 1000 litros (**Fig. 3.3**) a razón de 75 peces/tanque. La temperatura del agua durante el desarrollo de la experiencia osciló entre 16-18 °C.



Fig. 3.3: Tanques experimentales de 1000 litros (INRA-IFREMER, Donzacq, Landes, Francia).

3.2. Formulación y diseño de las dietas experimentales

3.2.1. Perfil aminoacídico

Las dietas empleadas en el engorde 1 de dorada fueron fabricadas a partir de harinas de pescado e ingredientes vegetales (gluten de trigo, guisantes extrusionados y soja) con un 33-35% de sustitución para establecer los diferentes perfiles aminoacídicos.

Las dietas M y WB imitaron el perfil de IAAs del músculo esquelético y del organismo completo, respectivamente (**Tabla 3.1**). En las dietas MGlu y WBGlu se aumentó el contenido de DAAs con la incorporación de ácido glutámico. De este modo, el cociente IAA/DAA varió entre 1,1 (dieta M) y 0,80 (dieta WBGlu).

Las cuatro dietas se formularon de manera que fueran isoproteicas, isolipídicas e isoenergéticas. El análisis de factores anti-nutricionales mostró la presencia de cantidades significativas de fitoestrógenos (genisteína y daidzeína) en la soja (presente en las dietas M y MGlu). El resto de materias primas de origen vegetal mostraron un potencial estrogénico despreciable.

Tabla 3.1: Ingredientes y composición química de las dietas utilizadas en el engorde 1 de dorada.

Ingrediente (g/kg)	M	MGlu	WB	WBGlu
CPSPG ¹	50	0	0	0
Harinas de pescado (CP 70%)	499,9	478,1	529,3	484,1
Gluten de trigo	0	0	100	100
Trigo entero extrusionado	0	56,1	147,9	138,5
Guisantes extrusionados (Aquatex)	199,1	0	100	100
Soja (CP 42%)	121,9	300	0	0
Aceite de pescado	83,6	94,5	89,2	94,3
Aglutinador	10	10	10	10
Complejo mineral ²	10	10	10	10
Complejo vitamínico ²	10	10	10	10
L-His	2,04	2,00	0	0
L-Lys	3,14	4,85	0	0
DL-Met	0,95	1,18	3,46	0
L-Thr	0,60	1,54	0	0
L-Ile	5,57	4,58	0	0
L-Val	3,07	2,61	0	0
L-Glu	0	24,58	0	53,09
<i>Composición aproximada</i>				
Materia seca (MS, %)	92,1	93,8	89,3	92,7
Proteína (% MS)	52,7	53,0	52,1	50,9
Grasa (% MS)	15,7	16,4	15,9	15,2
Energía (kJ/g MS)	22,5	22,5	22,5	22,4
IAA ³ (%)	25,8	26,4	26,1	22,5
DAA ⁴ (%)	22,8	25,6	26,3	27,9
IAA/DAA	1,13	1,03	0,99	0,80

¹ Concentrado de proteína soluble de pescado (Sopropêche, Boulogne sur Mer, Francia).

² Según NRC (1993).

³ Aminoácidos esenciales.

⁴ Aminoácidos no esenciales.

3.2.2. Fuente de proteína

Las dietas utilizadas en los engordes 2, 3 y 4 de dorada (**Tabla 3.2**) se basaron en harinas de pescado (dieta FM) e ingredientes vegetales (gluten de maíz y de trigo, semillas de colza, guisantes extrusionados y altramuz), que sustituyeron progresivamente las harinas de pescado en un 50% (dieta PP50), 75% (dieta PP75) y 100% (dieta PP100).

Para cubrir posibles deficiencias se añadieron cantidades crecientes de DAAs con el incremento del nivel de sustitución. Con ello se pretendió suplir los requerimientos nutricionales en aminoácidos (NRC, 1993), a la vez que imitar el perfil aminoacídico del músculo esquelético.

En estas dietas se obvió la presencia de soja, al objeto de evitar el posible enmascaramiento de los resultados por el elevado contenido en factores estrogénicos de algunos lotes de soja.

Tabla 3.2: Ingredientes y composición química de las dietas utilizadas en los engordes 2a, 3 y 4 de dorada.

Ingrediente (g/kg)	FM	PP50	PP75	PP100
Harinas de pescado (CP 70%)	703,7	352,0	176,0	0
Gluten de maíz	0	120,0	180,0	250,0
Gluten de trigo	0	120,0	180,0	250,0
Guisantes extrusionados (Aquatex)	0	60,0	90,0	120,0
Semilla de colza (Primor 00)	0	30,9	67,2	27,3
Altramuz dulce	0	0	0	6,9
Trigo entero extrusionado	142,0	94,9	30,6	15,5
Aceite de pescado	124,3	141,3	149,8	158,0
Aglutinador (Alginato de sodio)	10	10	10	10
Complejo mineral ¹	10	10	10	10
Complejo vitamínico ¹	10	10	10	10
CaHPO ₄ ·2H ₂ O (18%P)	0	6,5	30,7	51,1
L-Arg	0	7,6	11,3	15,9
L-His	0	2,3	3,4	4,8
L-Lys	0	15,9	23,6	32,5
DL-Met	0	2,5	3,6	5,4
L-Trp	0	1,4	2,2	2,9
L-Thr	0	5,0	7,4	10,4
L-Ile	0	4,2	6,2	8,4
L-Val	0	5,4	8,0	11,1
<i>Composición aproximada</i>				
Materia seca (MS, %)	93,7	94,3	91,9	90,1
Proteína (% MS)	46,1	47,5	44,8	42,8
Grasa (% MS)	16,5	16,6	17,2	16,8
Energía (kJ/g MS)	20,4	21,3	21,4	21,7
IAA ² (%)	50,3	51,9	53,4	53,1
DAA ³ (%)	47,6	44,6	47,0	49,6
IAA/DAA	1,06	1,16	1,14	1,07

¹ Según NRC (1993).

² Aminoácidos esenciales.

³ Aminoácidos no esenciales.

Al igual que en el engorde 2 de dorada (engorde 2a), las dietas formuladas para trucha (engorde 2b) (**Tabla 3.3**) se basaron en harinas de pescado e ingredientes vegetales (gluten de maíz y de trigo, semillas de colza, guisantes extrusionados y altramuz). Los porcentajes de sustitución de las harinas de pescado por ingredientes vegetales fueron los mismos que en el engorde 2a, aunque en este caso el contenido graso de las dietas fue ligeramente superior (19 vs. 16%).

Tabla 3.3: Ingredientes, composición química y coeficientes de digestibilidad aparentes (CDA) de las dietas utilizadas en el engorde 2b de trucha.

Ingrediente (g/kg)	FM	PP50	PP75	PP100
Harinas de pescado	637,9	319	159,5	0
Gluten de maíz	0	116	177,1	232,4
Gluten de trigo	0	100	150	200
Guisantes extrusionados (Aquatex)	0	80	120	163,3
Semilla de colza (Primor 00)	0	46,9	75	100
Trigo entero extrusionado	203,4	110,2	42,5	0
Aceite de pescado	128,6	143,6	151,1	158,7
Aglutinador (Alginato de sodio)	10	10	10	10
Complejo mineral ¹	10	10	10	10
Complejo vitamínico ¹	10	10	10	10
CaHPO ₄ ·2H ₂ O (18%P)	0	16,1	37,8	40
L-Arg	0	6,2	9,5	12,5
L-His	0	1,9	2,9	3,9
L-Lys	0	13,8	20,8	27,6
DL-Met	0	2	3,1	4,1
L-Trp	0	1,3	2,1	2,7
L-Thr	0	4,1	6,2	8,3
L-Ile	0	3,5	5,3	7,1
L-Val	0	4,7	7	9,4
<i>Composición aproximada</i>				
Materia seca (MS, %)	94,4	92,2	91,5	91,6
Proteína (% MS)	51,5	50,3	49,1	48,6
Grasa (% MS)	19,7	19,6	19,6	19,2
Energía (kJ/g MS)	22,7	23,5	23,9	23,6
IAA ² (% MS)	22,2	22,9	22,1	23,9
DAA ³ (% MS)	21,8	23,3	22,1	23,7
IAA/DAA	1	0,9	1	1
<i>Valores de CDA (%)</i>				
Materia seca	83,4	79,2	76,8	72
Proteína	93,4	93,7	93,9	93,6
Grasa	95,6	92,8	91,6	90,3
Almidón	99,2	80,7	75,5	56,2
Energía	92	87,8	86,4	82,7

¹ Según NRC (1993), ² Aminoácidos esenciales, ³ Aminoácidos no esenciales.

3.3. Muestras

3.3.1. Biomasa

Durante el desarrollo de los engordes, y tras una noche de ayuno, cada 3-4 semanas los animales fueron ligeramente anestesiados con 100 µg/ml de ácido 3-aminobenzoico etil éster (MS-222, Sigma) para ser contados y pesados colectivamente.

3.3.2. Composición corporal

Al principio y al final de cada experiencia, se sacrificaron y tomaron muestras de animales para determinar la composición corporal. De cada muestra se tomó una alícuota para determinar el contenido en agua. La fracción restante se liofilizó y almacenó a -20 °C hasta posteriores análisis de proteínas, lípidos y cenizas.

3.3.3. Sangre

La toma de muestras de sangre se llevó a cabo a las 6 y a las 24 horas después de una última toma de alimento. La extracción se realizó mediante punción caudal con jeringas heparinizadas. El plasma se obtuvo centrifugando la sangre a 3000 g (20 min, 4 °C) y se almacenó a -20 °C (ensayos de metabolitos plasmáticos y hormonales) o -80 °C (ensayos inmunológicos).

3.3.4. Tejidos

Las muestras de tejido se tomaron a las 6 y a las 24 horas post-ingesta, tras sacrificar a los animales de un golpe seco en la cabeza.

Las muestras de hígado, músculo esquelético y tejido adiposo se trataron directamente para ensayos enzimáticos o bien fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C hasta posteriores análisis bioquímicos y moleculares. Se tomaron muestras adicionales de hígado, intestino y riñón anterior para análisis inmunológicos e histopatológicos.

3.3.5. Excreción amoniaca

En los ensayos de excreción amoniaca, los animales (18 peces/tanque) se distribuyeron en tanques experimentales de 90 litros (3 tanques/dieta) (**Fig. 3.4**), con un flujo de agua de 3,5 l/min y una temperatura de 23-25 °C.

La recogida de muestras de agua (50 ml) se realizó durante 2 ciclos consecutivos de 22 horas, después de una única toma de alimento (10:00 h). La determinación del contenido total de amonio se llevó a cabo colorimétricamente por el método de Le Corre y Treguer (1976).



Fig. 3.4: Tanques experimentales de 90 litros (IATS, Castellón).

3.4. Análisis de composición corporal y aminoácidos tisulares

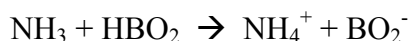
Los análisis de composición corporal se realizaron según la metodología aprobada por la AOAC (1990).

3.4.1. Determinación de nitrógeno (*Kjeldahl*)

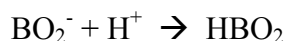
La mayor parte de los compuestos nitrogenados se descomponen en amoníaco al ser calentados en presencia de ácido sulfúrico. Dicho amoníaco se fija mediante ácido bórico en forma de ión amonio, y la posterior valoración del borato con ácido clorhídrico nos proporciona una medida de la cantidad de nitrógeno existente en la muestra. Este proceso consta de 3 etapas: digestión o mineralización, destilación y valoración.

Digestión: Se calienta la muestra (400 °C) durante 3 horas en presencia de ácido sulfúrico concentrado y un catalizador. A elevadas temperaturas, el carbono se oxida a dióxido de carbono gracias a la acción del ácido sulfúrico, que a su vez se reduce a dióxido de azufre. Dicho dióxido de azufre es un reductor muy potente capaz de reducir el nitrógeno a amoníaco.

Destilación: Se deja enfriar la muestra sometida a digestión e inmediatamente después se le añade un exceso de hidróxido sódico, recogándose el amoníaco desprendido mediante una espiral refrigerada cuya salida se encuentra sumergida en una disolución saturada de ácido bórico. Al ser un ácido extremadamente débil, todo el ión borato que existe en la disolución proviene de la reacción de este ácido con el amoníaco.



Valoración: El borato existente en la muestra se valora mediante una disolución patrón de ácido clorhídrico de normalidad conocida.



Para calcular el porcentaje de nitrógeno existente en la muestra se realizan los siguientes cálculos:

$$\%N = [1,4 \cdot N \cdot (V-V_0)] / P$$

N: normalidad conocida de la solución de ácido clorhídrico.

V: volumen (ml) de ácido clorhídrico consumido en la valoración de la muestra.

V₀: volumen (ml) de ácido clorhídrico consumido en la valoración del blanco.

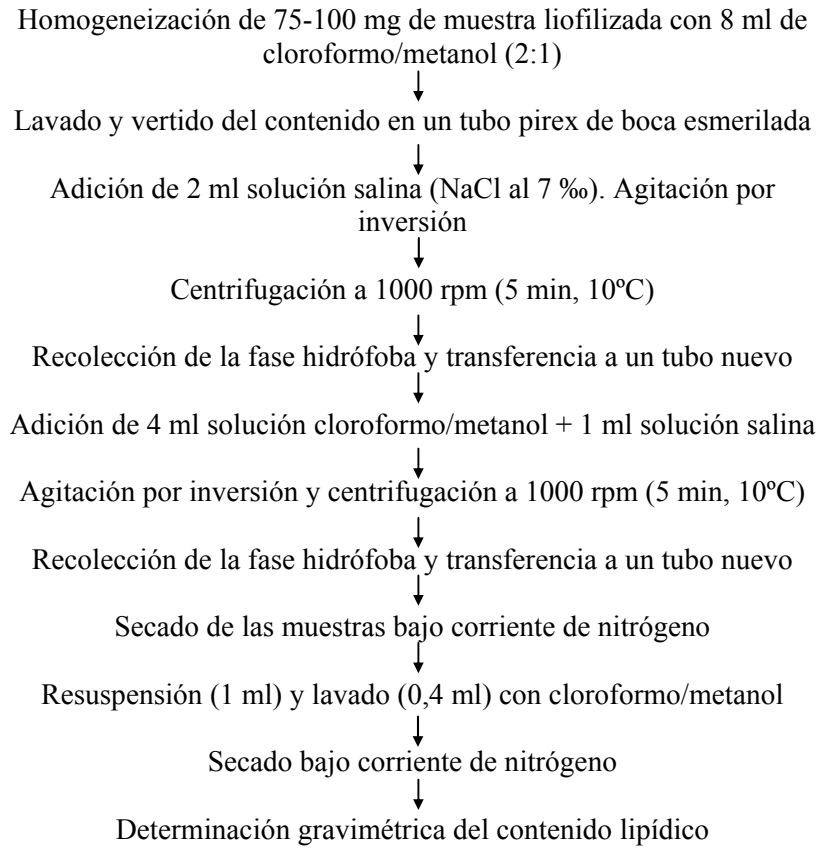
P: peso (g) de la muestra.

Finalmente, la estimación del contenido proteico de la muestra se determinó mediante la aplicación de un factor de corrección:

$$\%Proteína = 6,25 \cdot \%N$$

3.4.2. Extracción y determinación de lípidos totales (Folch)

La extracción y determinación de lípidos en muestras tisulares y de pienso se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo:



3.4.3. Cuantificación de cenizas:

El contenido de cenizas se determinó por gravimetría tras la combustión de las muestras a 600 °C durante 2 horas.

3.4.4. Aminoácidos tisulares

Los aminoácidos libres del músculo esquelético se determinaron según el protocolo desarrollado por Lyndon y cols. (1993) y validado por Mente y cols. (2002).

- Homogeneización de 200 mg de muestra en 5 ml de etanol absoluto en presencia de norleucina 0,1 M (como estándar interno).
- Centrifugación del homogeneizado a 6000 g (10 min).
- Secado por vacío de 100 µl del sobrenadante y resuspensión en 200 µl de HCl 0,1 M.
- Filtración a través de filtro de 10 kDa y toma de una alícuota de 10 µl para su análisis, empleando un analizador automático de aminoácidos (Applied Biosystems 420H Amino Acid Analyser).

Como resultado de uno de estos análisis, se obtuvo el cromatograma que se muestra en la **Fig. 3.5**. En dicho cromatograma se representa la absorbancia (región ultravioleta) frente al tiempo de retención.

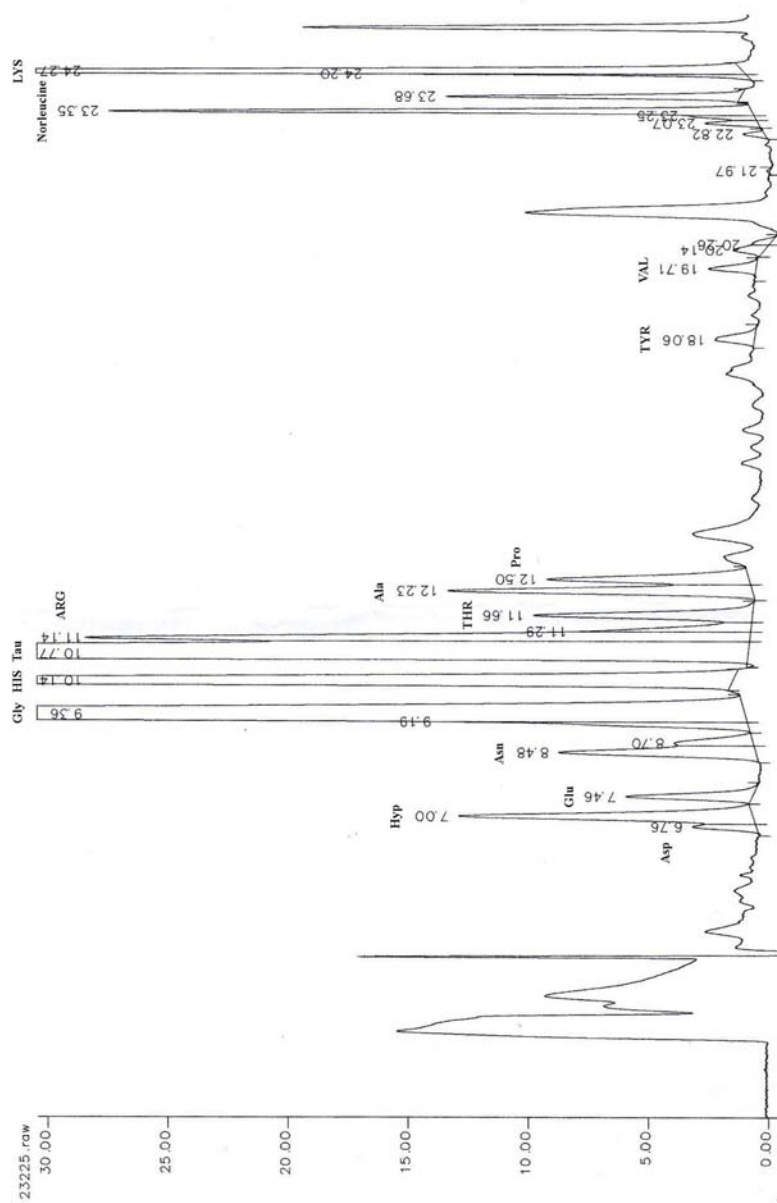


Fig. 3.5: Cromatograma de aminoácidos libres del músculo esquelético de doradas alimentadas con la dieta FM (engorde 2a).

3.5. Actividades enzimáticas

De forma generalizada, el cálculo de actividades enzimáticas se realizó en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad (UI}^*/\text{ml)} = (\Delta A \cdot V \cdot 1000) / (\Delta t \cdot \epsilon \cdot d \cdot v)$$

ΔA : variación en las medidas de absorbancia.

V : volumen de la mezcla de ensayo (ml).

Δt : tiempo de medida (min).

ϵ : coef. de absorción milimolar del cromóforo.

d : anchura de la cubeta (mm).

v : volumen de muestra utilizada en el ensayo (ml).

En el caso de la enzima *ácido graso sintasa* (FAS), su actividad se calculó según el método isotópico desarrollado por Hsu y cols. (1969):

$$C = (\text{DPM} \cdot N) / (Y \cdot R_s)$$

C : número de moles de substrato radiactivo incorporado.

DPM : desintegraciones por minuto de la muestra.

N : número de moles de ^{14}C -acetilCoA utilizados en el ensayo.

Y : rendimiento del contaje.

R_s : radiactividad específica de ^{14}C -acetilCoA.

$$\text{Actividad (UI/ml)} = (C \cdot v \cdot 100) / (\Delta t \cdot f \cdot V)$$

v : volumen de muestra utilizada en el ensayo (ml).

Δt : tiempo de medida (min).

f : factor de dilución.

V : volumen de la mezcla de ensayo (ml).

* UI: Unidades Internacionales.

En todos los ensayos enzimáticos, la cantidad de proteína soluble presente en el homogeneizado tisular se determinó por el *Método de Bradford* (1976), utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

3.5.1. Catabolismo aminoacídico

Los extractos de hígado para determinar la actividad de los enzimas responsables del catabolismo aminoacídico se obtuvieron tras la homogeneización en tampón (30 mM Hepes, 0,25 mM sacarosa, 50 mM EDTA*, 5 mM K₂HPO₄, 1 mM ditioneitol; pH 7,2) de los tejidos congelados a -80 °C.

La actividad de la *alanina aminotransferasa* (ALAT) y de la *aspartato aminotransferasa* (ASAT) se midió con kits comerciales (Enzyline, Biomerieux, Marcy l'Etoile, Francia) en sobrenadantes de la suspensión tisular obtenidos tras la centrifugación a 10000 g (20 min, 4 °C).

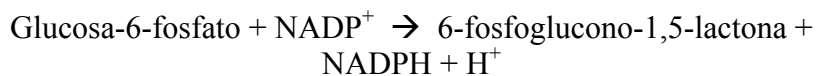
En el caso de la *glutamato deshidrogenasa* (GDH), los sobrenadantes fueron tratados previamente con ultrasonidos (100 W, 1 min) para romper las membranas mitocondriales. Tras centrifugar a 15000 g (10 min, 4 °C), se midió la actividad enzimática siguiendo la formación de NADH durante 10 min después de añadir ácido L-glutámico a la mezcla de reacción (175 mM Tris-HCl, 100 mM semi-carbacina, 1,1 mM NAD, 1 mM ADP, 5 mM L-leucina; pH 8,5).

* Acido etilendiamino tetraacético.

3.5.2. Enzimas lipogénicos

Los ensayos de enzimas lipogénicos se realizaron tras la homogeneización en tampón (20 mM Tris-HCl, 250 mM sucrosa, 2 mM EDTA, 100 mM NaF, 0,5 mM fluoruro de fenilmetilsulfonil, 10 mM β -mercaptoetanol; pH 7,4) y posterior centrifugación a 15000 g (10 min, 4 °C) de los extractos hepáticos.

La actividad de la *glucosa-6-fosfato deshidrogenasa* (G6PD) se midió por espectrofotometría a 340 nm, según Bautista y cols. (1988), determinándose la tasa de reducción del NADP^+ (en presencia de enzima y Mn^{2+}) de acuerdo con la reacción siguiente:



La determinación de la actividad del *enzima málico* (ME) se basó en la siguiente reacción:



La tasa de reducción del NADP^+ (en presencia de enzima, Mn^{2+} y un exceso de L-malato) es proporcional a la concentración de enzima. La formación de NADPH es seguida espectrofotométricamente a una longitud de onda de 340 nm (Ochoa, 1955).

El cálculo de la actividad de la enzima *ácido graso sintasa* (FAS) se basó en la siguiente reacción:



3.5.3. Enzimas glucolíticos

Los extractos de hígado para la determinación de la actividad de la *glucoquinasa* (GK) se obtuvieron tras homogeneizar en tampón Tris (80 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM benzamidina, 1 mM fluoruro de 4-(2-aminoetil)sulfonilbenceno; pH 7,6) las muestras de tejido previamente congeladas a -80°C.

Una vez centrifugados los homogeneizados a 900 g (10 min), la actividad enzimática se midió acoplado la formación de ribulosa-5-fosfato (a partir de glucosa-6-fosfato) a la reducción del NADP⁺, empleando G6PD y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Panserat y cols., 2000a).

3.5.4. Enzimas gluconeogénicos

Para medir la actividad de la *glucosa-6-fosfatasa* (G6Pasa), los microsomas hepáticos fueron aislados y suspendidos en tampón fosfato (100 mM NaH₂PO₄, 25 mM Na₂HPO₄, 2 mM EDTA, 1 mM DTT^{*}; pH 7) según Panserat y cols. (2000b).

La actividad enzimática se midió a partir de la producción de NADH en presencia de un exceso de glucosa deshidrogenasa (Alegre y cols., 1988).

* Ditioneitol.

3.6. Metabolitos plasmáticos

3.6.1. Glucosa

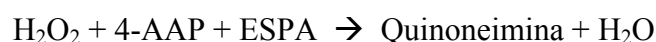
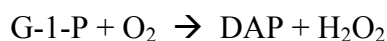
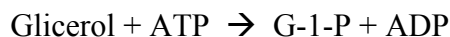
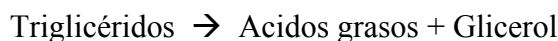
La concentración de glucosa en plasma se midió mediante espectrofotometría según Trinder (1969), empleando para ello un kit comercial (Sigma 315-100). Las reacciones enzimáticas implicadas en este ensayo son las siguientes:



La quinoneimina es un cromóforo que muestra absorbancia a 505 nm y la intensidad de color producida es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.

3.6.2. Triglicéridos

Los niveles de triglicéridos (TG) plasmáticos fueron determinados mediante espectrofotometría, según McGowan y cols. (1983), con un kit comercial (GPO-Trinder, Sigma 337-B). El ensayo está basado en las siguientes reacciones:



El aumento en absorbancia (a 540 nm) de la quinoneimina es directamente proporcional a la concentración de TG y glicerol libre en la muestra. Este último es despreciable con respecto al total valorado.

3.6.3. Colesterol

Los niveles plasmáticos de colesterol fueron medidos espectrofotométricamente según Roeschlau y cols. (1974), empleando un kit comercial (Sigma 401-25P). La serie de reacciones implicadas en este ensayo es la siguiente:

Esteres de colesterol → Colesterol + Acidos grasos

Colesterol + O₂ → Colest-4-en-3-ona + H₂O₂

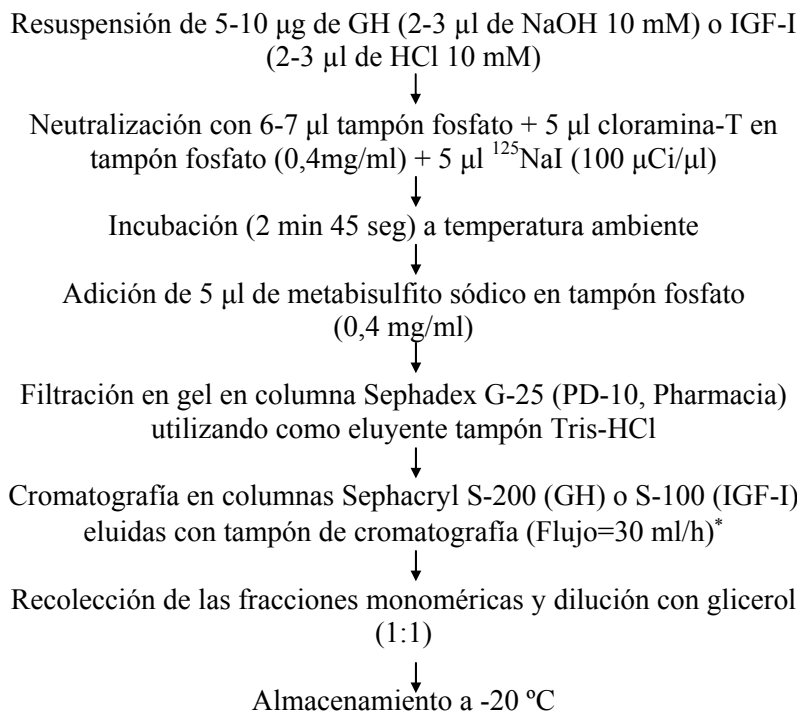
2H₂O₂ + HBA + 4AAP → Quinoneimina + 4H₂O

La quinoneimina es cuantificada a 500-550 nm, siendo directamente proporcional a la cantidad de colesterol existente en la muestra.

3.7. Bioquímica de hormonas, receptores y proteínas de transporte

3.7.1. Radioyodación

La radioyodación de la hormona de crecimiento (GH) y de la somatomedina (IGF-I) se llevó a cabo según el *Método de la Cloramina-T* (Greenwood y cols., 1963).



Tampón fosfato 0,3 M: NaH₂PO₄ 0,15 M, Na₂HPO₄ 0,15 M, ClNa al 1% (pH = 7,2).

Tampón Tris-HCl: Tris-HCl 20 mM, NaN₃ al 0,05%, BSA al 1% (pH = 7,2).

Tampón de cromatografía: Tris-HCl 20 mM, ClNa 0,15 M, NaN₃ 0,02%, BSA al 0,3% (pH = 7,5).

* Las columnas de Sephacryl se calibran previamente con un estándar de BioRad: γ -globulina bovina (158 kDa), ovoalbúmina de pollo (44 kDa), mioglobina de caballo (17 kDa) y vitamina B₁₂ (1,35 kDa).

3.7.2. Radioinmunoensayos

Los ensayos de GH e IGF-I de dorada y trucha se realizaron mediante radioinmunoensayos (RIA) de doble anticuerpo en condiciones de desequilibrio (**Fig. 3.6**).

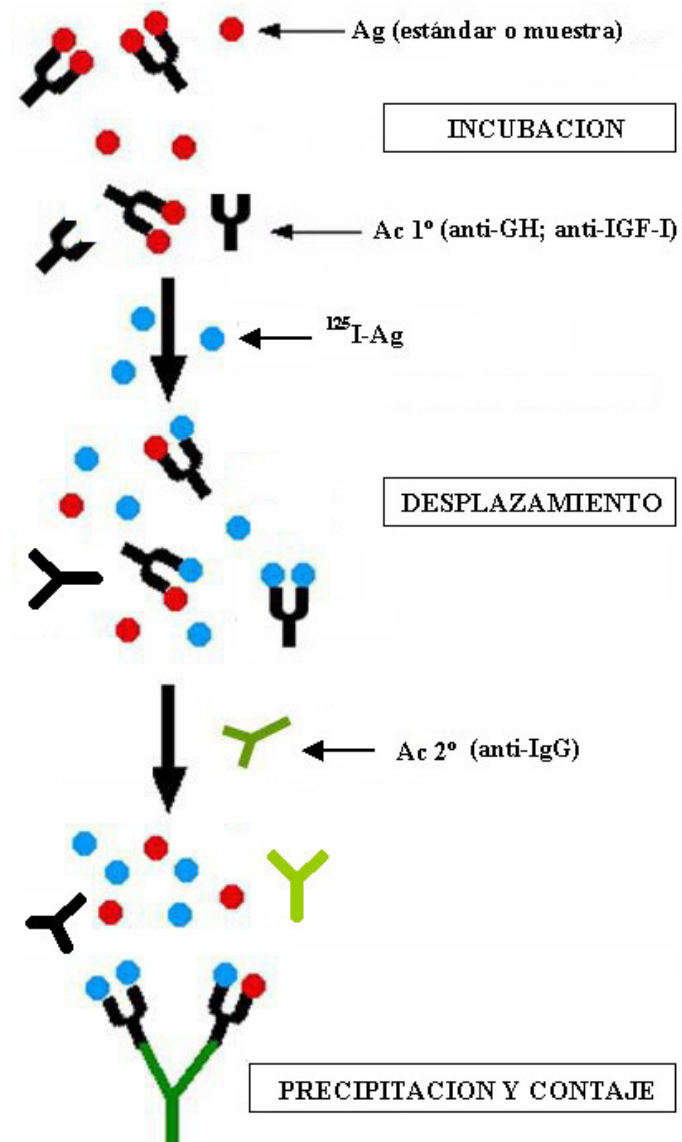
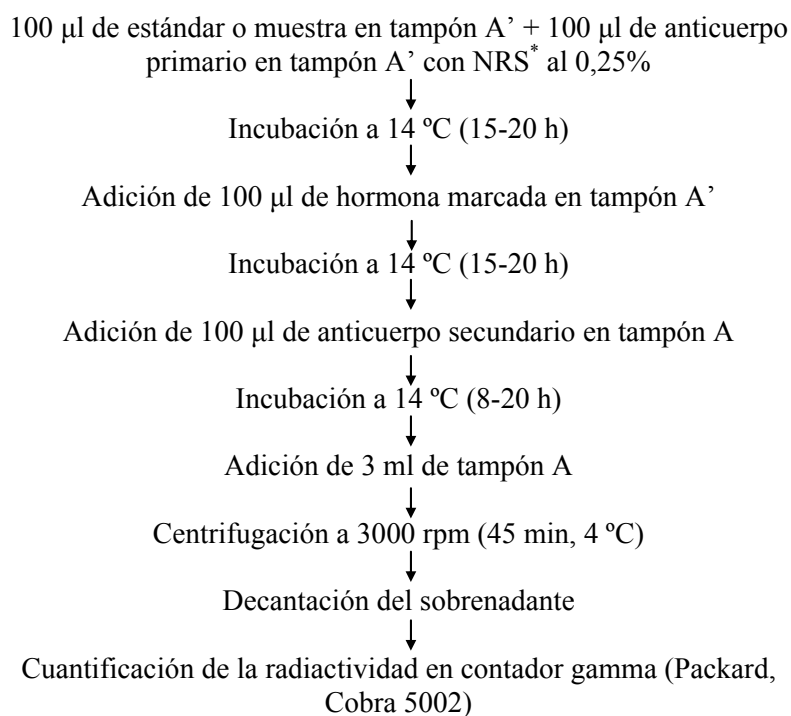


Fig. 3.6: Representación esquemática de los RIAs.

En todos los RIAs se emplearon péptidos recombinantes como trazadores y estándares. El anticuerpo primario fue específico para cada ensayo, mientras que como anticuerpo secundario se empleó de forma genérica IgG de cabra anti-conejo (Biogenesis, Poole, Reino Unido):



Tampón A: Tris-HCl 50 mM, MgCl₂·(6 H₂O) 10 mM, NaN₃ al 0,05% (pH = 7.5).

Tampón A': Tris-HCl 50 mM, MgCl₂·(6 H₂O) 10 mM, NaN₃ al 0,05%, Tritón X-100 al 0,1%, BSA al 1% (pH = 7,5).

* Suero pre-inmune de conejo.

Las **Tablas 3.4** y **3.5** muestran de forma esquemática los protocolos utilizados en los RIAs de GH e IGF-I de dorada y trucha.

Tabla 3.4: Representación esquemática (I) de los RIAs de GH e IGF-I.

	Total	Blanco	B ₀	Estándar	Muestra
Tampón A'	-	200 µl	100 µl	-	75 µl
GH o IGF-I	-	-	-	100 µl	-
Muestra	-	-	-	-	25 µl
Anticuerpo 1°	-	-	100 µl	100 µl	100 µl
(¹²⁵ I)-GH o IGF-I	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Anticuerpo 2°	-	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Volumen total	100 µl	400 µl	400 µl	400 µl	400 µl

Tabla 3.5: Representación esquemática (II) de los RIAs de GH e IGF-I.

	GH		IGF-I	
	<i>Dorada</i>	<i>Trucha</i>	<i>Dorada</i>	<i>Trucha</i>
Trazador (cpm/100 µl)	12000	10000	15000	15000
Anticuerpo primario	1:4000	1:25000	1:8000	1:16000
IgG	1:20	1:20	1:20	1:20
ED₅₀ (ng/ml)	1,8	0,6	0,7-0,8	0,8
Sensibilidad (ng/ml)	0,15	0,05	0,05	0,05

3.7.2.1. RIA de GH

Dorada

Como trazador y estándar se utilizó proteína recombinante de dorada (Martínez-Barberá y cols., 1994). Esta forma recombinante se obtuvo de acuerdo con los protocolos desarrollados en colaboración con el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Cádiz (Martínez-Barberá y cols., 1995) (**Fig. 3.7**).

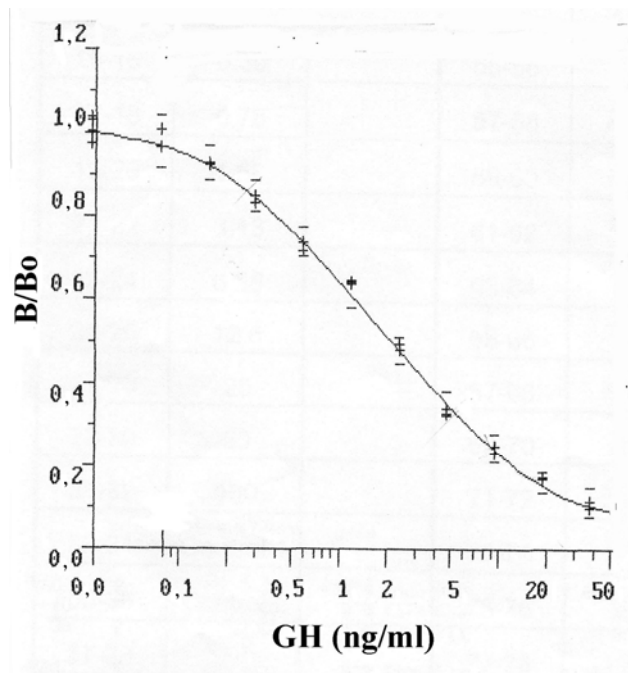


Fig. 3.7: Curva de desplazamiento de GH recombinante de dorada.

Como anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo policlonal (**Fig. 3.8**), obtenido en conejo contra la GH recombinante de dorada (Martínez-Barberá y cols., 1995).

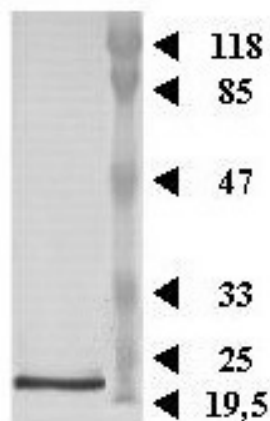


Fig. 3.8: *Western-blot* de extracto hipofisario de dorada (condiciones reductoras) con suero anti-GH de dorada (1:10000).

La sensibilidad del RIA de GH de dorada fue de 0,15 ng/ml y la ED₅₀ de 1,8 ng/ml.

Trucha

Como trazador y estándar se empleó proteína recombinante de trucha (Eurogentec, Liège, Bélgica). Como anticuerpo primario se utilizó suero de conejo anti-GH de salmón (GroPep, Adelaide, Australia; Ref. 5PAN1) (**Fig. 3.9**).

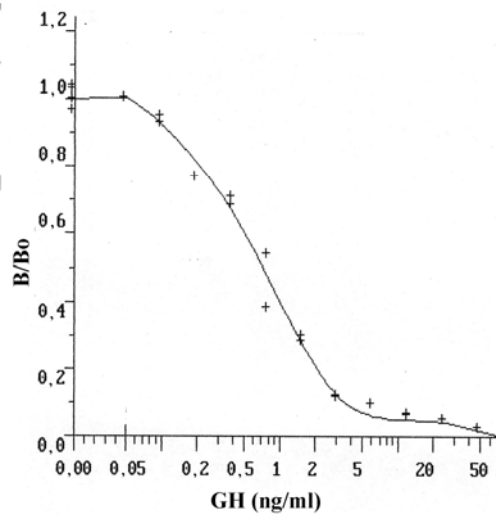
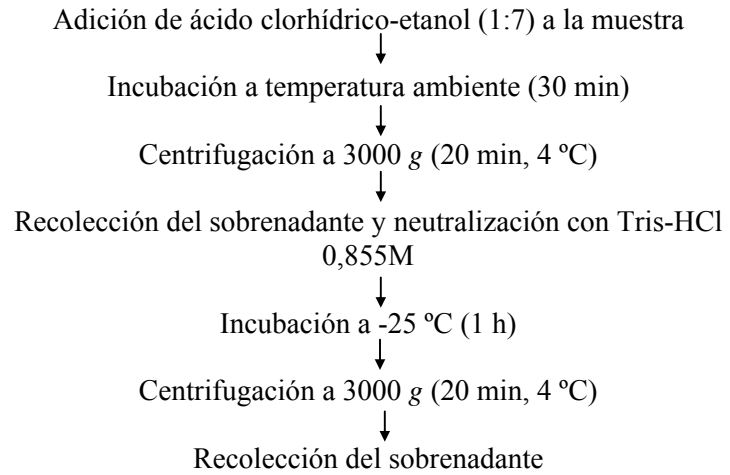


Fig. 3.9: Curva de desplazamiento de GH recombinante de trucha.

La sensibilidad de este ensayo fue de 0,05 ng/ml y la ED₅₀ de 0,6 ng/ml.

3.7.2.2. RIA de IGF-I

Como paso previo a la realización de los RIAs de IGF-I se realizó una *extracción por crioprecipitación de las IGFbps** (Shimizu y cols., 2000).



* Proteínas de transporte de IGFs.

Dorada

Como trazador y estándar se utilizó la forma recombinante de pagro (*Pagrus major*; GroPep, Ref. 5PAF-AGU100), con 100% de similitud aminoacídica con la IGF-I de dorada (**Fig. 3.10**). Como anticuerpo primario se empleó suero de conejo anti-IGF-I de barramundi (*Lates calcarifer*; GroPep, Ref. 5PAF1). La reacción cruzada de este anticuerpo con la IGF-I recombinante de dorada (Fine y cols., 1997), pagro (GroPep) y barramundi es del 100% (Vega-Rubín de Celis y cols., 2004).

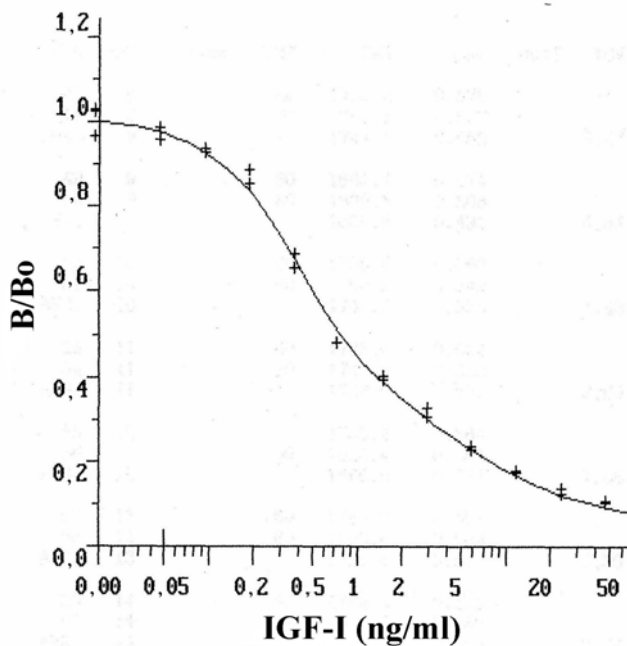


Fig. 3.10: Curva de desplazamiento de IGF-I recombinante de pagro.

La sensibilidad del ensayo fue de 0,05 ng/ml y la ED₅₀ de 0,7-0,8 ng/ml.

Trucha

Como trazador y estándar se empleó IGF-I recombinante de trucha (GroPep, Ref. 5PAF1-WU100). Como anticuerpo primario se empleó suero de conejo anti-IGF-I de trucha (GroPep, Ref. 5PAF1-WU100) (**Fig. 3.11**).

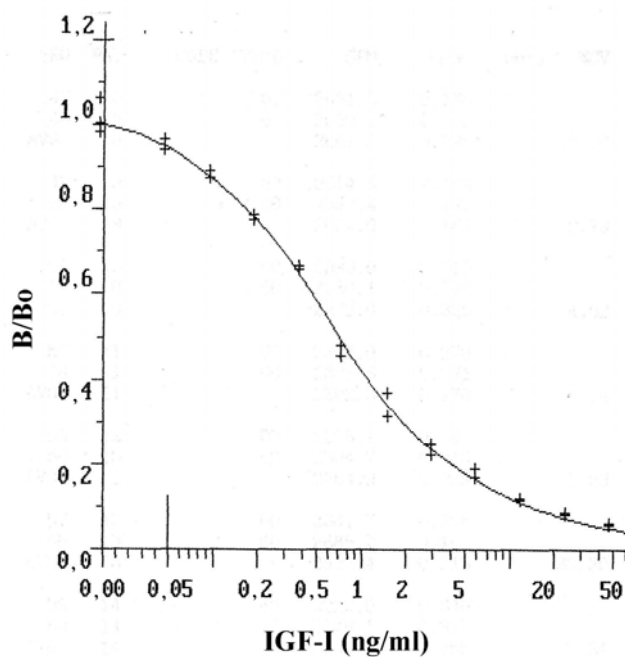
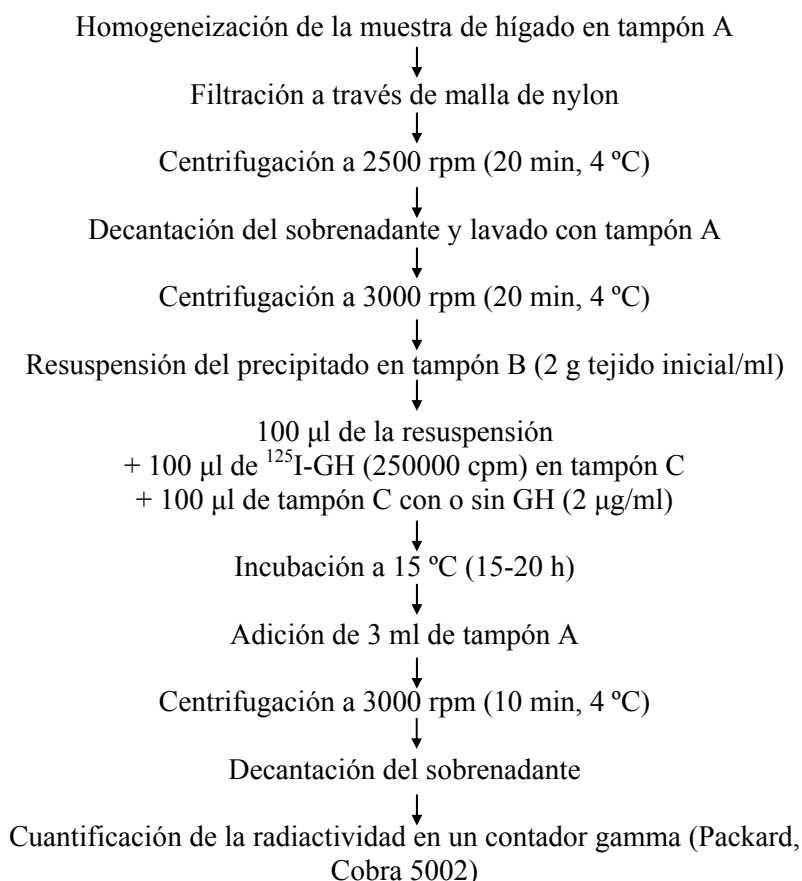


Fig. 3.11: Curva de desplazamiento de IGF-I recombinante de trucha.

La sensibilidad del ensayo fue de 0,05 ng/ml y la ED₅₀ de 0,8 ng/ml.

3.7.3. Ensayo de radiorreceptores de GH

Este ensayo se realizó para determinar la capacidad de unión específica de la GH a preparaciones de membranas hepáticas, utilizando como trazador ^{125}I -GH de dorada (Pérez-Sánchez y cols., 1994) o de trucha (Yao y cols., 1991) en ensayos homólogos.



La capacidad de unión total se determinó en base a la cantidad de radiactividad precipitada en ausencia de un exceso de hormona no marcada (2 µg/ml).

La capacidad de unión no específica se determinó en base a la radiactividad precipitada en presencia de hormona no marcada.

La capacidad de unión específica se determinó en base a la diferencia entre unión total e inespecífica.

La cantidad de membranas hepáticas en los tubos de reacción se estimó en base a la cantidad de proteína detectada por el *método de Bradford*.

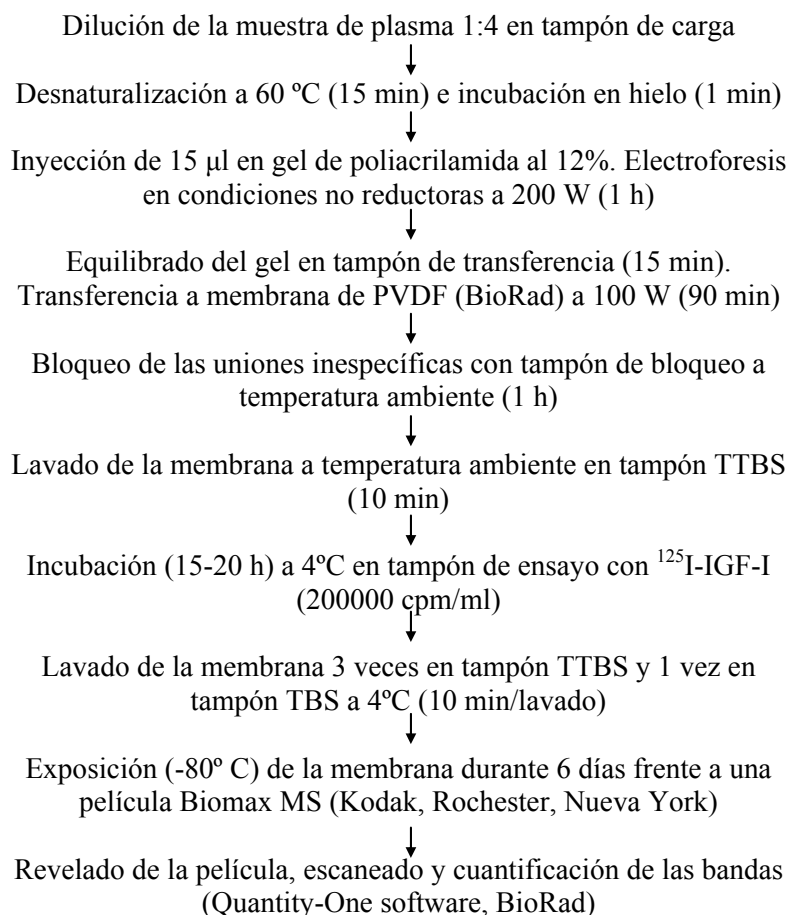
Tampón A: Tris-HCl 20 mM, MgCl₂·(6 H₂O) 5 mM, NaN₃ al 0,1% (pH = 7,5).

Tampón B: Tris-HCl 20 mM, MgCl₂·(6 H₂O) 5 mM, NaN₃ al 0,1%, inhibidor de tripsina (0,25 mg/ml), ácido ascórbico 0,5 mM (pH = 7,5).

Tampón C: Tris-HCL 20 mM, MgCl₂·(6 H₂O) 5 mM, NaN₃ al 0,1%, inhibidor de tripsina (0,25 mg/ml), ácido ascórbico 0,5 mM, BSA al 0,75 % (pH = 7,5).

3.7.4. *Western blot* (IGFBPs)

La actividad de las IGFBPs se determinó mediante *Western blot*, utilizando ^{125}I -IGF-I de pez en un sistema homólogo.



Tampón de carga: glicerol al 10%, Tris-OH al 12,5%, SDS al 2%, azul de bromofenol al 0,05%.

Tampón de transferencia: Tris-OH 25 mM, glicina 192 mM, CH₃OH al 20% (pH=8,1-8,5).

Tampón TBS: Tris-OH 20 mM, NaCl 500 mM, NaN₃ al 0,05% (pH = 7,5).

Tampón TTBS: Tween-20 al 0,1% en TBS (pH = 7,5).

Tampón de bloqueo: leche desnatada en polvo al 5% en TBS.

Tampón de ensayo: BSA al 1% en TTBS.

3.8. Expresión génica (GHR e IGFs)

La medida de la expresión génica en hígado, músculo esquelético y tejido adiposo del receptor de GH (GHR) y de las IGFs, tanto de trucha como de dorada, se llevó a cabo mediante PCR en tiempo real. Para ello, se utilizaron cebadores específicos (**Tabla 3.6**) en base a la metodología desarrollada para el GHR de dorada (Calduch-Giner y cols., 2003).

3.8.1. Extracción de ARN

El ARN hepático total se extrajo según el *método del fenol-cloroformo-tiocianato de guanidinio* (Chomczynski y Sacchi, 1987). La pureza y cantidad del ARN extraído se determinaron mediante lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm. El cociente entre ambas lecturas fue siempre superior a 1,9. La integridad del ARN se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa-formaldehído en condiciones desnaturalizantes.

3.8.2. PCR en tiempo real

El SYBR Green I es un fluoróforo que, unido al ADN de doble cadena, emite luz por excitación, permitiendo de este modo valorar en cada ciclo la cantidad de ADN amplificado.

Partiendo de un stock de estándares (plásmidos o productos de PCR) se hicieron diluciones seriadas $\times 10$ de modo que el rango de estándares en la placa fuera de 10^7 - 10^2 copias/pocillo. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 μ l, empleándose IQTM SYBR Green Supermix (BioRad) y cebadores específicos (0,9 μ M) (**Tabla 3.6**).

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

- 95°C durante 3 minutos.
- 40 ciclos con: 94°C durante 15 segundos.
60°C durante 1 minuto.

Tabla 3.6: Secuencias de los cebadores utilizados para determinar la expresión génica de GHR e IGFs en dorada y trucha.

Cebadores	
DORADA	
GHR	5'-ACG TGT CAG CCA CCA CAT GA (sentido)
	5'-TCG TGC AGA TCT GGG TCG TA (anti-sentido)
IGF-I	5'-TGT CTA GCG CTC TTT CCT TTC A (sentido)
	5'-AGA GGG TGT GGC TAC AGG AGA TAC (anti-sentido)
β-Actina	5'-TCC TGC GGA ATC CAT GAG A (sentido)
	5'-GAC GTC GCA CTT CAT GAT GCT (anti-sentido)
TRUCHA	
GHR	5'-CGA TAC CTT GTG CTT CGA ATT G (sentido)
	5'-TGA TGT TCA GCA GCG TCC AA (anti-sentido)
IGF-I	5'-GCG ATG TGC TGT GTC TCC TG (sentido)
	5'-AGC CTC TCT CTC CAC ACA CAA AC (anti-sentido)
IGF-II	5'-TAC CAC TCA GTT TGT CAC ACC T (sentido)
	5'-CCG AAG CCA CTT CAA CAA TGT A (anti-sentido)
β-Actina	5'-GAT GGG CCA GAA AGA CAG CTA (sentido)
	5'-TCG TCC CAG TTG GTG ACG AT (anti-sentido)

La especificidad de los productos amplificados se determinó mediante secuenciación y análisis de las curvas de fusión.

Curvas de fusión:

- 95 °C durante 1 minuto.
- 55 °C durante 1 minuto.
- 80 ciclos de 10 segundos, aumentando la temperatura 0,5 °C/ciclo.

3.9. Inmuno-histopatología

3.9.1. Cortes histológicos

La existencia de posibles daños histopatológicos se estudió en hígado e intestino distal. Las muestras de tejido se fijaron con formol neutro tamponado al 10%. A continuación, se incluyeron en resina Technovit-7100 (Kulzer, Heraeus, Alemania), y se tiñeron con azul de toluidina o hematoxilina-eosina en cortes de 1-3 μm .

3.9.2. Ensayos inmunológicos

3.9.2.1. Lisozima

La lisozima plasmática se midió mediante un ensayo turbidimétrico (Ellis, 1990) adaptado a placas de 96 pocillos. Como sustrato se empleó *Micrococcus lysodeikticus* (0,3 mg/ml) (Sigma) en tampón sodio-fosfato 0,05 M (pH = 6,2). Las muestras de plasma fueron analizadas por triplicado al añadir 10 μl (1:2) a 200 μl de la suspensión bacteriana. La absorbancia se midió a 450 nm después de 0,5 y 4,5 minutos.

Una unidad de actividad lisozima se definió como la cantidad de enzima que provocó un descenso en la absorbancia de 0,001 por minuto.

3.9.2.2. Complemento

La lisis por la ruta alternativa del complemento se determinó según Sitjà-Bobadilla y cols. (2003), con algunas modificaciones. Eritrocitos de oveja (SRBC), obtenidos de sangre de oveja desfibrinada (Biomedics, España), fueron utilizados a una concentración final de $2,5 \times 10^8$ células/ml. Las muestras de plasma, diluidas en HBSS-EGTA, se analizaron por triplicado (100 μl) al añadir 25 μl de SRBC a placas de 96 pocillos. Estas placas se incubaron (100 min, 20 °C) en agitación constante y, posteriormente, se centrifugaron a 1250 g (5 min,

4°C) para precipitar los SRBC restantes. La absorbancia del sobrenadante se leyó a 415 nm.

El valor Y (porcentaje de SRBC lisado en cada dilución) se definió como en Sunyer y Tort (1995). El factor de dilución del plasma, X , se representó de forma logarítmica frente a Y , empleando la ecuación de Von Krogh como $\log X$ frente a $\log Y/(1-Y)$. La dilución correspondiente al 50% hemolisis/ml se expresó como ACH_{50} .

HBSS-EGTA: Hank's Balanced Salt Solution (solución salina equilibrada de Hank), Mg^{2+} 10 nM, EGTA* 10 mM (pH = 7,6).

3.9.2.3. Mieloperoxidasa

La actividad mieloperoxidasa (MPO), tanto en plasma como en leucocitos aislados de riñón anterior, se midió siguiendo el procedimiento descrito por Quade y Roth (1997), adaptado para la dorada por Cuesta y cols. (2002).

Las muestras (15 μ l), diluidas en 135 μ l de HBSS-plus, se analizaron al añadir 50 μ l de TMB[†] (BioRad) a placas de fondo plano de 96 pocillos. La reacción se paró con 25 μ l de H₂SO₄ 1N después de una incubación de 2 min, leyéndose la densidad óptica a 450 nm. Los pocillos sin plasma se consideraron como blancos.

Las suspensiones de leucocitos de riñón anterior se obtuvieron como en Caldach-Giner y cols. (1997), con algunas modificaciones. Brevemente, después de la segunda sedimentación, el precipitado enriquecido en granulocitos (posiblemente eosinófilos) se ajustó a 20×10^6 células/ml en HBSS-plus. La actividad MPO se determinó tras incubar 25 μ l de la suspensión de leucocitos con 125 μ l del detergente CTAB[‡]

* Acido etilenglicol-bis amino tetraacético.

† 3,3',5,5'-tetrametil bencidina.

‡ Bromuro de cetiltrimetil amonio.

(0,02% en agua). Después de la incubación (15 min, 22 °C) se añadió TMB (diluido 1:4) y H₂SO₄ 1N. Tras centrifugar las placas a 400 g (10 min), 150 µl de los sobrenadantes se transfirieron a nuevas placas de 96 pocillos, procediéndose a su lectura. Los pocillos sin células se consideraron como blancos.

HBSS-plus: HBSS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺, NaCl 0,1%, mezcla antimicótica/antibiótica (penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml, anfotericina B 0,25 µg/ml) (pH = 7,2).

3.9.2.4. Estallido respiratorio

Las preparaciones de leucocitos de riñón anterior enriquecidos con fagocitos se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por Muñoz y cols. (1998). El número de células se ajustó a una concentración final de 20×10^6 células/ml en medio L-15 (medio Leibovitz enriquecido con NaCl 0,1%; BioWhittaker), añadiéndose un volumen de 50 µl/pocillo a placas de 96 pocillos. La producción de anión superóxido se midió según el método del NBT^{*}, adaptado por Muñoz y cols. (2000).

Brevemente, las células fueron incubadas con 50 µl de solución NBT (2 mg/ml, Sigma) o con 50 µl de solución NBT más PMA[†] (2 µg/ml, Sigma) en una cámara húmeda (1 h, 22-24 °C). La reacción se paró fijando las células en metanol. Después de lavar 2 veces con metanol al 70%, los pocillos se dejaron secar al aire, disolviéndose el formazan insoluble mediante la adición de 120 µl de KOH 2 M y 140 µl de dimetil sulfóxido (Sigma). La absorbancia se midió a 620 nm.

* Azul de nitro-tetrazolio.

† Acetato de forbol miristato.

3.10. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de la ingesta de alimento, del crecimiento y de la composición corporal, los valores medios de cada tanque se consideraron como una única unidad experimental. Para el resto de variables, la unidad experimental fueron los datos derivados de cada individuo.

Los datos fueron analizados mediante análisis de la varianza de una vía o dos vías, seguidos del test de Student-Newman-Keuls o del método de Dunn a un nivel de significación de $P < 0,05$. El análisis de una vía se realizó cuando se evaluó únicamente el efecto de la dieta; mientras que el de dos vías se aplicó cuando, además de la dieta, también se consideró el efecto del tiempo de muestreo después de la ingesta.

Para los análisis de correlación se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete informático Sigma Stat (SPSS Inc., IL).



Resultados y Discusión

4.1

Optimización del perfil aminoacídico de la dieta en piensos de engorde de dorada

4.1.1. Introducción

La dorada (*Sparus aurata* Linné, 1758) es un teleósteo marino de la familia *Sparidae* (orden Perciformes). Es muy común en el Mar Mediterráneo pero se extiende también por el Mar Negro, el Mar Rojo y las costas orientales del Océano Atlántico (Suau y López, 1976; Bauchot y Hureau, 1986). Así pues, se trata de una especie litoral, euriterma y eurihalina que vive tanto en fondos mixtos de roca-arena o roca-alga, como en fondos de *Posidonia oceanica* a profundidades de 5-30 metros. También puede encontrarse cerca de la desembocadura de los grandes ríos, donde con frecuencia remonta la corriente. Es una especie muy sensible al frío y durante el otoño suele buscar aguas más cálidas (Ben-Tuvia, 1979).

Su dieta natural es la de un carnívoro típico, al ser un depredador de moluscos (bivalvos y gasterópodos), crustáceos y pequeños peces (Arias, 1976, 1980; Suau y López, 1976; Francescon y cols., 1987). Es una especie con hermafroditismo proteándrico, es decir, cada individuo se desarrolla sexualmente como macho hasta los 1-2 años, y revierte a hembra a los 2-3 años de edad (Happe y Zohar, 1988).

Su periodo de reproducción suele ser de octubre a diciembre (Lumare, 1978). El desove es espontáneo y secuencial, con una duración de 2-3 meses. El tipo de puesta es pelágica con emisión de huevos planctónicos (Zohar y Gordin, 1979; Zohar y cols., 1984; Arias y Drake, 1990), que flotan gracias a una única gota lipídica (Moretti y cols., 1999). En su hábitat natural, es una especie considerada de crecimiento rápido, alcanzando los 300 g en el segundo año y los 600 g en el tercer año. Los animales especialmente longevos pueden llegar a alcanzar una talla de 70 cm con un peso de unos 8 kg (Moretti y cols., 1999).

Actualmente, la dorada es un pez que se cultiva en casi todos los países mediterráneos. Los centros de reproducción ("hatcheries") producen huevos y larvas a partir de individuos reproductores en condiciones controladas, pudiéndose obtener puestas a lo largo de más de 4 meses, a razón de 2-3 millones de

huevos por kg de peso corporal (Gordin y Zohar, 1978; Zohar y Gordin, 1979; Devauchelle, 1984; Zohar y cols., 1989).

Durante su primer mes de vida en cautividad, las larvas de dorada se alimentan de organismos vivos (rotíferos y artemia, principalmente) que proceden de cultivos intensivos (Kissil, 1991).

Al final del primer mes comienza el "destete" y progresivamente se inicia una alimentación a base de piensos artificiales. Las doradas de 10 g ya son susceptibles de pasar a las unidades de engorde. Estas instalaciones pueden ser jaulas flotantes o instalaciones en tierra, con un ciclo de engorde hasta alcanzar la talla comercial (300-600 g) que suele oscilar entre 12 y 18 meses. Este periodo puede reducirse considerablemente en condiciones de cultivo a escala piloto (**Fig. 4.1**).

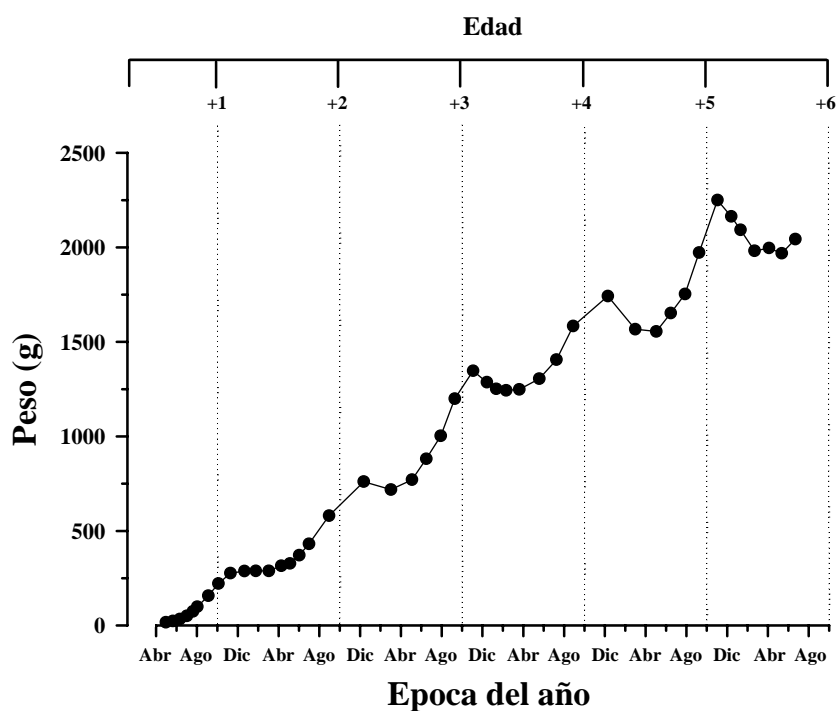


Fig. 4.1: Curva de crecimiento de doradas en cultivo en las instalaciones del IATS (CSIC, Castellón).

La bibliografía muestra que el 30-50% de las harinas de pescado pueden ser reemplazadas con ciertas garantías de éxito en los piensos de engorde de acuicultura (Francis y cols., 2001). Sin embargo, el valor nutritivo de las fuentes alternativas de proteína suele ser limitado debido a las alteraciones del perfil aminoacídico (ver apartado 1.3). Es más, pocos estudios han abordado la más que posible importancia del cociente IAA/DAA de la dieta. (Schuhmacher y cols., 1995; Akiyama y cols., 1997).

El perfil aminoacídico óptimo puede definirse como aquel en el que todos los IAAs son igual de limitantes en el proceso de acreción proteica (Wang y Fuller, 1989), para lo cual también se requiere un cociente IAA/DAA adecuado (Wang y Fuller, 1989; Cole y Van Lunen, 1994). Los requerimientos de IAAs son conocidos para un número limitado de especies tales como la trucha arco iris (Ogino, 1980), el catla (Ravi y Devaraj, 1991), el salmón real, el bagre de canal, la carpa, la anguila japonesa y la tilapia del Nilo (NRC, 1993). Tales requerimientos se han estimado mediante ensayos en los que se incluye gradualmente el aminoácido en estudio (Wilson, 1989). Ello es costoso y consume mucho tiempo por lo que cada vez han cobrado mayor relevancia los métodos indirectos, basados en la utilización de patrones aminoacídicos de referencia. De esta forma, investigaciones recientes en el campo de la nutrición de peces han hecho especial hincapié en la relación existente entre el patrón de IAAs de la dieta y el perfil aminoacídico del conjunto del organismo, del músculo y del huevo (Ketola, 1982; Wilson y Poe, 1985; Mambrini y Kaushik, 1995; Akiyama y cols., 1997).

No obstante, es escaso nuestro conocimiento sobre las posibles consecuencias que las deficiencias y desequilibrios en el balance aminoacídico provocan sobre el metabolismo intermediario de los peces en cultivo. Es por ello que, en esta primera experiencia de engorde de dorada, se evaluó el efecto combinado del perfil de IAAs y el cociente IAA/DAA de la dieta sobre el crecimiento, metabolismo intermediario y marcadores endocrinos (sistema somatotrópico).

4.1.2. Diseño experimental

Se formularon cuatro dietas isoproteicas e isoenergéticas basadas en harinas de pescado e ingredientes vegetales (33-35% de sustitución) complementadas con IAAs (**Tabla 4.1**).

En las dietas M y WB, el perfil de IAAs y el contenido de DAAs se basaron en el perfil aminoacídico del músculo y del conjunto del organismo, respectivamente. En las dietas MGlu y WBGlu, el contenido de DAAs aumentó con la incorporación de ácido L-glutámico, variando el cociente IAA/DAA entre 1,13 (M) y 0,80 (WBGlu).

Tabla 4.1: Composición química de las dietas utilizadas en el engorde 1 de dorada (para más detalles ver apartado 3.2.1).

Composición aproximada	M	MGlu	WB	WBGlu
Materia seca (MS, %)	92,1	93,8	89,3	92,7
Proteína (% MS)	52,7	53,0	52,1	50,9
Grasa (% MS)	15,7	16,4	15,9	15,2
Energía (kJ/g MS)	22,5	22,5	22,5	22,4
IAA ¹ (%)	25,8	26,4	26,1	22,5
DAA ² (%)	22,8	25,6	26,3	27,9
IAA/DAA	1,13	1,03	0,99	0,80

¹ Aminoácidos esenciales.

² Aminoácidos no esenciales.

Cada dieta fue administrada durante 12 semanas (27 abril-20 julio del 2001) a animales distribuidos en tanques de 500 litros (3 tanques/dieta). El alimento fue proporcionado dos veces al día (09:00, 14:00) hasta saciedad visual.

Cada 3 semanas, los animales fueron ligeramente anestesiados, contados y pesados colectivamente. La composición corporal (ver apartado 3.4) se determinó al principio de la experiencia en una muestra conjunta de 10 animales; y en grupos de 5 animales por tanque al final del periodo de engorde.

En animales previamente adaptados a los diferentes regímenes de alimentación, la excreción amoniacal se midió periódicamente durante 2 ciclos consecutivos de 22 horas (ver apartado 3.3.5).

Al final de la experiencia de engorde propiamente dicha, y tras sacrificar los animales de un golpe seco en la cabeza, se tomaron muestras de tejidos a las 24 horas post-ingesta. Una parte de los hígados se procesó *in situ* para los ensayos de enzimas lipogénicos (ver apartado 3.5.2). El resto se congeló hasta la determinación de las actividades enzimáticas relacionadas con el catabolismo aminoacídico (ver apartado 3.5.1), la glucólisis (ver apartado 3.5.3) y la gluconeogénesis (ver apartado 3.5.4). También se extrajo músculo esquelético para determinar el contenido en aminoácidos libres (ver apartado 3.4.4). Estas muestras fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y posteriormente almacenadas a -80 °C hasta la realización de los pertinentes análisis.

Adicionalmente, se extrajo sangre por punción caudal con jeringas heparinizadas. El plasma, derivado de la centrifugación de la sangre a 3000 g (20 min, 4 °C), se almacenó a -30 °C hasta la realización de los análisis hormonales (ver apartado 3.7) y de metabolitos plasmáticos (ver apartado 3.6).

4.1.3. Resultados

A lo largo del engorde, el peso corporal aumentó de 14-15 g a 70-75 g (**Tabla 4.2**). Las tasas de crecimiento no variaron significativamente con el régimen de alimentación, aunque tendieran a reducirse con el aumento de DAAs en la dieta, independientemente del perfil de IAAs.

La conversión del alimento (FE) y la retención de nitrógeno siguieron un patrón similar al de las tasas de crecimiento, aunque en este caso se observaron diferencias significativas entre los dos grupos extremos (M y WBGlú).

En comparación con los otros tres grupos experimentales, la deposición grasa en el conjunto del organismo tendió a disminuir en el grupo MGlú, siendo ello estadísticamente significativo en términos de retención lipídica.

Tabla 4.2: Datos de crecimiento y composición corporal de doradas alimentadas con las dietas experimentales (engorde 1). Cada valor representa la media \pm error estándar de 3 tanques/dieta.

	M	MGlu	WB	WBGlu	<i>P</i> ¹
Peso inicial (g)	14,7 \pm 0,16	14,7 \pm 0,023	14,6 \pm 0,088	14,9 \pm 0,11	0,361
Peso final (g)	74,9 \pm 0,67	70,9 \pm 1,37	72,9 \pm 1,35	70,9 \pm 1,24	0,127
Ingesta (%PM*/d)	1,78 \pm 0,02	1,85 \pm 0,10	1,81 \pm 0,04	1,90 \pm 0,10	0,788
SGR ² (%)	1,98 \pm 0,003	1,91 \pm 0,002	1,96 \pm 0,03	1,90 \pm 0,02	0,079
FE ³	0,85 \pm 0,01 ^b	0,79 \pm 0,04 ^{ab}	0,82 \pm 0,02 ^{ab}	0,74 \pm 0,003 ^a	0,043
PER ⁴	1,61 \pm 0,03	1,51 \pm 0,08	1,59 \pm 0,03	1,50 \pm 0,05	0,546
<i>Composición corporal (% humedad)</i>					
Agua	67,1 \pm 0,22	67,4 \pm 0,11	66,9 \pm 0,20	66,9 \pm 0,26	0,304
Proteína	16,2 \pm 0,34 ^a	17,1 \pm 0,10 ^b	16,4 \pm 0,062 ^a	15,9 \pm 0,17 ^a	0,015
Lípidos	11,8 \pm 0,15	10,7 \pm 0,22	11,5 \pm 0,25	11,7 \pm 0,40	0,081
Cenizas	3,3 \pm 0,07	3,5 \pm 0,09	3,3 \pm 0,134	3,4 \pm 0,093	0,355
<i>Ganancia [mg(g)/kg PM/d]</i>					
Nitrógeno (mg)	409,4 \pm 0,8	416,1 \pm 2,9	398,3 \pm 4,6	369,8 \pm 13,8	0,053
Lípidos (g)	1,8 \pm 0,02	1,5 \pm 0,11	1,7 \pm 0,056	1,7 \pm 0,104	0,230
<i>Retención (% ingesta)</i>					
Nitrógeno	27,4 \pm 0,6 ^b	25,2 \pm 0,02 ^{ab}	26,5 \pm 0,35 ^{ab}	24,3 \pm 0,72 ^a	0,043
Lípidos	65,5 \pm 0,74 ^b	48,3 \pm 3,11 ^a	61,1 \pm 2,93 ^b	60,0 \pm 1,57 ^b	0,018

Composición corporal inicial: agua 68,82%, proteína 14,96%, lípidos 11,12%, cenizas 3,60%.

¹ Los valores de *P* son el resultado del análisis de la varianza. Diferentes superíndices en cada fila indican diferencias significativas entre los tratamientos experimentales (test de Student Newman-Keuls, *P*<0,05).

² Tasa específica de crecimiento = [100 \times (ln peso final – ln peso inicial)]/días.

³ Conversión del alimento = ingesta de alimento / ganancia de peso.

⁴ Eficiencia proteica = ganancia de peso / ingesta proteica.

* Peso corporal medio.

En todos los grupos experimentales, el patrón de excreción amoniacal fue muy parecido con un máximo a las 3 horas post-ingesta (**Fig. 4.2A**). Sin embargo, la excreción amoniacal acumulada aumentó conforme disminuyó el cociente IAA/DAA de la dieta (**Fig. 4.2B**).

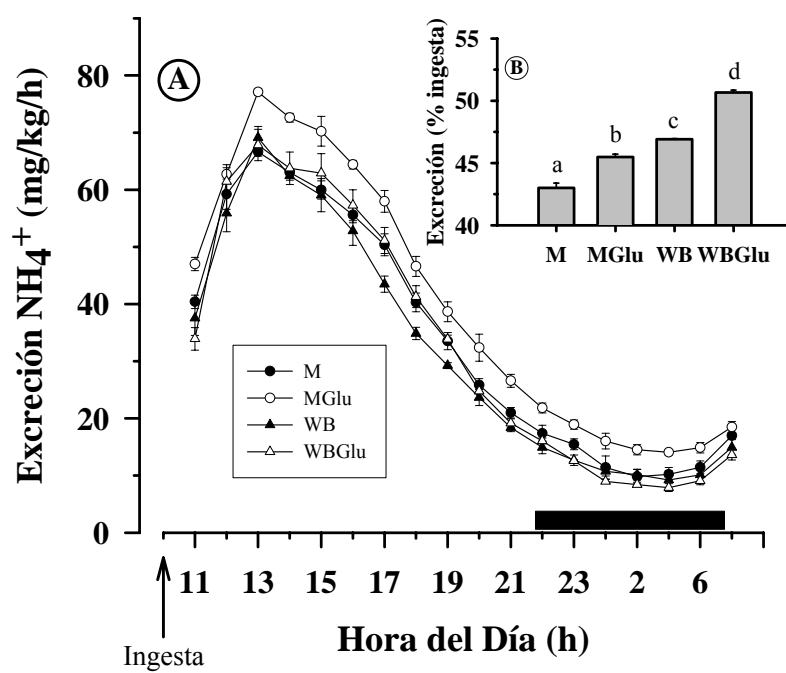


Fig. 4.2: Excreción amoniacal instantánea (A) y acumulada (B) de doradas alimentadas con las dietas experimentales (engorde 1). Cada valor representa la media \pm error estándar de 2 ciclos consecutivos de excreción (3 tanques/dieta). Valores con distintas letras son significativamente diferentes (test de Student Newman-Keuls, $P < 0,05$).

La actividad hepática de enzimas claves del catabolismo aminoacídico se muestra en la **Tabla 4.3**.

La actividad de la GDH disminuyó progresivamente con la disminución del cociente IAA/DAA de la dieta, registrándose diferencias significativas entre los dos grupos extremos (M y WBGlú).

Las transaminasas (ASAT y ALAT) no variaron significativamente con el régimen de alimentación.

Tabla 4.3: Actividad específica de enzimas hepáticos involucrados en el catabolismo aminoacídico de doradas alimentadas con las dietas experimentales (engorde 1). Cada valor representa la media \pm error estándar de 6 animales.

Actividad enzimática (mUI/mg proteína)	M	MGlu	WB	WBGlu	<i>P</i> ¹
Glutamato deshidrogenasa (GDH)	212,1 \pm 12,7 ^b	197,3 \pm 12,2 ^{ab}	162,1 \pm 13,6 ^{ab}	142,8 \pm 21,1 ^a	0,02
Alanina aminotransferasa (ALAT)	874,6 \pm 57,8	782,5 \pm 59,7	721,1 \pm 40,3	775,9 \pm 50,1	0,29
Aspartato aminotransferasa (ASAT)	1725,5 \pm 85,2	1531,8 \pm 96,2	1625,6 \pm 127,2	1676,2 \pm 125,5	0,66

¹ Los valores de *P* son el resultado del análisis de la varianza. Superíndices con diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos experimentales (test de Student Newman-Keuls, *P*<0,05).

La analítica de aminoácidos libres en el músculo esquelético arrojó diferencias significativas en los niveles de IAAs (histidina, treonina, metionina, lisina y valina) y DAAs (hidroxiprolina, glutamato, serina, glicina, alanina y prolina) (**Tabla 4.4**).

El cociente IAA/DAA de aminoácidos libres del músculo esquelético estuvo altamente correlacionado con el cociente IAA/DAA de la dieta. Así mismo, la concentración total de aminoácidos libres musculares tendió a aumentar con la adición de ácido glutámico, independientemente del perfil de IAAs de la dieta.

Tabla 4.4: Aminoácidos libres en el músculo esquelético ($\mu\text{mol/g}$ peso húmedo) de doradas alimentadas con las dietas experimentales (engorde 1). Cada valor representa la media \pm error estándar de 6 animales.

Aminoácido	M	MGlu	WB	WBGlu	P^1
ARG	0,72 \pm 0,05	0,67 \pm 0,05	0,60 \pm 0,05	0,57 \pm 0,06	0,265
HIS	7,11 \pm 0,68 ^a	10,62 \pm 0,70 ^b	7,11 \pm 0,57 ^a	7,50 \pm 0,26 ^a	0,003
ILE	0,02 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00	0,01 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00	0,565
LYS	0,86 \pm 0,11 ^b	0,83 \pm 0,10 ^b	0,44 \pm 0,06 ^a	0,30 \pm 0,06 ^a	0,001
MET	0,06 \pm 0,02 ^{ab}	0,07 \pm 0,00 ^b	0,01 \pm 0,01 ^a	0,03 \pm 0,01 ^{ab}	0,021
PHE	0,16 \pm 0,07	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	0,079
THR	0,29 \pm 0,03 ^a	0,55 \pm 0,03 ^b	0,30 \pm 0,05 ^a	0,40 \pm 0,04 ^{ab}	0,001
TRP	0,15 \pm 0,08	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,087
TYR	0,08 \pm 0,00 ^a	0,14 \pm 0,01 ^b	0,12 \pm 0,01 ^b	0,11 \pm 0,01 ^{ab}	0,001
VAL	0,05 \pm 0,01 ^a	0,11 \pm 0,00 ^b	0,10 \pm 0,01 ^b	0,12 \pm 0,00 ^b	0,001
Ala	0,63 \pm 0,05 ^a	1,16 \pm 0,14 ^b	0,71 \pm 0,03 ^a	0,90 \pm 0,10 ^{ab}	0,008
Asn	0,41 \pm 0,05	0,91 \pm 0,15	0,61 \pm 0,05	0,61 \pm 0,16	0,082
Asp	0,09 \pm 0,02	0,16 \pm 0,01	0,13 \pm 0,02	0,16 \pm 0,03	0,241
Gln	0,32 \pm 0,03	0,62 \pm 0,04	0,45 \pm 0,02	0,46 \pm 0,04	0,078
Glu	0,27 \pm 0,06 ^a	0,54 \pm 0,09 ^c	0,27 \pm 0,04 ^a	0,33 \pm 0,08 ^b	0,001
Gly	9,06 \pm 0,78 ^a	15,66 \pm 1,68 ^c	12,02 \pm 1,53 ^{abc}	15,51 \pm 1,05 ^{bc}	0,014
Hyp	0,37 \pm 0,05 ^a	0,59 \pm 0,02 ^{ab}	0,52 \pm 0,09 ^{ab}	0,75 \pm 0,09 ^b	0,019
Pro	0,26 \pm 0,02 ^a	0,39 \pm 0,02 ^a	0,45 \pm 0,05 ^{ab}	0,69 \pm 0,11 ^b	0,004
Ser	0,17 \pm 0,01 ^a	0,29 \pm 0,03 ^{ab}	0,21 \pm 0,02 ^a	0,37 \pm 0,06 ^b	0,008
Tau	19,33 \pm 1,84	21,00 \pm 0,86	20,85 \pm 1,70	21,18 \pm 1,51	0,852
Total	40,41 \pm 1,82 ^a	54,32 \pm 2,99 ^b	44,94 \pm 3,59 ^{ab}	50,03 \pm 2,29 ^{ab}	0,026
IAA/DAA ²	0,305 \pm 0,02 ^b	0,311 \pm 0,01 ^b	0,238 \pm 0,009 ^a	0,222 \pm 0,02 ^a	0,001

¹ Los valores de P son el resultado del análisis de la varianza. Superíndices con diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos experimentales (test de Student Newman-Keuls, $P < 0,05$).

² IAA: aminoácidos esenciales, DAA: aminoácidos no esenciales.

La **Tabla 4.5** muestra la actividad a nivel hepático de enzimas lipogénicas, glucolíticas y gluconeogénicas.

En todos los grupos experimentales, la actividad específica de la G6PD fue aproximadamente un orden de magnitud mayor que la registrada para el ME. Con independencia de ello, la actividad de ambas enzimas disminuyó significativamente en el grupo MGlu, lo que fue especialmente evidente en relación a los grupos WB y WBGlu.

La actividad específica de la FAS siguió el mismo patrón, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En cuanto a los enzimas glucolíticos y gluconeogénicos, la actividad de la GK también se vio disminuida en los peces alimentados con la dieta MGlu; mientras que no se encontraron diferencias significativas en la actividad de la G6Pasa.

Tabla 4.5: Actividad específica a nivel hepático de enzimas lipogénicas, glucolíticas y gluconeogénicas de doradas alimentadas con las dietas experimentales (engorde 1). Cada valor representa la media \pm error estándar de 6 animales.

Actividad enzimática (mU/mg proteína)	M	MGlu	WB	WBGlu	P ¹
Lipogénesis					
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)	202,2 \pm 10,2 ^b	143,2 \pm 8,2 ^a	219,9 \pm 17,4 ^b	223,4 \pm 10,4 ^b	0,001
Enzima málico (ME)	19,6 \pm 1,7 ^b	14,4 \pm 1,6 ^a	22,7 \pm 2,8 ^b	25,9 \pm 2,2 ^b	0,007
Acido graso sintasa (FAS)	0,092 \pm 0,007	0,071 \pm 0,004	0,096 \pm 0,018	0,098 \pm 0,003	0,173
Glucolisis					
Glucocuinasa (GK)	27,4 \pm 1,5 ^b	18,6 \pm 0,8 ^a	28,9 \pm 2,29 ^b	28,4 \pm 2,5 ^b	0,003
Gluconeogénesis					
Glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa)	28,8 \pm 2,2	29,0 \pm 4,4	32,02 \pm 4,00	24,9 \pm 8,9	0,687

¹ Los valores de P son el resultado del análisis de la varianza. Superíndices con diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos experimentales (test de Student Newman-Keuls, $P < 0,05$).

Los niveles circulantes de glucosa fueron más bajos en los peces alimentados con la dieta WBGlu que en los otros tres grupos experimentales (**Fig. 4.3A**).

Los niveles circulantes de TG tendieron a disminuir con la disminución del cociente IAA/DAA de la dieta, observándose diferencias significativas entre los dos grupos extremos (M y WBGlu) (**Fig. 4.3B**).

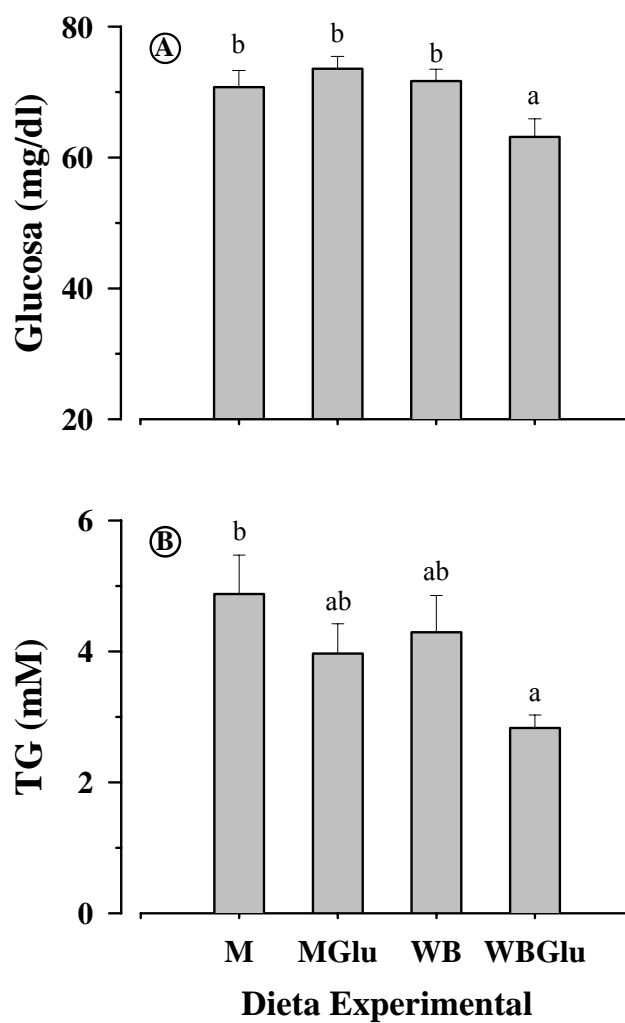


Fig. 4.3: Niveles circulantes de glucosa (A) y TG (B) en doradas alimentadas con las dietas experimentales (engorde 1). Cada valor representa la media \pm error estándar de 12-15 animales. Valores con distintas letras son significativamente diferentes (test de Student Newman-Keuls, $P < 0,05$).

Los niveles circulantes de GH fueron más bajos en los peces alimentados con la dieta M que en los alimentados con la dieta WBGlú (**Fig. 4.4A**), encontrándose una correlación negativa ($P < 0,001$) entre los niveles circulantes de GH y TG.

Los receptores hepáticos de GH (ensayo de radiorreceptores) no se vieron afectados por el régimen de alimentación (**Fig. 4.4B**).

Los niveles circulantes de IGF-I fueron significativamente más bajos en el grupo WBGlú que en los otros tres grupos experimentales (**Fig. 4.4C**).

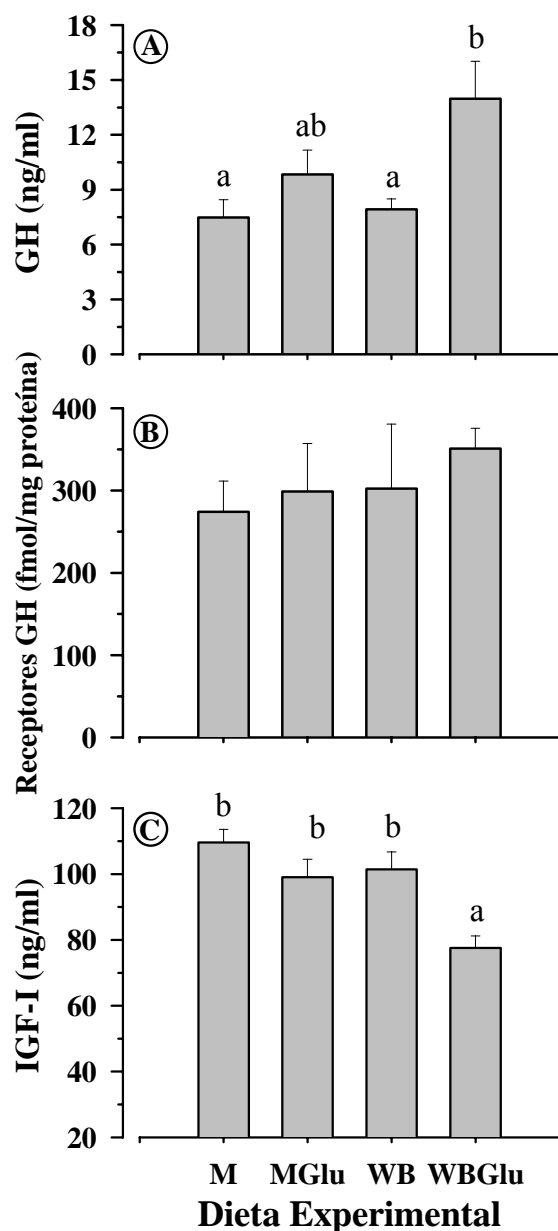


Fig. 4.4: Niveles circulantes de GH (A), receptores hepáticos de GH (B) y niveles circulantes de IGF-I (C) en doradas alimentadas con las dietas experimentales (engorde 1). Cada valor representa la media \pm error estándar de 12-15 animales. Valores con distintas letras son significativamente diferentes (test de Student Newman-Keuls, $P < 0,05$).

4.1.4. Discusión

4.1.4.1. Crecimiento y excreción amoniacal

En el engorde 1 de dorada, las harinas de pescado se reemplazaron en un 35% por proteínas de origen vegetal, observándose tasas de crecimiento similares a las obtenidas por nosotros mismos en estudios anteriores (Martí-Palanca y cols., 1996; Company y cols., 1999; Mingarro y cols., 2002). No obstante, la retención proteica mejoró significativamente con el aumento del cociente IAA/DAA, lo que sugiere cierta ventaja de la dieta basada en el perfil de IAAs y el cociente IAA/DAA del músculo esquelético (dieta M) (**Tabla 4.2**). Esta hipótesis de trabajo también se vio apoyada por datos hormonales y de excreción amoniacal.

En los peces, más del 85% del nitrógeno excretado se elimina en forma de amoníaco a través de las branquias (Kaushik y Cowey, 1991). En la dorada, el pico de excreción amoniacal suele darse a las 3 horas post-ingesta con temperaturas elevadas de cultivo (Dosdat y cols., 1996; Robaina y cols., 1999). Esta observación se vio confirmada en este estudio, el cual mostró un rápido incremento de la excreción amoniacal pocas horas después de la ingesta de alimento, alcanzándose una excreción basal durante la fase oscura (**Fig. 4.2A**).

A diferencia de la trucha, en donde el patrón de excreción amoniacal se ve afectado por cambios en el cociente proteína/energía digestible de la dieta (Kaushik y Oliva-Teles, 1985; Médale y cols., 1995), en la dorada no detectamos diferencias significativas con los diferentes perfiles aminoacídicos de la dieta (**Fig. 4.2A**). Sin embargo, la excreción amoniacal acumulada aumentó con la disminución del cociente IAA/DAA (**Fig. 4.2B**). Por tanto, la retención de nitrógeno, calculada tanto en base a datos de composición corporal como de excreción amoniacal, mejoró con el perfil aminoacídico del músculo esquelético (dieta M).

4.1.4.2. Metabolismo intermediario

En el proceso involucrado en la utilización de los aminoácidos como fuente de energía, la *aspartato aminotransferasa* (ASAT) y la *alanina aminotransferasa* (ALAT) son las encargadas de regular la transferencia de grupos amino del aminoácido oxidado a un α -cetoglutarato, provocando la formación de ácido glutámico (**Fig. 4.5A**). Esta transaminación está acoplada a una desaminación oxidativa, a través de la cual el glutamato revierte a α -cetoglutarato liberando una molécula de amoníaco. Este proceso está catalizado por la *glutamato deshidrogenasa* (GDH), que actúa preferentemente a nivel hepático (**Fig. 4.5B**).

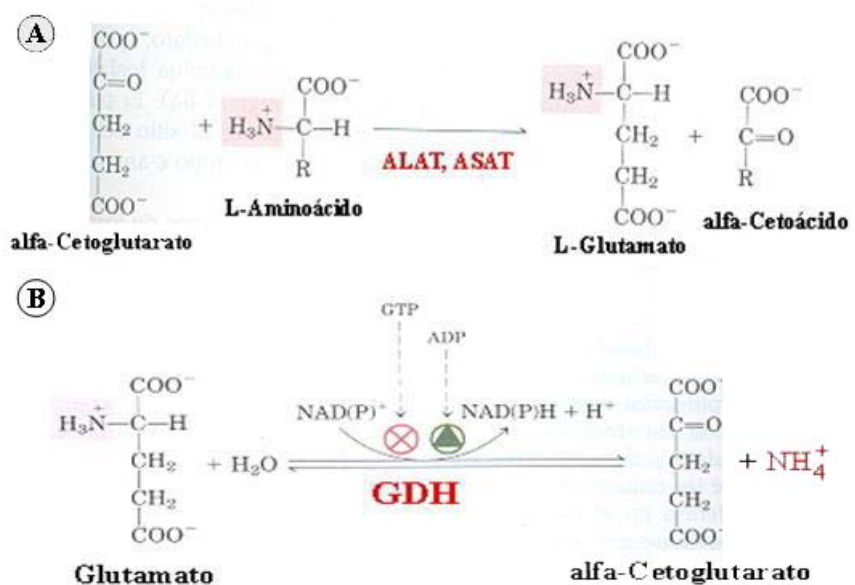


Fig. 4.5: Esquema representativo de los procesos de transaminación y desaminación oxidativa (modificado de Lehninger y cols., 1993).

En este trabajo, no encontramos efectos significativos de la dieta sobre la actividad de las aminotransferasas hepáticas (ALAT y ASAT) (**Tabla 4.3**), lo que podría indicar que, en la dorada, estas enzimas no limitan la utilización de las proteínas como fuente de energía. Este hecho estaría en consonancia con la disparidad de resultados encontrados en respuesta al ayuno en especies de peces con elevados requerimientos proteicos (Cowey y Walton, 1989; Metón y cols., 1999).

A diferencia de las aminotransferasas, la GDH suele estar afectada por el régimen de alimentación. En la trucha, se ha observado un aumento de la actividad de la GDH con la adición de ácido glutámico en la dieta (Moyano y De la Higuera, 1991). No obstante, los resultados obtenidos en el engorde 1 de dorada mostraron una disminución de la actividad de esta enzima (**Tabla 4.3**), lo que podría interpretarse como un mecanismo de contrarregulación para limitar la oxidación de los aminoácidos en peces con altas tasas de recambio proteico.

Estas posibles alteraciones del recambio proteico estarían de acuerdo con el incremento de la concentración total de aminoácidos libres tisulares, lo que estuvo asociado a la disminución del cociente IAA/DAA de la dieta con independencia del perfil de IAAs (**Tabla 4.4**). Nuestro conocimiento acerca de la utilización del ácido glutámico, tal y como se conoce en vertebrados superiores (Reeds y cols., 2000), es incipiente en peces; aunque se ha sugerido la participación del glutamato en la síntesis endógena de citrulina y, por tanto, de arginina (Buentello y Gatlin, 2001).

En los peces, el hígado es el órgano diana por excelencia para la síntesis *de novo* de ácidos grasos. Esta ruta metabólica requiere la acción secuencial de dos sistemas enzimáticos: la *acetil-CoA-carboxilasa* y la *ácido graso sintasa* (FAS).

La *acetil-CoA-carboxilasa* genera malonil-CoA a partir del acetil-CoA; mientras que la FAS cataliza la conversión de acetil-CoA y malonil-CoA en ácidos grasos de cadena larga. La provisión de equivalentes reductores (NADPH) para este proceso biosintético corre a cargo de la *glucosa-6-fosfato deshidrogenasa* (G6PD) y el *enzima málico* (ME) (**Fig. 4.6**).

A título comparativo, las actividades mostradas por los enzimas lipogénicos hepáticos de la dorada son similares a las descritas en lubina (Dias y cols., 1998), pero notablemente superiores a las del rodaballo (Regost y cols., 2001). Además de estas diferencias interespecíficas, también parece darse una capacidad de regulación por parte del régimen de alimentación. De acuerdo con ello, las actividades enzimáticas correspondientes a la FAS, G6PD y ME disminuyeron en los animales alimentados con la dieta MGlu (**Tabla 4.5**). Ello sugiere una menor actividad lipogénica en estos animales, lo que estuvo en consonancia con una menor retención lipídica (**Tabla 4.2**).

El hecho de que la soja estuviese ausente en las dietas WB y WBGlu, o poco representada en la dieta M, sugiere que la inactivación de la ruta lipogénica en los animales alimentados con la dieta MGlu puede ser atribuida directa o indirectamente a ciertos componentes presentes en los extractos proteicos de la soja.

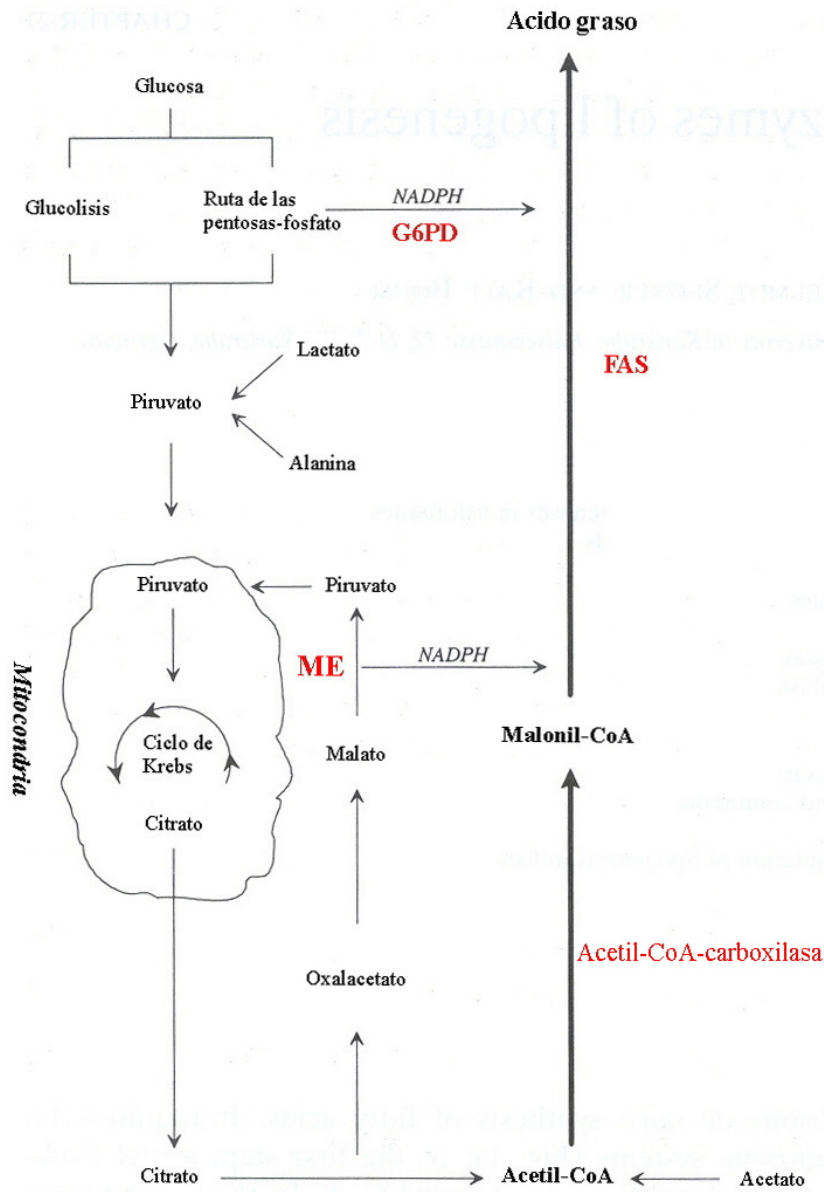


Fig. 4.6: Representación esquemática de la vía lipogénica (modificado de Segner y Böhm, 1994).

En mamíferos, se sabe que la naturaleza de la fuente proteica afecta a la actividad de los enzimas lipogénicos. Así, las actividades de la G6PD, del ME y de la FAS en ratas alimentadas con proteína de trigo disminuyen con respecto a las observadas en ratas alimentadas con caseína y proteínas de pescado (Herzberg y Rogerson, 1984; Iritani y cols., 1986, 1996; Kayashita y cols., 1996). Esta sintomatología puede deberse a deficiencias en metionina (Kern y cols., 2002). No obstante, en ratas y hamsters, son bien conocidos los efectos lipolíticos de las isoflavonas, que son especialmente abundantes en las harinas de soja (Balmir y cols., 1996). De acuerdo con ello, estudios previos han mostrado una disminución de la deposición grasa en doradas alimentadas con harinas de soja (Robaina y cols., 1998).

La *glucoquinasa* (GK) es la enzima clave que cataliza la etapa inicial de la glucólisis (**Fig. 4.7**), siendo bien conocida la capacidad de la dorada para regular tanto la expresión como la actividad de la GK (Metón y cols., 1999; Caseras y cols., 2000; Panserat y cols., 2000a). En este contexto, es interesante reseñar que los animales alimentados con la dieta MGlu mostraron una disminución de la actividad GK a nivel hepático (**Tabla 4.5**), lo que podría haber limitado la conversión de glucosa a piruvato y, en consecuencia, la provisión de acetil-CoA para la síntesis *de novo* de ácidos grasos. Ello abogaría, una vez más, por la disminución de la actividad lipogénica en este grupo experimental.

A diferencia de la vía glucolítica, la actividad de la enzima clave de la gluconeogénesis (G6Pasa) no se vio alterada por el régimen de alimentación. No obstante, los niveles más bajos de glucosa y TG circulantes se detectaron en los animales alimentados con la dieta WBGlu (**Fig. 4.3**). Es más, se observó una clara correlación negativa entre los niveles circulantes de TG y GH, tal y como se ha observado con anterioridad en dorada (Mingarro y cols., 2002). Esta hormona posee un conocido efecto lipolítico que inhibe la actividad hepática de la *acetil-CoA-carboxilasa* en la dorada (Vega-Rubín de Celis y cols., 2003); aunque no podemos descartar efectos sobre la captación, síntesis y liberación al torrente circulatorio de lipoproteínas hepáticas.

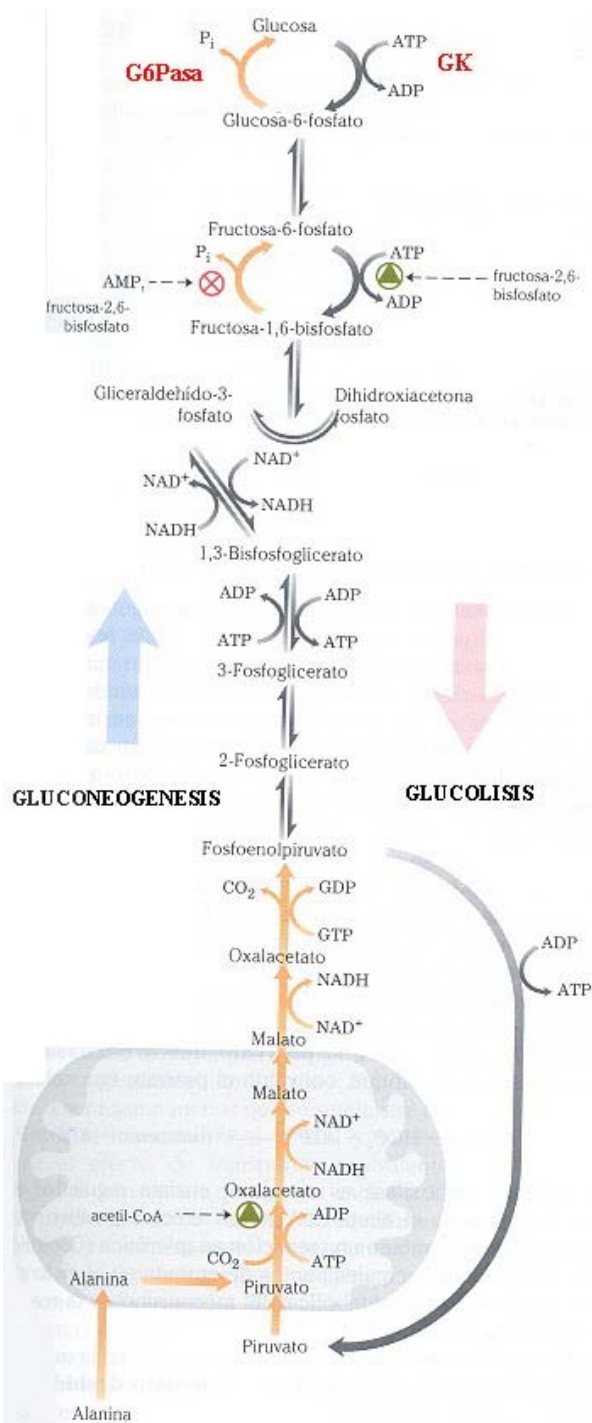


Fig. 4.7: Diagrama representativo de las vías glucolítica y gluconeogénica (modificado de Lehninger y cols., 1993).

4.1.4.3. Sistema somatotrópico

El eje somatotrópico juega un papel fundamental en la regulación del crecimiento y en la utilización de los componentes de la dieta por los distintos tejidos diana, respondiendo rápidamente a cambios en el tamaño de la ración (Pérez-Sánchez y cols., 1995; Company y cols., 1999), en el cociente proteína/energía de la dieta (Martí-Palanca y cols., 1996) y a las variaciones estacionales del fotoperiodo y la temperatura (Pérez-Sánchez y cols., 1994; Mingarro y cols., 2002).

Como patrón general, en estados catabólicos se produce una disminución de los GHRs hepáticos y, en consecuencia, de la expresión hepática de IGF-I, que es la fuente más importante de IGF-I circulante. Ello se traduce en un pronunciado aumento de los niveles circulantes de GH, como consecuencia de un defecto en la retroalimentación negativa que ejerce la IGF-I sobre la síntesis y liberación de GH a nivel hipofisario (Pérez-Sánchez y cols., 1992) (**Fig. 4.8**).

En el caso que nos ocupa, el régimen de alimentación no modificó aparentemente el número de GHRs hepáticos (**Fig. 4.4B**). En cambio, se observó una reducción de los niveles circulantes de IGF-I (**Fig. 4.4C**) con la disminución del cociente IAA/DAA de la dieta, lo que sugiere un defecto en la transmisión intracelular de la señal por parte del GHR. En cualquier caso, el descenso de los niveles de IGF-I estuvo acompañado de un incremento de la GH circulante (**Fig. 4.4A**), reflejando un patrón propio de un estado catabólico. Ello estuvo en consonancia con la mejor conversión y retención proteica de los animales alimentados con la dieta M.

En peces hay evidencias de una acción reguladora del glutamato sobre la secreción de GH, como así lo demuestra el efecto inhibitorio de los agonistas del glutamato (ácido N-metil-D,L aspártico) sobre la liberación de GH en el carpín dorado (Trudeau y cols., 1996). Sin embargo, si en nuestro caso existió tal efecto, debió verse enmascarado por otras señales estimuladoras como el descenso de los niveles circulantes de

IGF-I con la disminución del cociente IAA/DAA de la dieta (Fig. 4.4C).

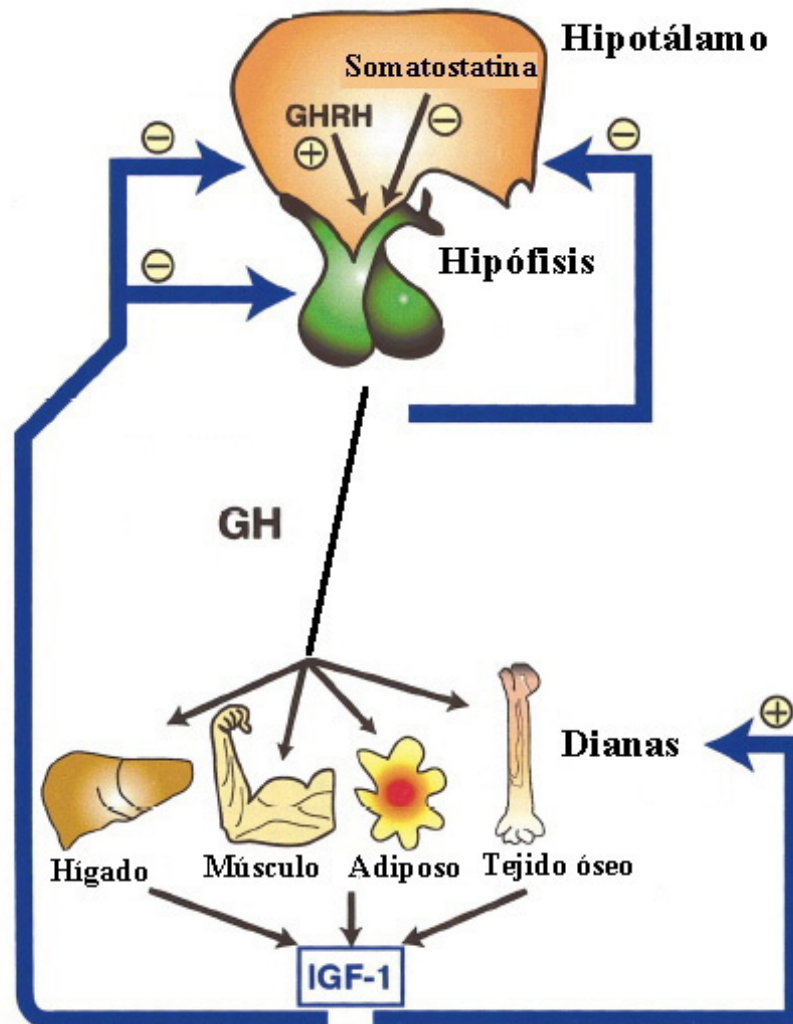


Fig. 4.8: Secreción y modos de acción de la GH. La somatostatina y la hormona liberadora de GH (GHRH) se sintetizan en el hipotálamo y controlan la secreción de GH. La GH circulante puede unirse a sus receptores de membrana (GHRs) en tejidos diana como el hepático, muscular, adiposo y óseo. Esto se traduce en un aumento de la concentración de IGF-I circulante, provocando repuestas promotoras del crecimiento sobre los propios tejidos e inhibiendo la liberación de GH y GHRH (modificado de Kopchick y Andry, 2000).

Todo ello indica una compleja regulación del crecimiento y del sistema endocrino por parte del régimen de alimentación. En base a ello, los mejores resultados se observaron en los peces alimentados con la dieta M, que refleja el perfil de IAAs y el cociente IAA/DAA del músculo esquelético. Son de reseñar las importantes alteraciones observadas en el metabolismo lipídico de los peces alimentados con la dieta MGlu, posiblemente como consecuencia de la presencia de diferentes metabolitos secundarios de acción lipolítica en las harinas de soja. A priori, ello podría considerarse beneficioso, pero dada la variabilidad de un lote a otro se optó por prescindir de la soja en los engordes siguientes.

4.2

Nivel crítico de sustitución y viabilidad a largo plazo en la dorada

4.2.1. Introducción

Para que sea posible un desarrollo sostenible de la acuicultura es necesario que exista un conocimiento básico acerca de las consecuencias fisiológicas que provoca la sustitución parcial o total de las harinas de pescado por fuentes proteicas alternativas. Durante los últimos años, y dada la actual disponibilidad, las proteínas de origen vegetal han recibido una atención especial (Kaushik, 1990; Tacon, 1994). Dietas libres de harinas de pescado han sido utilizadas con éxito en trucha arco iris (Kaushik y cols., 1995; Watanabe y cols., 1998), pero en peces de origen marino difícilmente ha sido posible un alto grado de sustitución, como consecuencia probablemente de unos requerimientos aminoacídicos más estrictos. Además, se ha demostrado que ciertos componentes de los extractos vegetales poseen capacidad inmunogénica y/o producen daños histopatológicos en el tracto digestivo (Rumsey y cols., 1994; Baeverfjord y Krogdahl, 1996; Krogdahl y cols., 2003).

En la dorada, una de las especies más importantes de la acuicultura mediterránea, los datos disponibles (Robaina y cols., 1995; Kissil y cols., 2000; Pereira y Oliva-Teles, 2002) indican que sólo es posible una sustitución limitada de las harinas de pescado por fuentes proteicas de origen vegetal. Ya que para maximizar la acreción proteica es esencial disponer de un adecuado perfil aminoacídico, es de suponer que en ésta y otras especies de peces es necesario suplir las dietas vegetales con IAAs (Murai y cols., 1989; Davies y cols., 1997; Regost y cols., 1999; Cheng y cols., 2003b).

En trucha, Watanabe y cols. (1998) han observado que si la fuente proteica cubre unos mínimos requerimientos aminoacídicos no es necesario suplir las dietas con IAAs. En el capítulo anterior se puso de relieve que un 35% de sustitución no afecta al potencial de crecimiento de la dorada, aunque el perfil de IAAs del músculo esquelético parece especialmente favorable para aumentar las tasas de conversión del alimento. En este contexto, resulta de especial interés analizar con más detalle la viabilidad de la sustitución de las harinas de pescado por mezclas de proteínas vegetales complementadas con IAAs. Tales estudios

se han abordado a corto, medio y largo plazo al objeto de establecer los efectos del régimen de alimentación sobre el crecimiento, la cascada endocrina del sistema somatotrópico y el estado de inmunocompetencia de los animales en cultivo.

4.2.2. Diseño experimental

Se formularon cuatro dietas basadas en harinas de pescado (FM) e ingredientes vegetales, de modo que sustituyeran a las harinas de pescado en un 50% (PP50), 75% (PP75) y 100% (PP100) (**Tabla 4.6**).

Todas las dietas reflejaron niveles similares de proteína y energía digestible, de acuerdo con los coeficientes de digestibilidad aparentes (CDA) para cada ingrediente (Lupatsch y cols., 1997; Nengas y cols., 1995).

Tabla 4.6: Composición química de las dietas utilizadas en los engordes 2a, 3 y 4 de dorada (para más detalles ver apartado 3.2.2).

Composición aproximada	FM	PP50	PP75	PP100
Materia seca (MS, %)	93,7	94,3	91,9	90,1
Proteína (% MS)	46,1	47,5	44,8	42,8
Grasa (% MS)	16,5	16,6	17,2	16,8
Energía (kJ/g MS)	20,4	21,3	21,4	21,7
IAA ¹ (%)	50,3	51,9	53,4	53,1
DAA ² (%)	47,6	44,6	47,0	49,6
IAA/DAA	1,06	1,16	1,14	1,07

¹ Aminoácidos esenciales.

² Aminoácidos no esenciales.

Al objeto de cubrir los requerimientos aminoacídicos de la dorada, se añadieron cantidades crecientes de IAAs a las dietas con proteínas de origen vegetal.

El cociente IAA/DAA fue cercano a 1,1 en todas las dietas, aumentando (prolina y ácido glutámico) o disminuyendo (alanina, glicina y aspartato) las cantidades de algunos DAAs con la estrategia de sustitución (**Tabla 4.7**).

Tabla 4.7: Composición aminoacídica (g/16g N) de las dietas experimentales (engordes 2a, 3 y 4) y requerimiento de IAAs de la dorada (Kaushik, 1998).

Aminoácido	FM	PP50	PP75	PP100	Requerimientos IAAs
ARG	6,5	6,5	5,5	5,5	5,4
HIS	2,2	2,5	2,7	2,9	1,7
ILE	4,8	4,8	5,0	5,5	2,6
LEU	8,2	8,3	8,7	9,5	4,5
LYS	8,6	9,5	10,3	7,0	5,0
MET ¹	2,7	2,7	2,5	2,7	2,4
PHE ²	4,2	4,4	4,6	5,0	2,9
THR	4,2	4,2	4,4	4,8	2,8
TYR	3,5	3,3	3,5	3,7	
TRP ³	1,2	1,2	1,2	1,2	0,6
VAL	5,5	5,7	6,1	6,5	3,0
Ala	6,8	5,4	4,9	4,4	
Asp	10,3	6,9	5,7	4,5	
Glu	15,5	18,5	22,2	25,8	
Gly	6,8	4,6	3,9	2,9	
Pro	4,0	5,1	6,0	7,6	
Ser	4,2	4,0	4,4	4,5	
IAA ⁴ (%)	50,3	51,9	53,4	53,1	
DAA ⁵ (%)	47,6	44,6	47,0	49,6	
IAA/DAA	1,06	1,16	1,14	1,07	

¹ Met + Cys

² Phe + Tyr

³ Los datos referentes a Trp se estimaron basándose en la composición aminoacídica de los ingredientes de la dieta.

⁴ Aminoácidos esenciales.

⁵ Aminoácidos no esenciales.

Sustitución a corto plazo (engorde 2a)

Las dietas experimentales fueron administradas durante 12 semanas (29 abril-19 julio del 2002) a animales distribuidos en tanques experimentales de 500 litros (3 tanques/dieta). El alimento se distribuyó a saciedad visual dos veces al día (09:00, 14:00).

Cada 3 semanas, los animales fueron ligeramente anestesiados, contados y pesados colectivamente. La composición corporal (ver apartado 3.4) se determinó al principio del engorde en una muestra conjunta de 10 animales; y en grupos de 5 animales por tanque al final de la experiencia.

Al final del periodo de engorde se tomaron muestras de sangre y tejidos. A las 6 horas post-ingesta, se extrajo sangre por punción caudal con jeringas heparinizadas. A las 24 horas post-ingesta, se realizó un segundo muestreo para la recogida de muestras de sangre, hígado y músculo esquelético.

El plasma, derivado de la centrifugación de la sangre a 3000 g (20 min, 4 °C), se almacenó a -30°C hasta la realización de los análisis hormonales (ver apartado 3.7) y de metabolitos plasmáticos (ver apartado 3.6). Las muestras de hígado y de músculo esquelético fueron rápidamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C hasta la realización de los correspondientes análisis de enzimas del catabolismo aminoacídico (ver apartado 3.5.1), de aminoácidos libres tisulares (ver apartado 3.4.4) y de expresión génica (ver apartado 3.8).

Sustitución a medio plazo (engorde 3)

La experiencia anterior se vio prolongada en el tiempo para determinar en qué medida la sustitución proteica afectaba al estado de inmunocompetencia de los animales en cultivo. Así, este engorde se llevó a cabo en condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura desde el 29 de abril hasta el 25 de septiembre del 2002.

Al final de la experiencia (24 horas post-ingesta), animales seleccionados al azar fueron ligeramente anestesiados para obtener muestras de sangre mediante punción caudal con jeringas heparinizadas. Tras centrifugar la sangre a 3000 g (20 min, 4 °C), el plasma se almacenó a -80 °C hasta los posteriores análisis inmunológicos (ver apartado 3.9.2). A estos animales, y tras sacrificarlos de un golpe seco en la cabeza, se les extrajeron muestras de hígado y de músculo esquelético para llevar a cabo diferentes analíticas relacionadas con el estrés oxidativo (Sitjà-Bobadilla y cols., 2005).

De otros animales se tomaron muestras de hígado e intestino distal para su procesamiento histológico (ver apartado 3.9.1). Finalmente, se muestrearon peces de cada grupo experimental para la determinación de la MPO (ver apartado 3.9.2.3) y del estallido respiratorio (ver apartado 3.9.2.4) en leucocitos aislados del riñón anterior

Sustitución a largo plazo (engorde 4)

En este cuarto y último engorde, basado en las dietas FM y PP75, los animales se mantuvieron en condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura (agosto del 2002-julio del 2003) hasta alcanzar la talla comercial.

4.2.3. Resultados

4.2.3.1. Engorde 2a

La ingesta y la biomasa final (**Tabla 4.8**) disminuyeron progresiva y significativamente conforme aumentó la cantidad de ingredientes vegetales en la dieta, oscilando las tasas de crecimiento entre $1,86 \pm 0,01$ (FM) y $1,56 \pm 0,03$ (PP100).

La conversión del alimento (FE) y la eficiencia proteica (PER) fueron más altas en los peces alimentados con las dietas vegetales, siendo el grupo PP75 el que mostró los mejores índices de conversión al final del engorde.

Los índices hepatosomático (HSI) y de grasa mesentérica (MFI) no variaron significativamente entre los grupos experimentales. No obstante, en relación al grupo control (FM), la deposición grasa en el conjunto del organismo disminuyó significativamente en los animales alimentados con la dieta PP100. Estos animales también mostraron una menor ganancia de nitrógeno, aunque la retención proteica (% de ingesta) fue mayor que en los grupos FM y PP50.

Tabla 4.8: Datos de crecimiento y composición corporal de doradas alimentadas con las dietas experimentales (engorde 2a). Cada valor representa la media \pm error estándar de 3 tanques/dieta.

	FM	PP50	PP75	PP100	<i>P</i> ¹
Peso inicial (g)	16,4 \pm 0,07	16,7 \pm 0,11	16,5 \pm 0,19	16,4 \pm 0,24	0,52
Peso final (g)	73,8 \pm 0,86 ^d	69,7 \pm 0,52 ^c	66,5 \pm 0,50 ^b	58,2 \pm 0,71 ^a	<0,001
Hígado (g)	0,97 \pm 0,07	1,03 \pm 0,08	0,87 \pm 0,08	0,76 \pm 0,07	0,075
Grasa mesentérica (g)	1,17 \pm 0,07 ^b	1,09 \pm 0,07 ^b	1,01 \pm 0,06 ^{ab}	0,79 \pm 0,07 ^a	0,001
HSI ² (%)	1,23 \pm 0,06	1,31 \pm 0,09	1,31 \pm 0,13	1,38 \pm 0,11	0,804
MFI ³ (%)	1,49 \pm 0,09	1,41 \pm 0,11	1,39 \pm 0,08	1,26 \pm 0,09	0,395
Ingesta (g MS/pez)	63,8 \pm 1,25 ^d	52,9 \pm 0,42 ^c	47,6 \pm 0,80 ^b	41,9 \pm 0,83 ^a	<0,001
Ingesta (%PM/d)	1,75 \pm 0,02 ^c	1,51 \pm 0,02 ^b	1,42 \pm 0,01 ^a	1,39 \pm 0,02 ^a	<0,001
Ganancia de peso (%)	350,9 \pm 4,32 ^c	317,6 \pm 3,92 ^b	302,2 \pm 3,56 ^b	255,4 \pm 7,26 ^a	<0,001
SGR ⁴ (%)	1,86 \pm 0,01 ^c	1,76 \pm 0,01 ^b	1,72 \pm 0,01 ^b	1,56 \pm 0,03 ^a	<0,001
FE ⁵	0,89 \pm 0,01 ^a	0,99 \pm 0,03 ^b	1,03 \pm 0,01 ^b	0,99 \pm 0,04 ^b	<0,001
PER ⁶	1,94 \pm 0,01 ^a	2,09 \pm 0,03 ^b	2,30 \pm 0,02 ^c	2,04 \pm 0,01 ^b	<0,001
<i>Composición corporal (% materia húmeda)</i>					
Humedad	67,4 \pm 0,32	67,3 \pm 0,23	67,7 \pm 0,50	68,3 \pm 0,13	0,171
Proteína	16,1 \pm 0,05 ^{ab}	15,9 \pm 0,09 ^a	16,1 \pm 0,12 ^{ab}	16,4 \pm 0,06 ^b	0,017
Lípidos	11,7 \pm 0,16 ^b	11,8 \pm 0,24 ^b	11,4 \pm 0,46 ^{ab}	10,3 \pm 0,05 ^a	0,015
Cenizas	3,49 \pm 0,05	3,61 \pm 0,07	3,67 \pm 0,06	3,77 \pm 0,08	0,097
<i>Ganancia [mg(g)/kg PM/d]</i>					
Nitrógeno (mg)	385,2 \pm 1,99 ^c	367,3 \pm 0,59 ^b	363,9 \pm 2,97 ^b	344,6 \pm 2,19 ^a	<0,001
Lípidos (g)	1,85 \pm 0,04 ^b	1,80 \pm 0,05 ^b	1,70 \pm 0,09 ^b	1,38 \pm 0,02 ^a	0,001
<i>Retención (% ingesta)</i>					
Nitrógeno	31,7 \pm 0,21 ^a	33,6 \pm 0,67 ^a	37,8 \pm 0,27 ^b	38,9 \pm 0,63 ^b	<0,001
Energía	47,3 \pm 0,82 ^b	51,3 \pm 0,75 ^b	51,0 \pm 1,18 ^b	46,6 \pm 0,30 ^a	<0,001

Los datos para el cálculo de los índices hepáticos y de grasa mesentérica se tomaron de 18-20 peces.

Composición corporal inicial: agua 71,1%, proteína 15,4%, lípidos 9,2%, cenizas 3,4 %

¹ Los valores de *P* son el resultado del análisis de la varianza. Diferentes superíndices en cada fila indican diferencias significativas entre los tratamientos experimentales (test de Student Newman-Keuls, *P*<0,05).

² Índice hepatosomático = (100 \times peso hígado) / peso pez.

³ Índice de grasa mesentérica = (100 \times peso grasa mesentérica) / peso pez.

⁴ Tasa específica de crecimiento = [100 \times (ln peso final - ln peso inicial)]/días.

⁵ Conversión del alimento = ganancia de peso / ingesta de alimento.

⁶ Eficiencia proteica = ganancia de peso / ingesta proteica.

El “pool” de aminoácidos libres en el músculo esquelético (con o sin taurina) aumentó con la sustitución de las harinas de pescado por proteínas vegetales (**Tabla 4.9**). Este incremento fue significativo en el caso de la histidina, leucina, treonina, valina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, prolina y serina. Por el contrario, arginina, lisina y taurina disminuyeron con el aumento de proteína vegetal.

Tabla 4.9: Aminoácidos libres en el músculo esquelético ($\mu\text{moles/g}$ peso húmedo) de doradas alimentadas con las dietas experimentales (engorde 2a). Cada valor representa la media \pm error estándar de 6 animales.

Aminoácido	FM	PP50	PP75	PP100	<i>P</i> ¹
ARG	1,43 \pm 0,05 ^c	0,83 \pm 0,02 ^b	0,61 \pm 0,09 ^b	0,24 \pm 0,09 ^a	<0,001
HIS	6,20 \pm 0,43 ^a	8,62 \pm 0,15 ^a	11,24 \pm 0,62 ^b	14,77 \pm 0,88 ^c	<0,001
ILE	0,04 \pm 0,01	0,00 \pm 0,00	0,01 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	0,08
LEU	0,34 \pm 0,03 ^a	0,37 \pm 0,02 ^{ab}	0,47 \pm 0,04 ^b	0,44 \pm 0,02 ^{ab}	0,02
LYS	1,65 \pm 0,19 ^b	1,12 \pm 0,13 ^{ab}	0,98 \pm 0,07 ^a	0,78 \pm 0,10 ^a	0,003
PHE	0,41 \pm 0,03	0,30 \pm 0,04	0,37 \pm 0,03	0,27 \pm 0,03	0,05
THR	0,88 \pm 0,06 ^a	1,24 \pm 0,14 ^{ab}	1,71 \pm 0,23 ^b	2,63 \pm 0,13 ^b	0,001
TYR	0,15 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,17 \pm 0,01	0,62
VAL	0,14 \pm 0,01 ^{ab}	0,13 \pm 0,01 ^a	0,15 \pm 0,01 ^{ab}	0,17 \pm 0,01 ^b	0,04
Ala	1,18 \pm 0,12	1,05 \pm 0,17	1,08 \pm 0,10	0,96 \pm 0,10	0,65
Asn	0,56 \pm 0,13 ^a	1,32 \pm 0,18 ^{ab}	1,62 \pm 0,29 ^{bc}	2,28 \pm 0,18 ^c	0,01
Asp	0,13 \pm 0,02 ^a	0,18 \pm 0,03 ^{ab}	0,35 \pm 0,04 ^{bc}	0,48 \pm 0,07 ^c	0,01
Gln	0,54 \pm 0,09	0,56 \pm 0,10	0,64 \pm 0,10	0,68 \pm 0,10	0,73
Glu	0,46 \pm 0,01 ^a	0,74 \pm 0,06 ^b	0,70 \pm 0,04 ^b	0,79 \pm 0,04 ^b	0,01
Gly	15,64 \pm 1,49 ^a	21,58 \pm 1,93 ^{ab}	25,32 \pm 2,01 ^b	28,11 \pm 1,54 ^b	0,002
Hyp	1,17 \pm 0,08	1,27 \pm 0,11	1,32 \pm 0,24	1,28 \pm 0,07	0,90
Pro	0,44 \pm 0,02 ^a	1,36 \pm 0,17 ^{ab}	2,45 \pm 0,49 ^{bc}	3,17 \pm 0,35 ^c	<0,001
Ser	0,33 \pm 0,03 ^a	0,45 \pm 0,05 ^{ab}	0,53 \pm 0,08 ^b	1,03 \pm 0,13 ^c	0,001
Tau	22,39 \pm 2,02 ^b	17,01 \pm 1,02 ^{ab}	11,78 \pm 1,49 ^a	12,68 \pm 0,39 ^a	0,001
FAA ²	54,08 \pm 0,98 ^a	58,30 \pm 2,87 ^a	61,48 \pm 2,46 ^a	70,94 \pm 2,02 ^b	0,001
IAA ³	11,24 \pm 0,39 ^a	12,78 \pm 0,14 ^a	15,69 \pm 0,87 ^b	19,50 \pm 0,84 ^c	<0,001
DAA ⁴	42,84 \pm 0,66 ^a	45,51 \pm 2,75 ^{ab}	45,79 \pm 1,85 ^{ab}	51,44 \pm 1,18 ^b	0,03
FAA (sin Tau)	31,69 \pm 1,53 ^a	41,28 \pm 2,65 ^b	49,70 \pm 3,78 ^c	58,28 \pm 1,77 ^d	<0,001

¹ Los valores de *P* son el resultado del análisis de la varianza. Diferentes superíndices en cada fila indican diferencias significativas entre los tratamientos experimentales (test de Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

² Aminoácidos libres totales.

³ Aminoácidos esenciales.

⁴ Aminoácidos no esenciales.

La **Tabla 4.10** muestra las actividades enzimáticas de los enzimas claves involucrados en el catabolismo proteico.

Cuando las actividades enzimáticas se expresaron como UI/g de hígado, se observó un descenso significativo tanto de la actividad de la GDH como de la ALAT con el aumento del nivel de sustitución. Sin embargo, ninguno de los enzimas analizados (GDH, ALAT, ASAT) varió significativamente tras la normalización con respecto a la proteína hepática y/o al peso total del animal.

Tabla 4.10: Actividad específica de enzimas hepáticos involucrados en el catabolismo aminoacídico de doradas alimentadas con las dietas experimentales (engorde 2a). Cada valor representa la media \pm error estándar de 6 animales.

Actividad enzimática	FM	PP50	PP75	PP100	P^1
<i>Glutamato deshidrogenasa (GDH)</i>					
UI/g hígado	17,6 \pm 1,14 ^b	14,2 \pm 1,18 ^a	11,3 \pm 0,13 ^a	11,5 \pm 0,61 ^a	0,002
UI/g proteína hepática	0,26 \pm 0,02	0,26 \pm 0,02	0,21 \pm 0,01	0,22 \pm 0,02	0,17
UI/ 100g pez	13,4 \pm 1,43	14,2 \pm 1,2	13,0 \pm 0,98	12,2 \pm 0,61	0,66
<i>Alanina aminotransferasa (ALAT)</i>					
UI/g hígado	53,0 \pm 1,55 ^b	43,1 \pm 3,59 ^a	35,3 \pm 1,35 ^a	38,0 \pm 0,82 ^a	<0,001
UI/g proteína hepática	0,83 \pm 0,04	0,83 \pm 0,07	0,73 \pm 0,03	0,71 \pm 0,02	0,25
UI/ 100g pez	40,8 \pm 3,47	46,9 \pm 4,12	40,8 \pm 3,10	39,4 \pm 2,24	0,55
<i>Aspartato aminotransferasa (ASAT)</i>					
UI/g hígado	136,4 \pm 7,27	115,0 \pm 10,33	100,6 \pm 7,31	116,7 \pm 6,53	0,09
UI/ g proteína hepática	2,11 \pm 0,09	2,18 \pm 0,06	1,94 \pm 0,06	2,24 \pm 0,06	0,13
UI/ 100g pez	104,0 \pm 7,55	112,4 \pm 5,18	106,8 \pm 5,63	126,7 \pm 3,55	0,09

¹ Los valores de P son el resultado del análisis de la varianza. Diferentes superíndices en cada fila indican diferencias significativas entre los tratamientos experimentales (test de Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

Cuando se compararon entre sí los dos tiempos de muestreo (6 y 24 horas post-ingesta), los niveles circulantes de glucosa y TG disminuyeron significativamente ($P < 0,05$) a lo largo del periodo postprandial con independencia del régimen de alimentación.

A las 6 horas post-ingesta, el régimen de alimentación no alteró los niveles circulantes de glucosa. A las 24 horas post-ingesta, se observó cierta tendencia a disminuir con el grado de sustitución, aunque ello sólo fue estadísticamente significativo para los animales alimentados con la dieta PP75 (**Fig. 4.9A**).

A las 6 horas post-ingesta, los niveles circulantes de TG disminuyeron significativamente en los animales alimentados con las dietas PP75 y PP100, no encontrándose diferencias significativas a las 24 horas post-ingesta (**Fig. 4.9B**).

Con independencia del tiempo de muestreo, los niveles circulantes de colesterol disminuyeron marcadamente con el grado de sustitución de las harinas de pescado por proteínas de origen vegetal (**Fig. 4.9C**).

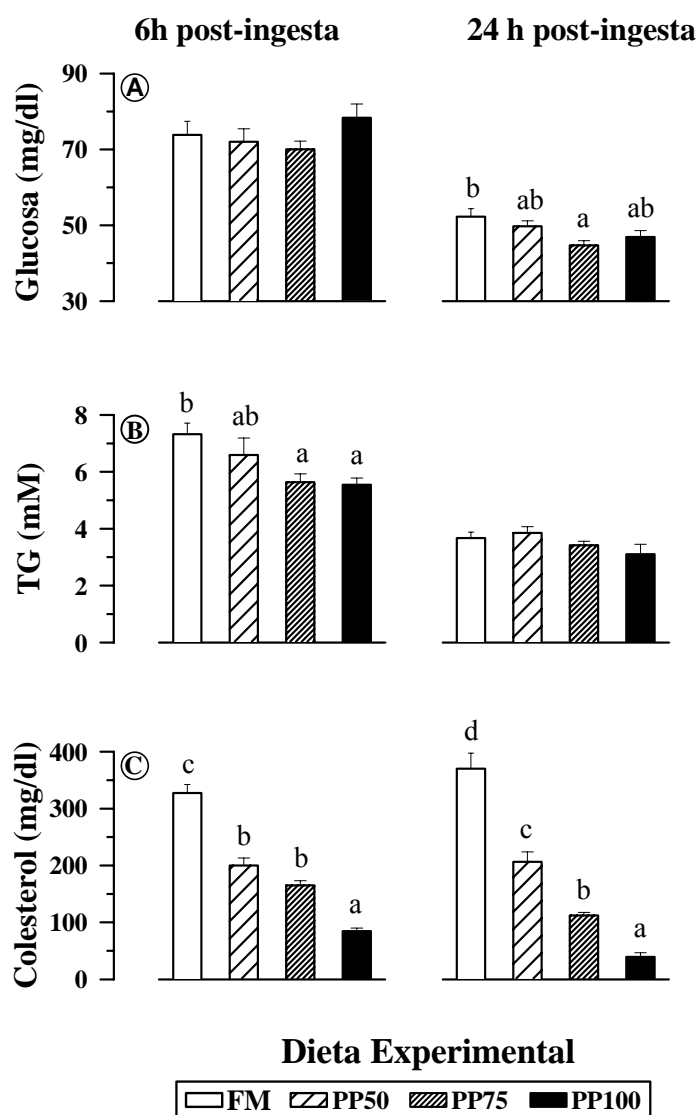


Fig. 4.9: Niveles circulantes de glucosa (A), TG (B) y colesterol (C) a las 6 y 24 horas post-ingesta en doradas alimentadas con las dietas experimentales (engorde 2a). Cada valor representa la media \pm error estándar de 12-15 animales. Valores con distintas letras son significativamente diferentes (test de Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

A las 6 horas post-ingesta, los niveles circulantes de GH no difirieron significativamente entre los grupos experimentales. A las 24 horas post-ingesta, la GH circulante aumentó progresiva y significativamente con la sustitución del 75% y del 100% de las harinas de pescado (**Fig. 4.10A**).

El régimen de alimentación también afectó a los niveles circulantes de IGF-I (**Fig. 4.10B**). No se detectaron diferencias significativas entre el grupo control (FM) y los animales alimentados con la dieta PP50. Sin embargo, los niveles de IGF-I disminuyeron progresiva y significativamente con la sustitución del 75% y del 100%, siendo ello especialmente evidente a las 24 horas post-ingesta.

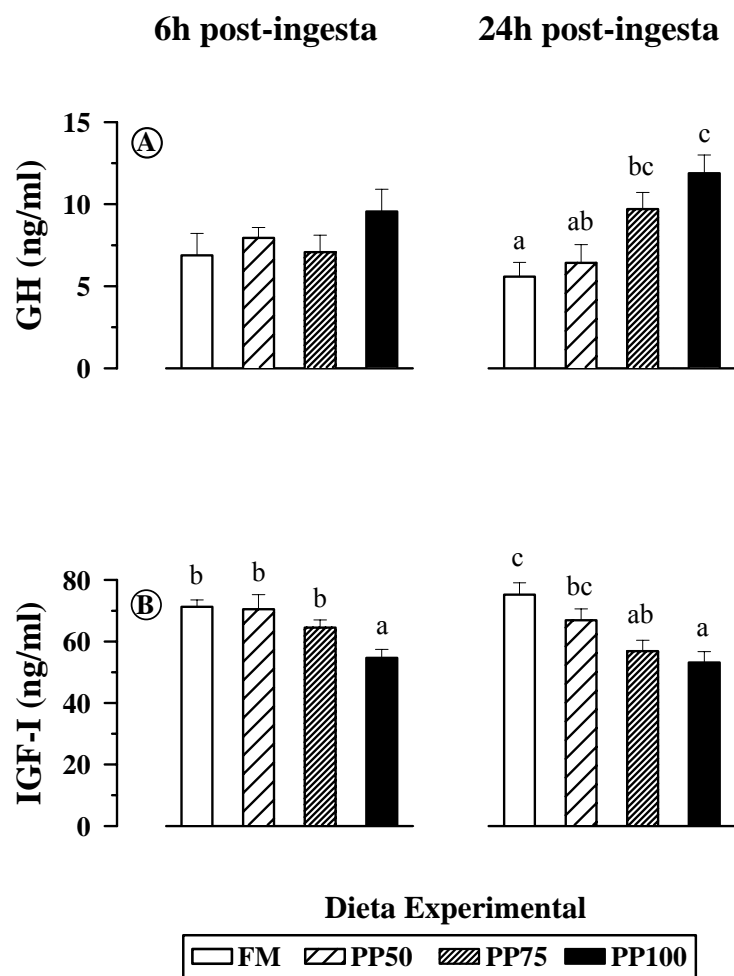


Fig. 4.10: Niveles circulantes de GH (A) e IGF-I (B) a las 6 y 24 horas post-ingesta en doradas alimentadas con las dietas experimentales (engorde 2a). Cada valor representa la media \pm error estándar de 12-15 animales. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes (test de Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

El número de receptores hepáticos de GH (ensayo de radiorreceptores) no se vio alterado significativamente por el régimen de alimentación, aunque existió cierta tendencia a disminuir con el grado de sustitución (**Fig. 4.11**).

Ello estuvo en consonancia con los ensayos de expresión génica llevados a cabo en los dos grupos extremos (FM y PP100), lo que puso de relieve una disminución significativa de la expresión hepática de los GHRs y de la IGF-I en los peces alimentados con la dieta PP100 (**Fig. 4.12**).

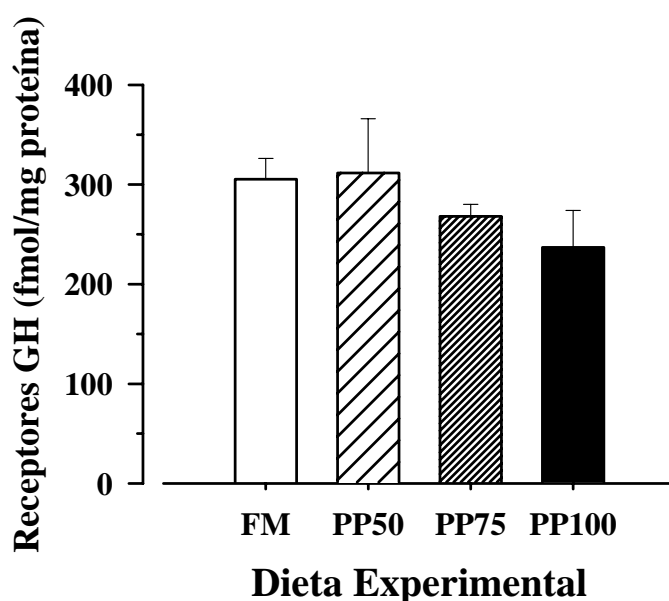


Fig. 4.11: Receptores hepáticos de GH, 24 horas post-ingesta, en doradas alimentadas con las dietas experimentales (engorde 2a). Cada valor representa la media \pm error estándar de 12-15 animales. Valores con distintas letras son significativamente diferentes (test de Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

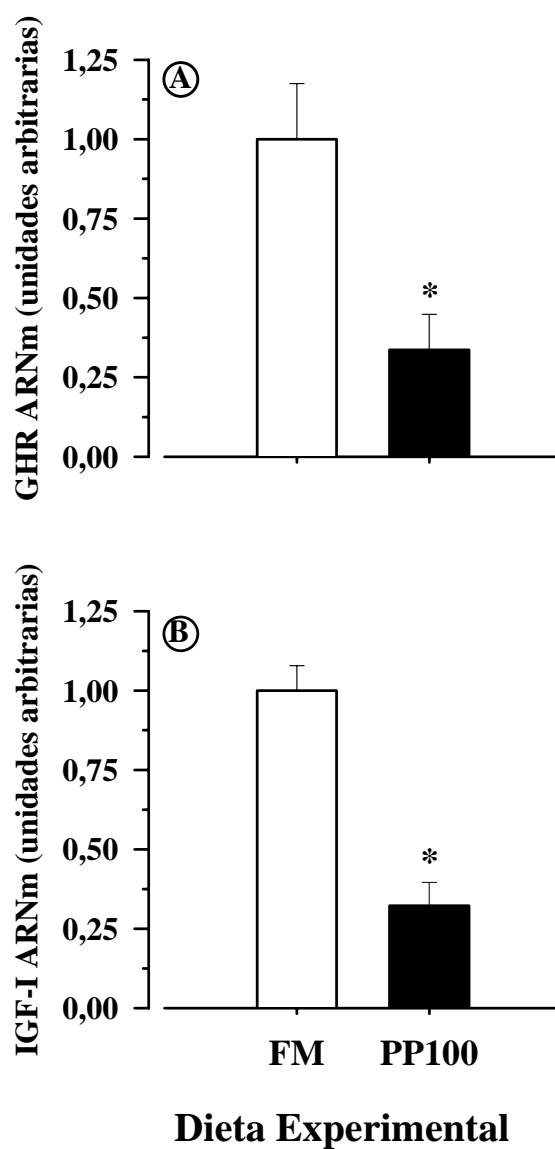


Fig. 4.12: Medida de los transcritos de GHR (A) e IGF-I (B), 24 horas post-ingesta, en doradas alimentadas con las dietas FM y PP100 (engorde 2a). Cada valor representa la media \pm error estándar de 5 animales. Valores con asterisco son significativamente diferentes (test de Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

4.2.3.2. Engorde 3

La **Tabla 4.11** muestra los valores de crecimiento, contenido lipídico del hígado y HSI de los peces alimentados con las dietas experimentales en el engorde 3.

La biomasa de los peces alimentados con las dietas vegetales (PP50, PP75, PP100) disminuyó significativamente con respecto al grupo control (FM). No obstante, el crecimiento de los peces alimentados con las dietas PP50 y PP75 sólo fue ligeramente inferior (2,4% y 4,2%, respectivamente) al de los alimentados con la dieta FM, mientras que la conversión del alimento (FE) mejoró significativamente. El crecimiento de los peces del grupo PP100 disminuyó severamente (21,6%), sin existir diferencias en la conversión del alimento con respecto al grupo FM.

La disminución de la biomasa de los animales alimentados con las dietas vegetales se vio acompañada por una reducción del peso del hígado. No hubo diferencias estadísticamente significativas en el HSI, pero el contenido graso del hígado de los animales alimentados con la dieta PP100 fue significativamente mayor que en los otros tres grupos experimentales.

Tabla 4.11: Crecimiento, contenido graso del hígado y niveles circulantes de glucosa, colesterol y proteínas de doradas alimentadas con las dietas experimentales (engorde 3). Cada valor representa la media \pm error estándar de 3 tanques/dieta.

	FM	PP50	PP75	PP100
Peso inicial (g)	16,4 \pm 0,07	16,7 \pm 0,11	16,5 \pm 0,19	16,4 \pm 0,24
Peso final (g)	200,5 \pm 2,3 ^d	190,9 \pm 1,4 ^c	181,4 \pm 1,3 ^b	123,7 \pm 1,5 ^a
Ingesta (g MS/pez)	238,8 \pm 5,4 ^d	184,5 \pm 1,8 ^c	168,7 \pm 1,9 ^b	127,9 \pm 1,1 ^a
SGR ¹ (%)	1,66 \pm 0,02 ^c	1,62 \pm 0,01 ^{bc}	1,59 \pm 0,01 ^b	1,30 \pm 0,03 ^a
FE ²	0,85 \pm 0,01 ^a	0,95 \pm 0,03 ^b	0,98 \pm 0,01 ^b	0,84 \pm 0,04 ^a
Peso hígado (g)	3,08 \pm 0,23 ^b	2,89 \pm 0,21 ^b	2,16 \pm 0,16 ^{ab}	2,01 \pm 0,20 ^a
HSI ³ (%)	1,61 \pm 0,08	1,53 \pm 0,07	1,35 \pm 0,07	1,56 \pm 0,11
Lípidos hígado (% materia húmeda)	7,09 \pm 0,65 ^a	7,46 \pm 0,13 ^a	9,85 \pm 1,25 ^a	14,3 \pm 1,50 ^b
<i>Metabolitos circulantes</i>				
Glucosa (mg/dl)	59,6 \pm 2,8	64,8 \pm 3,9	63,1 \pm 5,1	62,9 \pm 3,7
Colesterol (mg/dl)	328,4 \pm 20,1 ^d	243,8 \pm 11,4 ^c	170,2 \pm 9,6 ^b	94,9 \pm 6,2 ^a
Proteína (mg/ml)	53,7 \pm 1,4 ^b	48,1 \pm 2,7 ^b	39,9 \pm 1,4 ^a	36,9 \pm 1,1 ^a

El peso del hígado, el contenido graso y los metabolitos circulantes se calcularon en un total de 10-12 peces.

Diferentes superíndices en cada fila indican diferencias significativas entre los tratamientos experimentales (test de Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

¹ Tasa específica de crecimiento = $[100 \times (\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial})] / \text{días}$.

² Conversión del alimento = ganancia de peso / ingesta de alimento.

³ Índice hepatosomático = $(100 \times \text{ peso hígado}) / \text{ peso pez}$.

La estructura hepática fue muy similar en los grupos FM, PP50 y PP75 (**Fig. 4.13A**). En los peces del grupo PP100 se observó una marcada acumulación lipídica, que en algunos casos provocó esteatosis (**Fig. 4.13B**).

Las microvellosidades y el borde en cepillo de la membrana aparecieron normales e intactos en todos los grupos experimentales, sin existir degradación de la mucosa en el lumen intestinal (**Fig. 4.13C**). No obstante, se observó un aumento en el número de vacuolas grasas dentro de los enterocitos de los peces alimentados con las dietas vegetales, así como una deposición supranuclear de gotas proteicas que resultó más evidente en los peces alimentados con la dieta PP100 (**Fig. 4.13D y 4.13E**). Tal acumulación no produjo daños en el epitelio intestinal y no se observaron signos aparentes de necrosis o de degeneración celular.

En todos los peces alimentados con las dietas vegetales, la arquitectura de la submucosa intestinal apareció dilatada y/o hipertrofiada, con tejido conectivo formando capas inconexas (**Fig. 4.13D y 4.13E**) y con una frecuente infiltración celular (principalmente células granulares eosinófilas), que resultó especialmente evidente en los peces alimentados con la dieta PP100 (**Fig. 4.13F**).

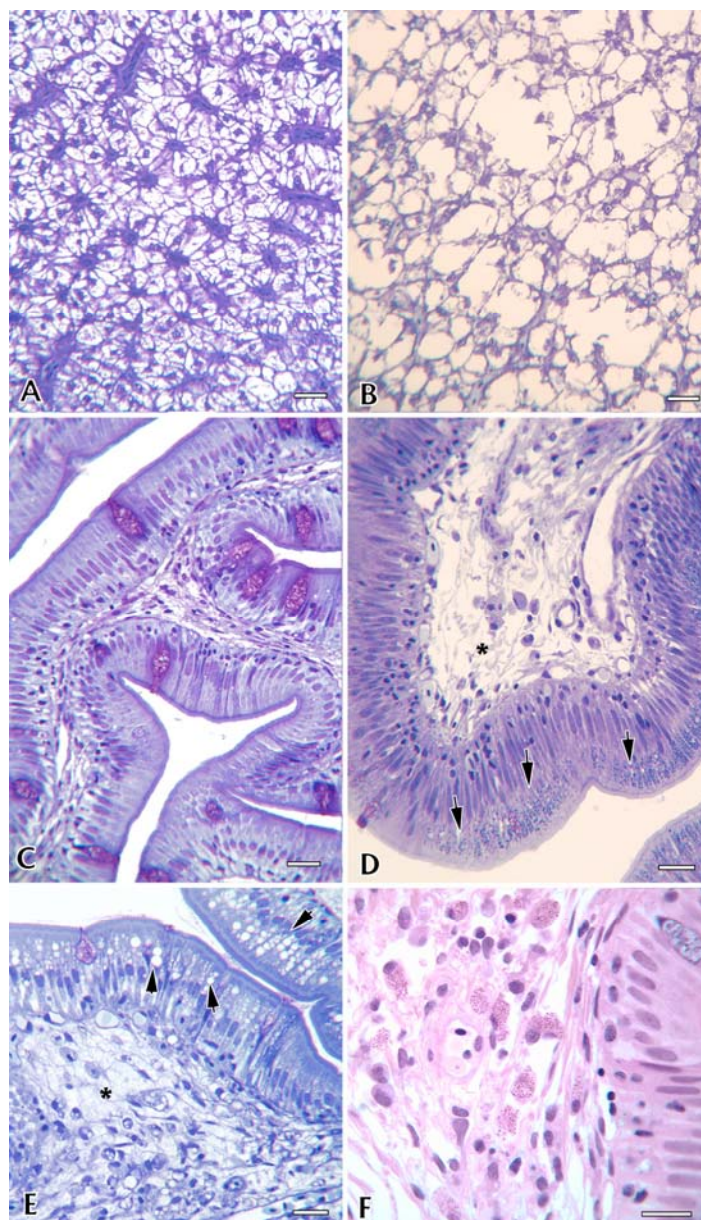


Fig. 4.13: Secciones histológicas de hígado e intestino de doradas alimentadas con las dietas FM (A, C) y PP100 (B, D, E y F) (engorde 3). Es interesante resaltar la diferencia entre un hígado normal (A) y otro con esteatosis (B). El intestino distal normal (C) difiere de los intestinos con deposición supranuclear de gotas proteicas (flecha, D), vacuolización lipídica (flecha, E), y submucosa dilatada/hipertrofiada (* D, E), con infiltración eosinofílica (F). Tinciones: azul de toluidina (A-E) y hematoxilina-eosina (F). Barras=20 μ m.

En la **Fig. 4.14** se muestran los datos relativos a la lisozima sérica y a la actividad hemolítica del complemento por la vía alternativa (ACH_{50}).

Los niveles de lisozima no sufrieron alteraciones con el régimen de alimentación (**Fig. 4.14A**). Por el contrario, la ACH_{50} aumentó en los peces alimentados con la dieta PP50, mientras que disminuyó significativamente en los alimentados con las dietas PP75 y PP100 (**Fig. 4.14B**).

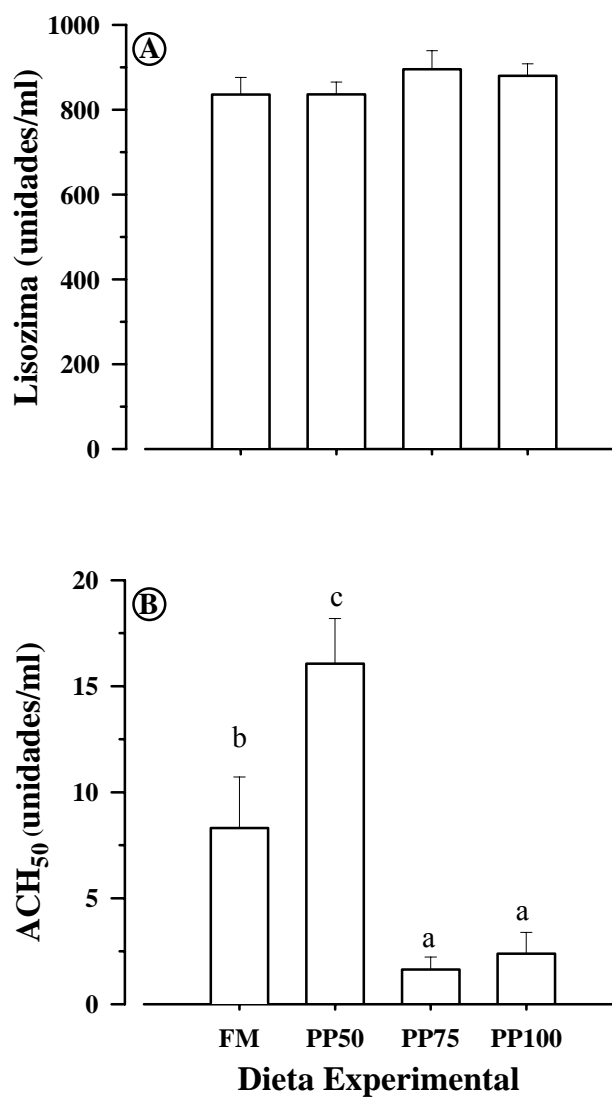


Fig. 4.14: Lisozima sérica (A) y ACH₅₀ (B) en doradas alimentadas con las dietas experimentales (engorde 3). Cada valor representa la media \pm error estándar de 8-10 animales. Valores con distintas letras son significativamente diferentes (test de Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

La actividad MPO de los leucocitos aislados del riñón anterior aumentó progresivamente conforme aumentó el nivel de sustitución, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales (**Fig. 4.15A**). Esta tendencia fue más marcada a nivel plasmático, detectándose diferencias significativas entre los dos grupos extremos (FM y PP100) (**Fig. 4.15B**).

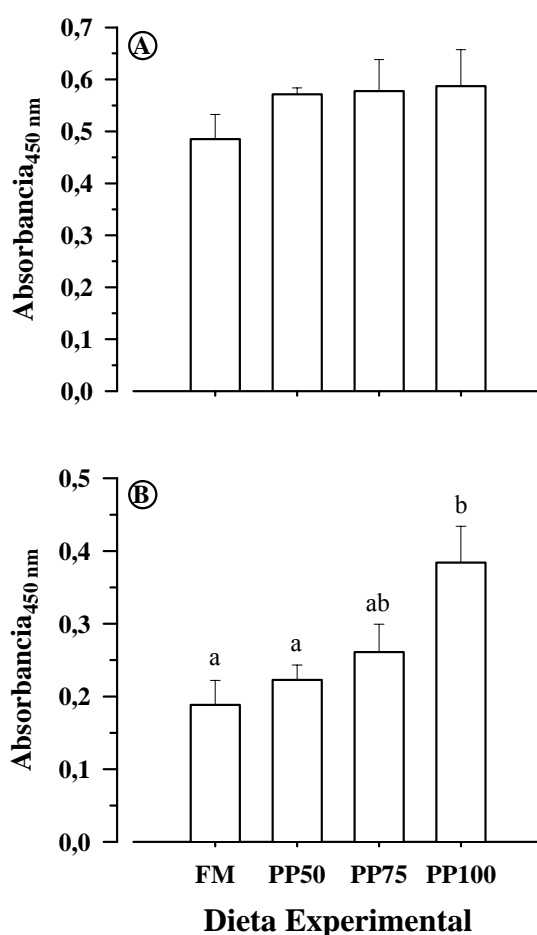


Fig. 4.15: Actividad MPO de leucocitos aislados del riñón anterior (A) y en el plasma (B) de doradas alimentadas con las dietas experimentales (engorde 3). Cada valor representa la media \pm error estándar de 4-10 animales. Valores con distintas letras son significativamente diferentes (test de Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

La **Fig. 4.16** muestra el resultado del estallido respiratorio en leucocitos aislados del riñón anterior tras la estimulación con diéster de forbol. Con la estrategia de sustitución se observó un incremento que fue estadísticamente significativo en los peces alimentados con la dieta PP75.

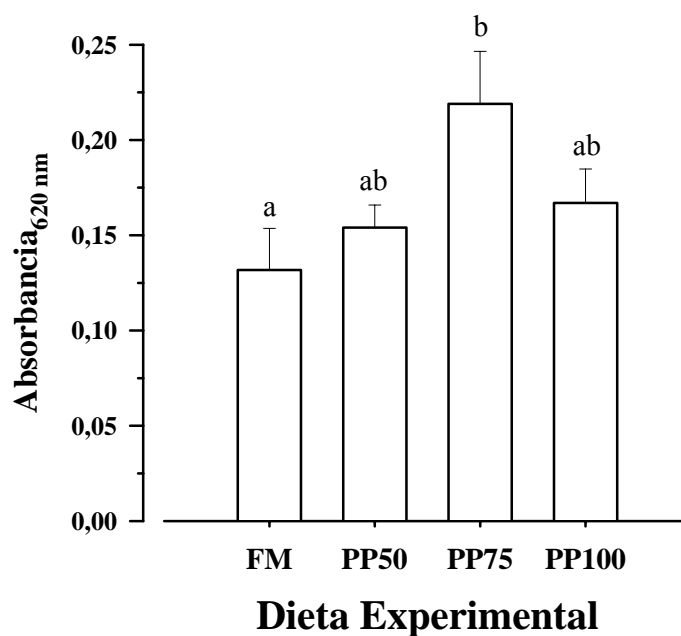


Fig. 4.16: Estallido respiratorio en leucocitos aislados del riñón anterior en doradas alimentadas con las dietas experimentales (engorde 3). Cada valor representa la media \pm error estándar de 4 animales. Valores con distintas letras son significativamente diferentes (test de Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$).

4.2.3.3. Engorde 4

Al final del engorde 4, el peso final no varió significativamente entre los dos grupos experimentales (FM y PP75) (**Tabla 4.12**). Por el contrario, la ingesta de alimento disminuyó significativamente en los peces alimentados con la dieta PP75.

La conversión del alimento (FE) y la eficiencia proteica (PER) mejoraron significativamente en los peces del grupo PP75. La retención proteica también fue significativamente más alta en los peces alimentados con la dieta PP75.

Tabla 4.12: Datos de crecimiento y composición corporal de doradas alimentadas con las dietas experimentales (engorde 4). Cada valor representa la media \pm error estándar de 2 tanques/dieta.

	FM	PP75	<i>P</i> ¹
Peso inicial (g)	99,1 \pm 0,25	99,7 \pm 0,26	0,170
Peso final (g)	431,4 \pm 1,11	427,1 \pm 1,13	0,112
Ingesta (g MS/pez)	526,5 \pm 2,5 ^b	474,5 \pm 0,5 ^a	0,002
Ingesta (%PM/d)	0,48 \pm 0,01 ^b	0,44 \pm 0,01 ^a	<0,001
Ganancia de peso (%)	335,5 \pm 1,18	328,2 \pm 1,19	0,100
SGR ² (%)	0,44 \pm 0,01	0,43 \pm 0,005	0,423
FE ³	0,77 \pm 0,01 ^a	0,83 \pm 0,005 ^b	0,006
PER ⁴	1,76 \pm 0,01 ^a	2,00 \pm 0,005 ^b	<0,001
<i>Composición corporal (% materia húmeda)</i>			
Agua	61,5 \pm 0,38	61,3 \pm 0,54	0,754
Proteína	17,2 \pm 0,16	17,3 \pm 0,03	0,534
Lípidos	14,8 \pm 0,17	15,1 \pm 0,27	0,356
<i>Ganancia [mg(g)/kg PM/d]</i>			
Nitrógeno (mg)	103,3 \pm 1,28	103,3 \pm 0,22	0,954
Lípidos (g)	0,60 \pm 0,01	0,61 \pm 0,01	0,553
<i>Retención (% ingesta)</i>			
Nitrógeno	30,7 \pm 0,41 ^a	35,4 \pm 0,005 ^b	0,008
Energía	46,7 \pm 0,28	47,1 \pm 0,65	0,613

Composición corporal inicial: agua 66,3%, proteína 16,3%, lípidos 10,2%.

¹ Los valores de *P* son el resultado del análisis de la varianza. Diferentes superíndices en cada fila indican diferencias significativas entre los distintos tratamientos (test de Student Newman-Keuls, $P < 0,05$).

² Tasa específica de crecimiento = $[100 \times (\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial})] / \text{días}$.

³ Conversión del alimento = ganancia de peso / ingesta de alimento.

⁴ Eficiencia proteica = ganancia de peso / ingesta proteica.

4.2.4. Discusión

4.2.4.1. Potencial de crecimiento y nivel crítico de sustitución: alteraciones de la ingesta y del sistema somatotrópico

La viabilidad de la sustitución de las harinas de pescado por fuentes proteicas de origen vegetal varía de forma acusada entre las diferentes especies de peces. En la trucha arco iris, una sustitución total de las harinas de pescado por concentrados proteicos de soja (Kaushik y cols., 1995) o combinaciones de diversas fuentes proteicas (Watanabe y cols., 1998) no tiene aparentemente efectos adversos sobre el crecimiento y la conversión del alimento. Por el contrario, en especies de peces típicamente mediterráneas como la lubina (Gouveia y Davies, 2000) y la dorada (Robaina y cols., 1995, 1998; Kissil y cols., 2000; Pereira y Oliva-Teles, 2002), este nivel de sustitución se ha visto a menudo limitado a un 20-30%.

Los trabajos presentados en esta memoria de Tesis Doctoral han puesto de relieve que una sustitución del 75%, basada en mezclas de proteínas vegetales complementadas con IAAs, es totalmente viable en la dorada. No obstante, la sustitución total de las harinas de pescado conlleva una drástica reducción de la ingesta y de la biomasa de los peces en cultivo, hasta el punto que ello parece agudizarse con el tiempo hasta alcanzarse un punto de “no retorno”. Mucho más favorable es la situación encontrada en los animales alimentados con la dieta PP75, ya que este grupo experimental mostró una cierta disminución de la biomasa al final de los engordes a corto y medio plazo, que se vio normalizada con respecto al grupo control a lo largo de un ciclo completo de engorde [la **Fig. 4.17** muestra de forma detallada el crecimiento de los animales (FM vs. PP75) a lo largo de todo un ciclo de engorde].

Por tanto, a nivel práctico, parece plausible la existencia de un crecimiento compensatorio que en última instancia posibilita un alto grado de sustitución (75%). Con ello, a lo largo del proceso de fabricación de las dietas, y subsiguiente engorde, 1 kg de pescado de escaso valor comercial se transforma en 1 kg de pescado de crianza con un alto valor añadido.

En este contexto, es interesante mencionar que los ensayos realizados en colaboración con el Dipartimento di Scienze Zootecniche de la Universidad de Florencia han puesto de relieve una mínima alteración del perfil en ácidos grasos de los filetes de animales alimentados con la dieta PP75, siendo estos peces indistinguibles del grupo control (FM) en pruebas sensoriales y organolépticas realizadas por catadores especializados (de Francesco y cols., 2004a, 2004b, 2005).

La baja palatabilidad, un perfil pobre de IAAs y complejas interacciones sinérgicas entre los factores anti-nutricionales son algunos de los factores involucrados en la inhibición de la ingesta en peces alimentados con dietas vegetales. Esta reducción voluntaria de la ingesta está bien documentada en trucha arco iris (Gomes y Kaushik, 1992) y lubina (Dias y cols., 1997), habiéndose puesto de manifiesto que ciertos aminoácidos tienen un efecto estimulador de la ingesta. En nuestro caso, tal estrategia no pareció totalmente efectiva, al menos en lo que respecta a la sustitución total de las harinas de pescado (dieta PP100). Por consiguiente, la acreción proteica disminuyó especialmente en los animales alimentados con la dieta PP100, aunque tanto en éste como en el grupo alimentado con la dieta PP75 mejoraron a corto plazo (engorde 2a) las tasas de retención proteica (**Tabla 4.8**).

Una posible explicación es que normalmente la mejor tasa de conversión del alimento suele alcanzarse por debajo de la ingesta máxima, aspecto éste que ha sido puesto de relieve con anterioridad en trabajos realizados por nuestro grupo (Company y cols., 1999). Es más, en base a estos mismos trabajos, esta situación se vería agudizada por un ligero descenso del cociente proteína/lípidos de la dieta. En cualquier caso, y con independencia de la fuente proteica, la retención de nitrógeno

(31-39%) en todos los grupos experimentales estuvo claramente en el rango superior descrito para doradas de la misma clase de edad y tamaño (Martí-Palanca y cols., 1996; Company y cols., 1999; Santinha y cols., 1999).

No se detectaron diferencias significativas en la actividad hepática de enzimas claves involucrados en el catabolismo aminoacídico (**Tabla 4.10**), lo que pone de manifiesto una vez más la escasa capacidad de regulación de esta vía metabólica en peces típicamente carnívoros (ver apartado 4.1). No obstante, el incremento con el nivel de sustitución de la concentración de aminoácidos libres musculares sugiere una menor utilización de los mismos para fines biosintéticos (**Tabla 4.9**), lo que directa o indirectamente podría haber contribuido a la drástica reducción de la ingesta en los animales alimentados con la dieta PP100.

La taurina constituye el mejor ejemplo de un patrón opuesto al descrito anteriormente para el conjunto de aminoácidos libres musculares (**Tabla 4.9**). Este aminoácido juega un papel importante en la regulación osmótica (Takeuchi y cols., 2000), llegando a considerarse esencial durante el desarrollo temprano de algunos peces marinos (Park y cols., 2002) al estar involucrado en el mantenimiento de la función retinal (Lima y cols., 1989).

Estudios llevados a cabo en trucha arco iris demuestran que dietas ricas en maíz aumentan la concentración muscular de taurina (Kaushik y Luquet, 1979). De hecho, la presencia de este aminoácido en la fracción de aminoácidos libres musculares está relacionada con la cantidad de aminoácidos sulfurados de la dieta (Yokoyama y Nakazoe, 1992). En nuestro caso, los aportes de metionina y cisteína cubrieron sobradamente los requerimientos de la dorada (Luquet y Sabaut, 1974; Kaushik, 1998) (**Tabla 4.7**), aunque ello no fue suficiente para evitar la disminución de la cantidad de taurina con el mayor nivel de sustitución de las harinas de pescado.

Una posible explicación podría ser que la taurina participa en la conjugación de ácidos biliares (Chesney, 1985), ejerciendo una bien conocida acción hipocolesterolémica en mamíferos

(Park y cols., 1999). Tal efecto se ha puesto de relieve en este trabajo y en otros realizados tanto en dorada (Caballero y cols., 2003) como en otras especies de teleósteos (Kaushik y cols., 1995; Dias, 1999; Regost y cols., 1999; Robaina y cols., 1999). No obstante, no podemos descartar la posibilidad de que la ausencia parcial o total de harinas de pescado ejerza por si misma un efecto hipocolesterolémico.

Como ya se mencionó en el capítulo anterior, el eje somatotrópico proporciona una señal integradora de gran parte de los procesos implicados en la regulación endocrina del crecimiento (Beckman y Dickhoff, 1998; Mingarro y cols., 2002). De acuerdo con ello, la insensibilización hepática a la acción anabólica de la GH responde en la dorada a las alteraciones del potencial del crecimiento, como resultado tanto de la modificación del perfil aminoacídico como de la fuente de proteína de la dieta.

Así pues, en este capítulo se ha observado una disminución paralela de las tasas de crecimiento y de los niveles circulantes de IGF-I con la sustitución de las harinas de pescado (**Fig. 4.10B**). Ello se vio corroborado por una menor expresión a nivel hepático de los GHRs e IGF-I en los animales alimentados con la dieta PP100 (**Fig. 4.12**). A su vez, esta situación comportó el aumento de los niveles circulantes de GH, como consecuencia de una menor retroalimentación negativa por parte de la IGF-I circulante (**Fig. 4.10A**). Estos efectos se observaron de manera gradual con el aumento del nivel de sustitución. De este modo, si bien los animales alimentados con la dieta PP50 no se diferenciaron de los alimentados con la dieta control, el punto de inflexión para el establecimiento de una disfunción a nivel hepático del sistema somatotrópico se fijó en un valor próximo al 75%. En base a esta premisa, se escogió este nivel de sustitución para abordar la viabilidad a largo plazo de una estrategia de alimentación basada en un alto contenido de proteína vegetal.

4.2.4.2. Alteraciones inmuno-histopatológicas

En los animales alimentados con la dieta PP100, el estudio histopatológico reveló dilatación de la submucosa intestinal y, en ocasiones, una grave esteatosis hepática que no llegó a detectarse en los otros grupos experimentales (**Fig. 4.13B**). Según Mourente y cols. (2005), una de las vías por las que se ve favorecida la acumulación de depósitos lipídicos en el hígado es el menor aporte de ácidos grasos omega-3 en la dieta, lo que también debe provocar disfunciones hepáticas en la síntesis y liberación de lipoproteínas (Sargent y cols., 1989; Olsen y cols., 1999, 2000).

En nuestro caso, ello podría reflejar ciertas deficiencias en fosfolípidos que dificultan el empaquetamiento y liberación de lipoproteínas al torrente circulatorio. De hecho, con la sustitución total de las harinas de pescado también se observó acumulación de depósitos lipídicos en los enterocitos del intestino. Este fenómeno es similar al descrito con el aumento de la ración (Sitjà-Bobadilla y cols., 2003) y con la sustitución de aceites de pescado por aceites vegetales (Caballero y cols., 2003). No obstante, en ninguna de estas condiciones experimentales se han observado descamaciones o degeneraciones del epitelio intestinal (**Fig. 4.13E**). A pesar de ello, en el grupo PP100 se puso de relieve una importante infiltración de eosinófilos en la submucosa intestinal (**Fig. 4.13F**), que recuerda a la descrita en el salmón atlántico alimentado con dietas ricas en soja (Baeverfjord y Krogdahl, 1996). En esta especie, pero no en la dorada, este hecho está agravado por otros síntomas propios de la enteritis.

En el salmón atlántico, las harinas de soja también suelen provocar un descenso en la actividad de enzimas digestivos, lo que va asociado a un empeoramiento de la conversión del alimento (Krogdahl y cols., 2003). En nuestro caso, la conversión mejoró o permaneció inalterada en los peces alimentados con las dietas vegetales, lo que podría atribuirse a la ausencia de soja en nuestras dietas experimentales y/o a una menor sensibilidad del tracto gastro-intestinal de la dorada a los cambios de la fuente proteica.

En la última década se ha realizado un importante esfuerzo para analizar los posibles efectos de la dieta sobre la respuesta inmune de los peces (Waagbø, 1994; Fletcher, 1997; Kiron y cols., 2004). Tales estudios se han abordado especialmente en salmónidos y varios autores han demostrado la pérdida de la capacidad inmunológica, así como cambios histopatológicos en el intestino distal, tras la utilización de dietas con una elevada concentración de proteína de soja (Burrells y cols., 1999). Sin embargo, otros trabajos en los que se ha empleado tanto soja (Rumsey y cols., 1994) como alginato (Gabrielsen y Austreng, 1998) han mostrado una activación de diferentes marcadores inmunológicos no específicos, lo que ha sido interpretado como una respuesta inflamatoria o inmunoestimuladora.

En nuestro caso, la inclusión de proteínas vegetales tuvo efectos sobre varios factores antioxidantes y metabólicos que podrían ser considerados como beneficiosos. La mayoría de estos efectos también han sido descritos en mamíferos, asociándolos a la presencia de varias clases de compuestos fenólicos (ácido ferúlico y flavonoides), que tienen una potente actividad antioxidante (Adom y Liu, 2002; Bub y cols., 2003). Además, los flavonoides muestran propiedades anti-inflamatorias, anti-alérgicas, anti-virales y anti-carcinogénicas (Nijveldt y cols., 2001). De acuerdo con ello, un trabajo recientemente publicado por nuestro grupo (Sitjà-Bobadilla y cols., 2005) muestra que la sustitución de las harinas de pescado por proteínas de origen vegetal activa el metabolismo del glutatión y, por tanto, la capacidad antioxidante. Esta conclusión se hizo evidente, tanto en el hígado como en el plasma, al aumentar el cociente GSH/GSSG* con el nivel de sustitución de las harinas de pescado. Dicho cociente está considerado un indicador del estado redox de la célula y del daño oxidativo.

En esta memoria de Tesis Doctoral nos hemos centrado en varios indicadores de la capacidad inmunológica humoral y celular inespecífica, que son la primera línea de defensa antes del desarrollo de una respuesta inmune específica (Fletcher, 1982; Dalmo y cols., 1997). En base a ello, es interesante reseñar la

* GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado.

activación de los leucocitos de animales alimentados con dietas con un alto grado de sustitución, como lo demuestra la mayor producción de anión superóxido en el grupo PP75 y el incremento progresivo de la actividad MPO en animales alimentados con dietas vegetales.

- La MPO es una proteína hemo, independiente del oxígeno, que contiene hierro, y que se localiza en neutrófilos y monocitos catalizando varias reacciones oxidativas. Es un indicador indirecto de la función macrofágica y puede ser usado para evaluar la actividad agresora intracelular. En nuestro estudio, la actividad MPO aumentó significativamente en el plasma de peces alimentados con la dieta PP100, pero no en el riñón anterior (**Fig. 4.15**). Esta diferencia pudo ser debida a un progresivo incremento en el número de leucocitos circulantes (principalmente granulocitos) en los peces alimentados con dietas vegetales, lo que pudo verse enmascarado en el ensayo de riñón anterior tras el ajuste previo del número de células en cultivo.
- El estallido respiratorio comporta la generación de formas reactivas de oxígeno (O_2^-) que poseen elevada actividad microbicida (Babior, 1984). Estudios previos en dorada han evidenciado que la incorporación en la dieta de ingredientes específicos (vitaminas C y E, acetato de retinol, β -glucano, levamisol y levaduras) activa el estallido respiratorio (Mulero y cols., 1998; Castro y cols., 1999; Ortuño y cols., 1999, 2001, 2002; Cuesta y cols., 2002; Rodríguez y cols., 2003). Sin embargo, este trabajo es el primero que demuestra que dicha activación también puede darse con la utilización de diferentes materias primas de uso comercial.

La infiltración masiva de granulocitos eosinófilos en la submucosa intestinal fue, posiblemente, fiel reflejo del incremento de leucocitos circulantes. Este hecho pudo haber provocado un daño peroxidativo como consecuencia de una elevada generación de radicales libres de oxígeno (Ahmad I y cols., 2004), aunque ello pudo verse contrarrestado por la

estimulación de varios enzimas anti-oxidantes del sistema del glutatión (Sitjá-Bobadilla y cols., 2005).

Otros indicadores inmunológicos no se vieron afectados o incluso disminuyeron:

La lisozima plasmática no varió significativamente entre los diferentes grupos experimentales (**Fig. 4.14A**). Esta es una enzima bacteriolítica, ampliamente distribuida por el organismo, que provoca la ruptura de las membranas celulares por choque osmótico durante diferentes procesos infecciosos y reacciones inflamatorias (Alexander, 1985; Ellis, 1990).

La actividad del complemento aumentó inicialmente en el grupo PP50, pero disminuyó significativamente en los peces alimentados con elevados niveles de proteínas vegetales (PP75 y PP100) (**Fig. 4.14B**). El complemento es un sistema de proteínas plasmáticas cuya activación conlleva una serie de reacciones en cascada, de modo que el precursor proteico activado da lugar a una enzima cuyo sustrato es otro componente del complemento. De este modo, se generan numerosos mediadores de inflamación, biológicamente activos, que desembocan en la destrucción de la membrana celular de los patógenos invasores (Alexander, 1985; Ingram, 1990; Yano, 1992; Gorman y Halliwell, 1992).

El aumento en la actividad del complemento en el plasma de los peces alimentados con la dieta PP50 pudo ser debido a una estimulación de su producción, que pareció verse completamente sobrepasada con niveles más elevados de inclusión de proteínas vegetales. De hecho, el estado de descomplementación de los grupos PP75 y PP100 puede ser atribuido a una menor producción y/o a un mayor consumo. Tanto en peces como en mamíferos, el componente C3 de la cascada del complemento es mayoritariamente producido a nivel hepático, y las posibles alteraciones metabólicas que acompañan a la progresiva degeneración grasa del hígado en los grupos PP75 y PP100 pudo haber mermado esta capacidad biosintética (Abelseth y cols., 2003). Además, algunos de los componentes vegetales (grupos amino o hidroxilo de carbohidratos o proteínas) podrían haber

producido un consumo masivo de complemento a través de la activación de la ruta alternativa.

A título comparativo podemos reseñar que varios autores no han encontrado ninguna relación entre la actividad del complemento y la fuente de proteínas de la dieta (Gabrielsen y Austreng, 1998). No obstante, en la dorada, la actividad del complemento se incrementó con la adición a la dieta de vitamina C (Montero y cols., 1999; Ortuño y cols., 1999), acetato de α -tocoferol (Ortuño y cols., 2000), vitamina E (Montero y cols., 1999; Ortuño y cols., 2001) y levamisol (Mulero y cols., 1998). Por el contrario, la incorporación en la dieta de extractos de *Saccharomyces cerevisiae* (Rodríguez y cols., 2003) o aceite de soja (Montero y cols., 2003) provocan un descenso en la actividad hemolítica de la dorada.

En base a lo expuesto anteriormente, el aumento de la actividad MPO y del estallido respiratorio tras la ingesta de dietas vegetales podría ser útil para combatir la oxidación de PUFAs* (Bell y Cowey, 1985), el estrés generado por el ayuno (Pascual y cols., 2003), la radiación ultravioleta en jaulas de cultivo (Zagarese y Williamson, 2001), la presencia de contaminantes químicos (Peña-Llopis y cols., 2003), a la vez que aumentar la resistencia a diferentes procesos infecciosos (Belló y cols., 2000). Sin embargo, la disminución de los niveles del complemento con elevados niveles de sustitución (75-100%) podría comprometer la capacidad de respuesta ante posibles agentes infecciosos. En este contexto, niveles bajos de complemento en dorada han sido asociados con la “enfermedad de invierno”, causante de una sintomatología caracterizada por una distensión abdominal producida por la acumulación de abundante líquido ascítico así como queratitis, petequias, úlceras en la piel y enrojecimiento de la boca y base de las aletas (Bovo y cols., 1995; Berthe y cols., 1995; Doimi, 1996; Doménech y cols., 1999).

* Acidos grasos poli-insaturados.

En cualquier caso, tomando en conjunto todos los resultados, parece factible una sustitución elevada (75%) de las harinas de pescado por ingredientes de origen vegetal durante un ciclo completo de engorde. De este modo, no se compromete el potencial de crecimiento e incluso se ve mejorada la conversión final del alimento. Además, a diferencia de lo observado con la dieta PP100, con el 75% de sustitución no se advierten alteraciones graves de la estructura hepática ni del tracto gastrointestinal, lo que en gran parte estaría relacionado con disfunciones del metabolismo lipídico.

Los mecanismos implicados en estas disfunciones metabólicas no se han definido totalmente. No obstante, tras la clonación y secuenciación de la lipoproteína lipasa (LPL) de dorada, hemos abordado en nuestro laboratorio diferentes análisis de expresión génica. Esta enzima cataliza la hidrólisis de los TG de quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) como paso previo a la captación de ácidos grasos por tejidos hepáticos y extra-hepáticos (Liang y cols., 2002; Lindberg y Olivecrona, 2002; Oku y cols., 2002). De acuerdo con ello, el hecho de que la expresión de la LPL a nivel hepático fuera mayor en los animales del grupo PP100 en relación a los del grupo control explicaría la elevada deposición grasa del hígado con la sustitución total de las proteínas de pescado (**Fig. 4.18A**). Así mismo, se ha observado una regulación opuesta en el tejido adiposo peri-visceral, que estaría en consonancia con la menor retención lipídica observada para el conjunto del organismo en el grupo PP100 (**Fig. 4.18B**).

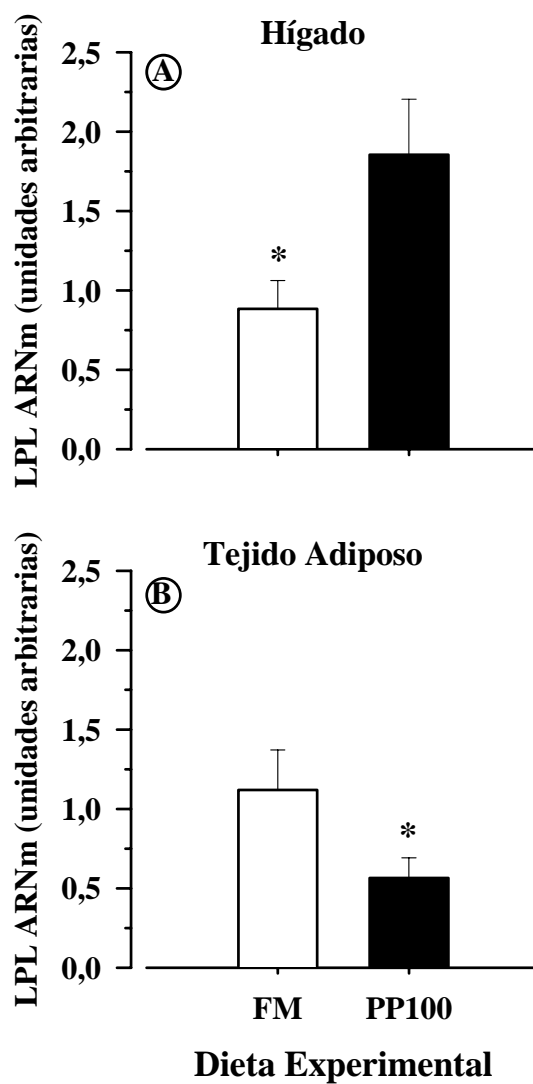


Fig. 4.18: Expresión génica de la LPL en el tejido adiposo (A) y en el hígado (B) de doradas alimentadas con las dietas FM y PP100 (modificado de Saera-Vila y cols., 2005b).

Todo ello no hace más que ahondar en la importancia del estudio del metabolismo lipídico en diferentes estados nutricionales. Recientemente, estudios llevados a cabo en el marco de la red europea FORM han puesto de relieve que es factible un 80% de sustitución de aceites de pescado por aceites vegetales en dietas de engorde de dorada (resultados no publicados). No obstante, los problemas que pueden derivarse de una sustitución total (tanto de harinas como de aceites) deben verse potenciados en una sustitución conjunta. Es por ello que, en el marco de nuevos proyectos nacionales y europeos, el Grupo de Nutrición y Endocrinología del Crecimiento del IATS ha iniciado las experiencias de sustitución conjunta utilizando una estrategia similar a la descrita a lo largo de esta memoria de Tesis Doctoral, pero abordando también el estudio de diferentes marcadores del metabolismo lipídico [LPL, factores de necrosis tumoral (TNFs) y factores transcripcionales liberadores de peroxisomas (PPARs)].

4.3

Disfunciones del sistema somatotrópico de la trucha por dietas basadas en harinas vegetales

4.3.1. Introducción

En peces y vertebrados superiores, la GH juega un papel clave en la regulación de la cascada endocrina implicada en diferentes funciones fisiológicas (Björnsson, 1997; Pérez-Sánchez, 2000). En mamíferos, esta hormona hipofisaria ejerce su función a través de una interacción directa con el GHR de la membrana celular del tejido diana, desencadenando una serie de fosforilaciones que estimulan la expresión de varios genes de interés (Behncken y Waters, 1999; Zhu y cols., 2001).

El mecanismo por el que se produce la transmisión de la señal intracelular del GHR es poco conocido en peces, aunque dicho receptor ha sido clonado y secuenciado en varias especies: carpín dorado (*Carassius auratus*) (Lee y cols., 2001), rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Calduch-Giner y cols., 2001), chopo (*Acanthopagrus schlegeli*) (Tse y cols., 2003), dorada (*Sparus aurata*) (Calduch-Giner y cols., 2003), pez gato (*Silurus meridionalis*; n° de acceso AY336104), halibut japonés (*Paralichthys olivaceus*; n° de acceso AB058418), carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*; n° de acceso AY283778), salmón plateado (*Oncorhynchus kisutch*; n° de acceso AF403539 y AF403540) y salmón masu (*Oncorhynchus masou*) (Fukada y cols., 2004). Además, nuestro grupo ha abordado recientemente el estudio de la organización genómica del GHR en perciformes y peces planos (Pérez-Sánchez y cols., 2002).

La **Fig. 4.19** representa de manera esquemática la organización intrón-exón de los GHRs de varias especies de vertebrados: el exón 2 (naranja) codifica el péptido señal, los exones 3-7 (azul) codifican los dominios extracelulares, el exón 8 (gris) codifica el dominio transmembrana y los exones 9, 10 y 10A codifican el dominio intracelular (rojo) y 3'UTR (verde). Ello revela una gran conservación de las uniones exón-intrón durante la evolución de los vertebrados, a pesar de la existencia de un intrón exclusivo de peces (10/10A) en el extremo C-terminal.

En la chopa, el procesamiento alternativo del intrón 10/10A genera una isoforma larga con una inserción de 93 pb* que no altera la pauta de lectura (Tse y cols., 2003). En dorada y rodaballo, el intrón 10/10A no está sujeto a procesamiento alternativo, por lo que no se han detectado isoformas largas. Sin embargo, en el rodaballo hemos demostrado la existencia de transcritos que codifican para formas truncadas de GHRs (Calduch-Giner y cols., 2001). Estas isoformas de 325 aminoácidos (**Fig. 4.20**) comprenden el dominio extracelular y de transmembrana, los primeros 28 aminoácidos del dominio intracelular y una secuencia divergente de 21 aminoácidos antes de alcanzar un codón de parada, que es el resultado del procesamiento alternativo del extremo 5' del intrón 9/10 (Pérez-Sánchez y cols., 2002).

* Pares de bases.

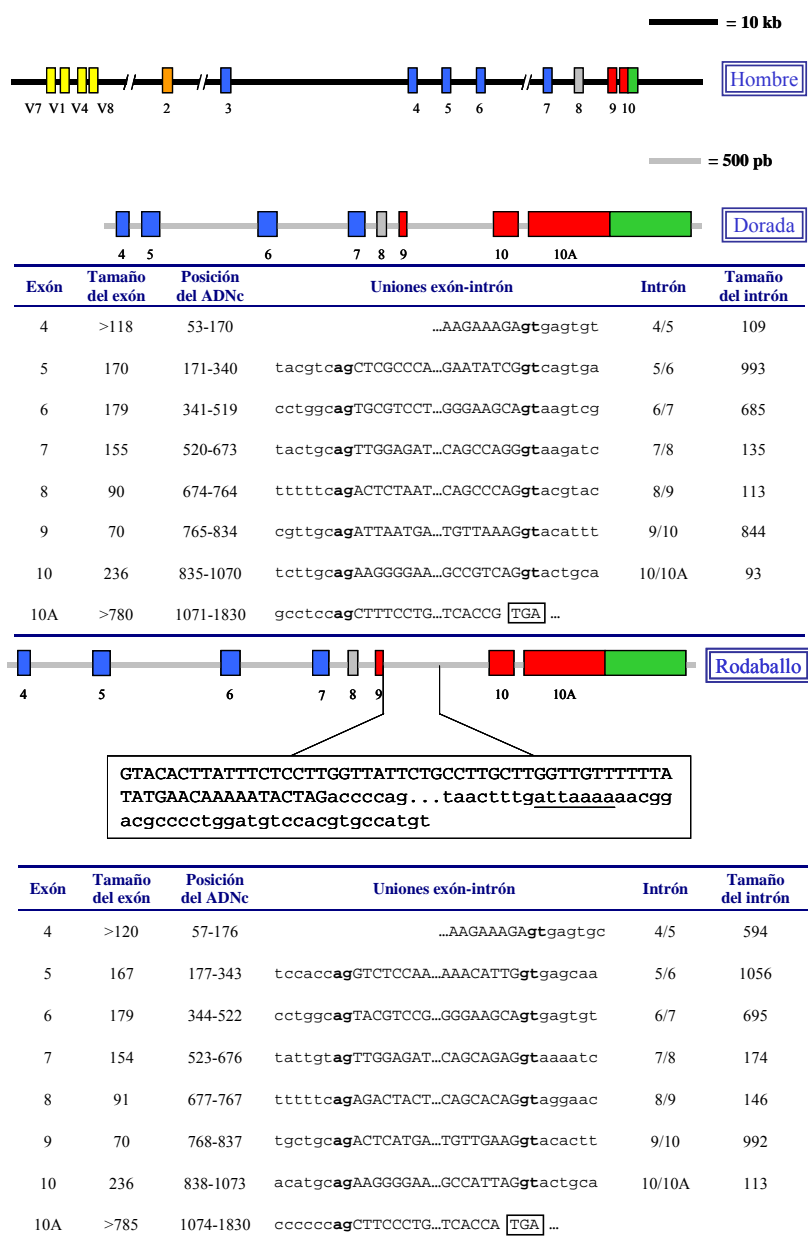


Fig. 4.19: Representación esquemática de la organización intrón-exón de los GHRs de humanos (GenBank: AH002706), dorada (GenBank: AY345330) y rodaballo (GenBank: AY345329). Las uniones exón-intrón de los GHRs de dorada y rodaballo están indicadas en las tablas. La secuencia divergente correspondiente al intrón 9/10, que origina la forma truncada del GHR en rodaballo, está ampliada en el recuadro (modificado de Pérez- Sánchez y cols., 2002).

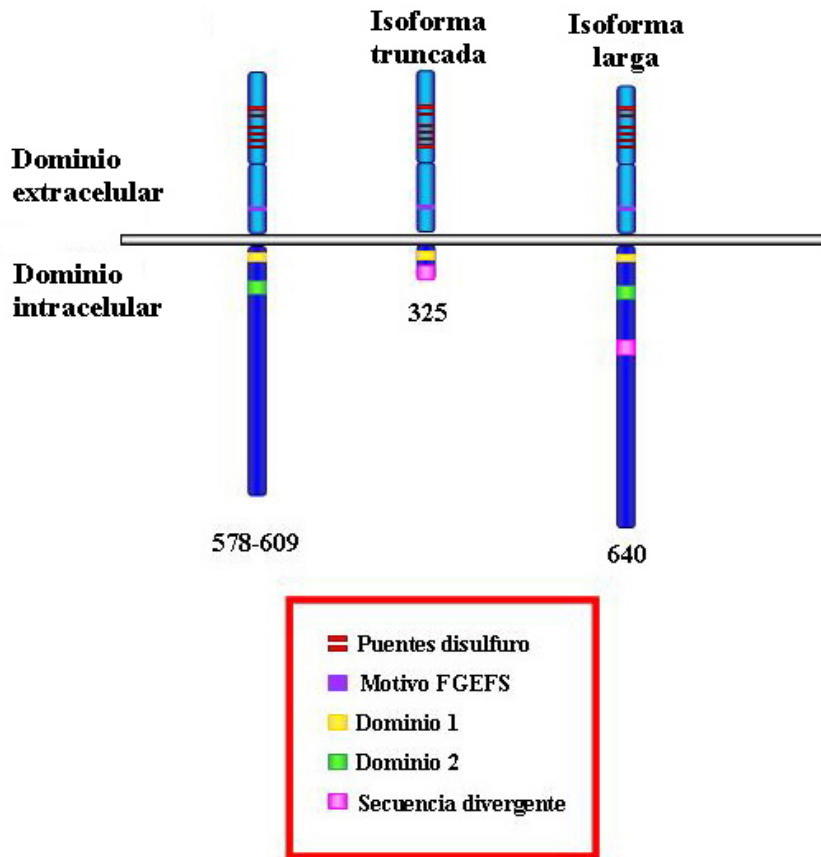


Fig. 4.20: Representación esquemática de los GHRs de peces con isoformas truncadas y largas. El número inferior indica la longitud de la proteína (modificado de Pérez-Sánchez y cols., 2002).

La regulación transcripcional de los GHRs de peces todavía está en una fase incipiente, pero estudios llevados a cabo en chopo muestran la disminución de la expresión del GHR con el ayuno (Deng y cols., 2004). Resultados similares han sido descritos por Fukada y cols. (2004) en el salmón masu. Así mismo, nuestro grupo ha puesto de relieve un incremento de la expresión del GHR e IGFs con el incremento estival del crecimiento de la dorada (Calduch-Giner y cols., 2003). Además, tal y como se ha descrito en el capítulo anterior, la sustitución total de las harinas de pescado por harinas vegetales comporta una insensibilización hepática a la acción anabólica de la GH, que va acompañada de la reducción de la expresión de IGF-I y de los GHRs hepáticos.

Por consiguiente, abordamos en la trucha un estudio similar con el objeto de determinar los efectos de la fuente de proteína sobre el sistema somatotrópico. Para ello, en una primera instancia se clonó y secuenció el GHR de trucha, analizándose los cambios acontecidos tanto a nivel hepático como extra-hepático en la expresión de GHRs e IGFs. Paralelamente, también se determinaron los niveles circulantes de GH, IGF-I y proteínas de transporte de IGFs (IGFBPs).

4.3.2. Material y métodos

4.3.2.1. Diseño experimental

Se formularon dietas isoproteicas e isolipídicas basadas en harinas de pescado (FM) e ingredientes vegetales, de modo que sustituyeran el 50% (PP50), 75% (PP75) y 100% (PP100) de las harinas de pescado (**Tabla 4.13**).

Tabla 4.13. Composición química y coeficientes de digestibilidad aparentes (CDA) de las dietas utilizadas en el engorde 2b de trucha (para más detalles ver apartado 3.2.2).

	FM	PP50	PP75	PP100
<i>Composición analítica</i>				
Materia seca (MS, %)	94,4	92,2	91,5	91,6
Proteína (% MS)	51,5	50,3	49,1	48,6
Lípidos (% MS)	19,7	19,6	19,6	19,2
Energía (kJ/g MS)	22,7	23,5	23,9	23,6
IAA ¹ (%MS)	22,2	22,9	22,1	23,9
DAA ² (% MS)	21,8	23,3	22,1	23,7
IAA/DAA	1,0	0,9	1,0	1,0
<i>Valores de CDA (%)</i>				
Materia seca	83,4	79,2	76,8	72,0
Proteína	93,4	93,7	93,9	93,6
Lípidos	95,6	92,8	91,6	90,3
Carbohidratos	99,2	80,7	75,5	56,2
Energía	92,0	87,8	86,4	82,7

¹ Aminoácidos esenciales.

² Aminoácidos no esenciales.

Para imitar el perfil aminoacídico ideal de la trucha, se añadieron cantidades crecientes de IAAs a las dietas con ingredientes de origen vegetal. Con el objeto de medir los coeficientes de digestibilidad aparentes (CDA), se llevó a cabo

una experiencia paralela en la que se añadió a las dietas experimentales un 1% de óxido crómico como trazador inerte.

Las dietas fueron administradas durante 11 semanas (21 marzo-7 junio del 2002) a juveniles de trucha distribuidos en tanques de 1000 litros (4 tanques/dieta). El alimento fue distribuido a saciedad visual dos veces al día (09:00, 14:00).

Cada 3 semanas, los peces fueron ligeramente anestesiados, contados y pesados colectivamente. La composición corporal (ver apartado 3.4) se determinó al principio del engorde en una muestra conjunta de 15 animales; y en grupos de 6 animales por tanque al final de la experiencia.

Al final del periodo de engorde, y tras sacrificar a los animales de un golpe seco en la cabeza, se tomaron muestras de tejidos a las 24 horas post-ingesta. El hígado, el músculo esquelético y el tejido adiposo fueron rápidamente congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C hasta realizar los ensayos de radiorreceptores (ver apartado 3.7.3) y de expresión génica (ver apartado 3.8).

Adicionalmente, se extrajo sangre por punción caudal con jeringas heparinizadas. El plasma, obtenido tras centrifugar la sangre a 3000 g (20 min, 4 °C), se almacenó a -30 °C hasta la realización de los análisis hormonales (ver apartado 3.7).

4.3.2.2. *Clonación y secuenciación del GHR de trucha*

El ARN purificado (ver apartado 3.8.1) fue tratado con DNasa I, realizándose la transcripción inversa (2 µg) con 200 U de Superscript II (Life Technologies, Gaithersburg, MD) y oligo (dT)₁₇ como cebador. Los cebadores degenerados con sentido (GHR1: 5'-GGA GAC NTT YCG NTG YTG GTG GA) y anti-sentido (GHR2: 5'-TGT CGG ACA CCT GGG CRT ARA ART C) fueron diseñados en base a las secuencias de los GHRs de rodaballo y dorada (Calduch-Giner y cols., 2001, 2003).

En la PCR, el producto de reacción de la transcriptasa inversa (2 µl) fue amplificado en un volumen final de 50 µl: 1 µM de cebadores con sentido y anti-sentido, 0,2 mM de cada dNTP y 2,5 U de Platinum *Taq* DNA Polymerase (Life Technologies). Después de 35 ciclos (94 °C, 1 min; 54 °C, 2 min; 72 °C, 3 min), los fragmentos amplificados fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa, purificándose las bandas de interés (Wizard PCR Preps, Promega). Estas bandas fueron secuenciadas por la técnica de terminación en cadena (ABI PRISM dRhodamine terminator cycle sequencing kit, Perkin-Elmer, Wellesley, MA). La secuencia resultante fue depositada en la base de datos de GenBank con número de acceso AF438178.

4.3.2.3. Estructura y análisis filogenético de los GHRs

Las posibles regiones transmembrana fueron predichas con el programa HMMTOP v 2.0 (<http://www.enzim.hu/hmmtop>) (Tusnády y Simon, 2001). Los sitios potenciales de N-glicosilación se determinaron con el paquete informático Gene Runner v 3.02 (Hastings Software, Hastings, NY). El alineamiento de las secuencias proteicas se realizó con el paquete informático ClustalX (Thompson y cols., 1994). La comparación filogenética de las secuencias se llevó a cabo con el paquete informático MEGA 2.1 (Kumar y cols., 2001).

4.3.2.4. Northern Blot

Una sonda de ADN copia (ADNc) con 552 nt* del dominio extracelular del GHR de trucha se amplificó empleando cebadores con sentido (5'-GAA TTC ACG GAA CCC GGA GCA CTG) y anti-sentido (5'-GAA TTC CGT TGA CTC TTT ATT GGG A). Los fragmentos amplificados se insertaron en el vector pGEM-T (Promega), que se empleó para transformar *Escherichia coli* (cepa JM109). Los plásmidos recombinantes fueron purificados (SV Minipreps, Promega) tras cortar la sonda con enzimas de restricción. Los fragmentos purificados se

* Nucleótidos.

desnaturalizaron y se sintetizaron cadenas complementarias marcadas con 20 μCi [^{32}P]-dCTP (Decalabel DNA Labeling Kit, Fermentas, Hanover, MD), empleando decanucleótidos aleatorios como cebadores.

En los ensayos de *Northern blot*, el ARN total hepático (30 μg) se separó en geles de agarosa/formaldehído al 1% (condiciones desnaturalizantes), se transfirió por vacío a membranas de nylon positivamente cargadas (BioRad) y se fijó con luz ultravioleta. La pre-hibridación (3 h) y la hibridación (15-20 h) se realizaron a 65 °C en tampón sodio-fosfato 0,5 mM (pH = 7,2) con EDTA 1 mM, SDS al 7% y BSA al 1%. Después de varios lavados a temperatura ambiente, las membranas se secaron y se expusieron a -80 °C frente a películas Biomax MS (Kodak) durante 7 días.

4.3.3. Resultados

4.3.3.1. Caracterización molecular del GHR de trucha

La secuencia parcial del GHR de trucha se determinó mediante RT-PCR, empleando cebadores degenerados basados en las secuencias disponibles de GHRs de peces no salmónidos.

La amplificación por PCR dio lugar a un único fragmento de ADNc con seis lugares potenciales de N-glicosilación, cuatro de los cuales están muy conservados en peces (**Fig. 4.21**).

Este fragmento de ADNc mostró una estricta conservación de los otros motivos estructurales de los GHRs: seis residuos extracelulares de cisteínas (C2-C7), el motivo de unión (Y/F)GEFS característico de los GHRs, un único dominio transmembrana de 24 aminoácidos hidrofóbicos, los dominios citoplasmáticos 1 y 2 (ricos en prolinas) y cuatro residuos intracelulares de tirosinas (Y1-Y4) (**Fig. 4.22**).

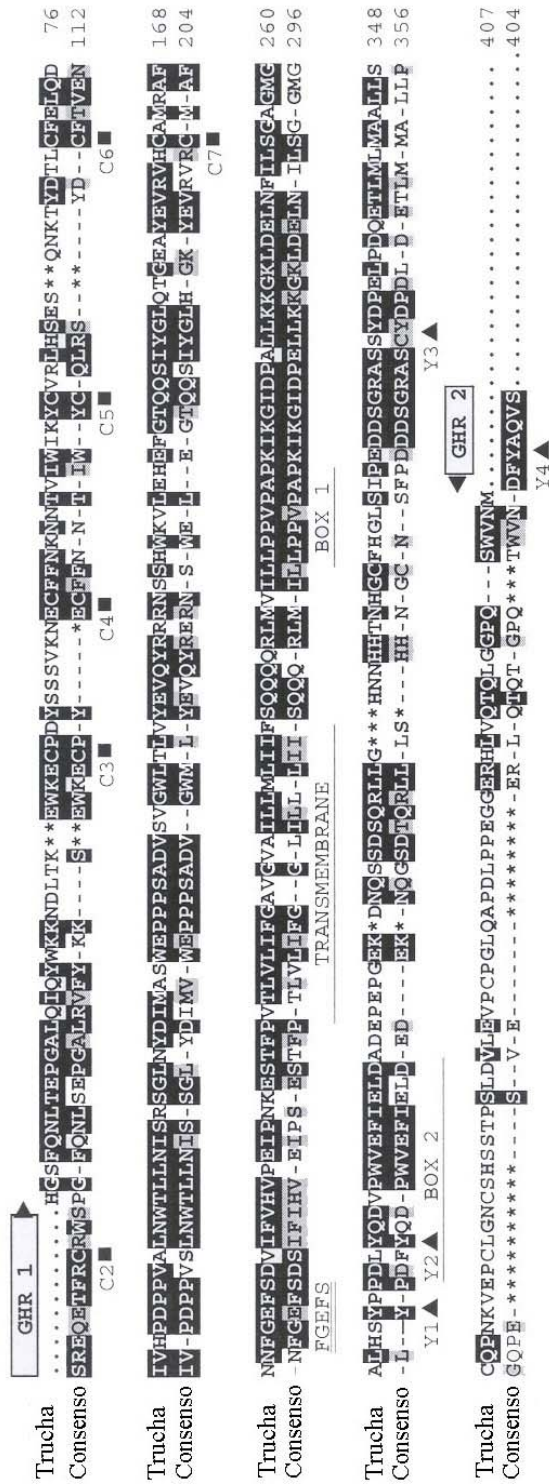


Fig. 4.22: Alineamiento aminoacídico mediante CLUSTALX del GHR de trucha y la secuencia consenso de GHRs de peces no salmónidos [pez gato (AY336104), carpín dorado (AF293417), carpa herbívora (AY283778), chopa (AF438176), chopa (AF502071), rodaballo (AF352396) y halibut japonés (AB058418)]. Aminoácidos idénticos y homólogos en trucha y en la secuencia consenso están en negro. Los guiones en la secuencia consenso indican falta de conservación. Letras con fondo blanco en la secuencia consenso indican una conservación aminoacídica mayor del 50%, fondo gris indica una conservación superior al 65% y fondo negro indica una conservación del 85%-100%. Los asteriscos indican posiciones donde se han introducido *gaps* para un mejor alineamiento. El dominio transmembrana, el motivo FGEEFS y los dominios 1 y 2 están indicados. Los residuos extracelulares de cisteínas y los intracelulares de tirosinas están marcados por cuadrados y triángulos

El *Northern blot* de ARN hepático mostró la expresión de un único transcrito de un tamaño aproximado de 8 Kb (**Fig. 4.23**).

La identidad aminoacídica de la región codificante de la proteína madura del GHR de trucha fue relativamente alta en comparación con las secuencias de GHRs de peces no salmónidos (rodaballo, 58%; chopra, 57%; dorada y halibut japonés, 56%; carpa herbívora y carpín dorado, 55%; pez gato, 47%), descendiendo hasta el 45% en el caso del salmón plateado y del salmón masu.

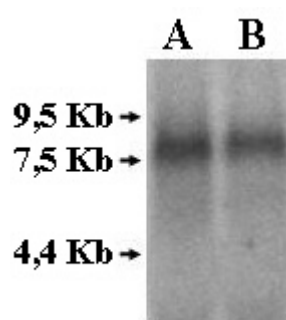


Fig. 4.23: *Northern blot* de ARN hepático total con una sonda de ADNc extracelular codificante para el GHR de trucha (engorde 2b). (A) Peces alimentados con la dieta FM, (B) Peces alimentados con la dieta PP100.

En el análisis filogenético, los GHRs de peces se englobaron en un mismo grupo al incluir los GHRs de tetrápodos como un grupo aparte. Dentro del grupo de los peces se diferenciaron dos sub-nodos, formados por un lado por el GHR de trucha y los GHRs de peces no salmónidos, y por otro lado por las secuencias anteriormente descritas de GHRs de salmónidos (**Fig. 4.24**).

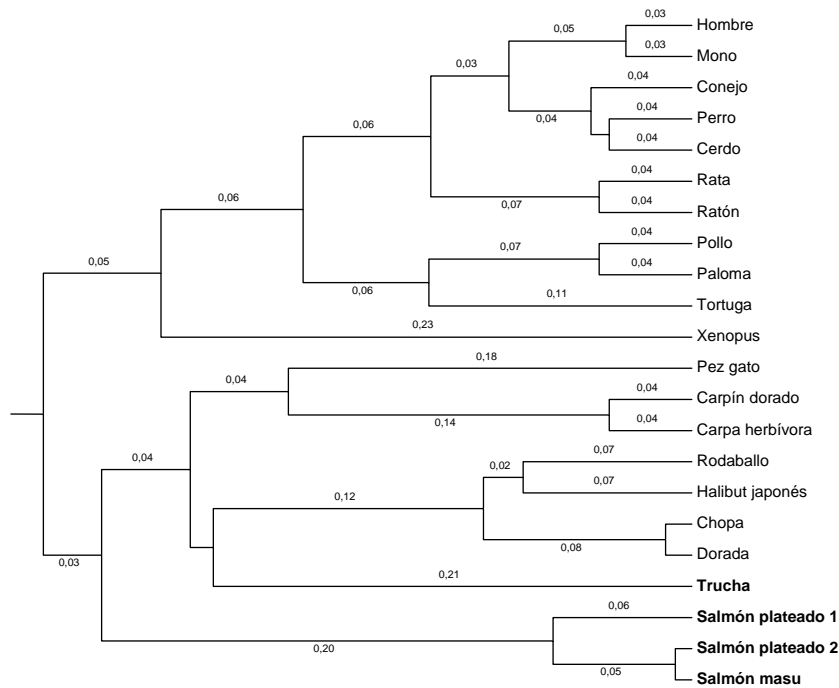


Fig. 4.24: Árbol filogenético de GHRs de vertebrados. Números de acceso a GenBank: hombre (NM_000163), mono (U84589), conejo (AF015252), perro (AF133835), cerdo (X54429), rata (NM_017094), ratón (NM_010284), pollo (M74057), paloma (D84308), tortuga (AF211173), *Xenopus* (AF193799), pez gato (AY336104), carpín dorado (AF293417), carpa herbívora (AY283778), rodaballo (AF352396), halibut japonés (AB058418), chopra (AF502071), dorada (AF438176), trucha arco iris (AF438178), salmón plateado 1 (AF403539), salmón plateado 2 (AF403540), salmón masu (AB071216).

4.3.3.2. Crecimiento y regulación nutricional del sistema somatotrópico

La tasa de ingesta aumentó con las dietas vegetales. Por el contrario, la tasa de crecimiento (SGR), la conversión del alimento (FE) y la eficiencia proteica (PER) disminuyeron con el aporte de proteínas vegetales, siendo éstas significativamente menores en los grupos PP75 y PP100. (**Tabla 4.14**).

La retención proteica y de energía fueron más bajas en los grupos alimentados con un alto porcentaje de proteína vegetal en la dieta (PP75 y PP100), no existiendo diferencias significativas entre el grupo control (FM) y el PP50.

Tabla 4.14: Datos de crecimiento y retención de nutrientes de truchas alimentadas con las dietas experimentales (engorde 2b). Cada valor representa la media \pm error estándar de 4 tanques/dieta.

	FM	PP50	PP75	PP100
Peso inicial (g)	19,2 \pm 0,1	19,2 \pm 0,1	19,2 \pm 0,1	19,2 \pm 0,05
Peso final (g)	147,1 \pm 0,9 ^c	142,4 \pm 1,3 ^c	135,6 \pm 2,4 ^b	111,1 \pm 1,2 ^a
Ingesta (g MS/kg PM/d)	14,9 \pm 0,1 ^a	14,8 \pm 0,1 ^a	15,4 \pm 0,1 ^b	15,4 \pm 0,05 ^b
SGR ¹ (%)	2,61 \pm 0,01 ^c	2,57 \pm 0,005 ^c	2,51 \pm 0,02 ^b	2,25 \pm 0,01 ^a
FE ²	1,33 \pm 0,01 ^c	1,29 \pm 0,01 ^c	1,25 \pm 0,005 ^b	1,17 \pm 0,005 ^a
PER ³	2,58 \pm 0,02 ^c	2,63 \pm 0,02 ^c	2,55 \pm 0,01 ^b	2,42 \pm 0,005 ^a
<i>Retención (% ingesta digestible)</i>				
Nitrógeno	48,2 \pm 0,6 ^c	46,9 \pm 0,2 ^c	44,3 \pm 0,5 ^b	40,3 \pm 0,9 ^a
Lípidos	93,9 \pm 2,0	94,9 \pm 2,8	94,2 \pm 0,3	90,9 \pm 1,8
Energía	61,0 \pm 1,1 ^b	59,9 \pm 0,7 ^b	57,1 \pm 0,3 ^a	56,6 \pm 0,1 ^a

Diferentes superíndices en cada fila indican diferencias significativas entre los tratamientos experimentales (test de Student Newman-Keuls, $P < 0,05$).

¹ Tasa específica de crecimiento = $[100 \times (\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{días}]$.

² Conversión del alimento = ganancia de peso / ingesta de alimento.

³ Eficiencia proteica = ganancia de peso / ingesta proteica.

Los niveles circulantes de GH aumentaron progresivamente con el aporte de proteína vegetal, encontrándose diferencias significativas entre los grupos FM y PP100 (**Fig. 4.25A**).

Los receptores hepáticos de GH (ensayo de radiorreceptores) no sufrieron variaciones con el régimen de alimentación (**Fig. 4.25B**).

No se encontraron diferencias significativas en los niveles circulantes de IGF-I entre los grupos experimentales, aunque se observó una tendencia a disminuir con el aumento de ingredientes vegetales en la dieta (**Fig. 4.25C**).

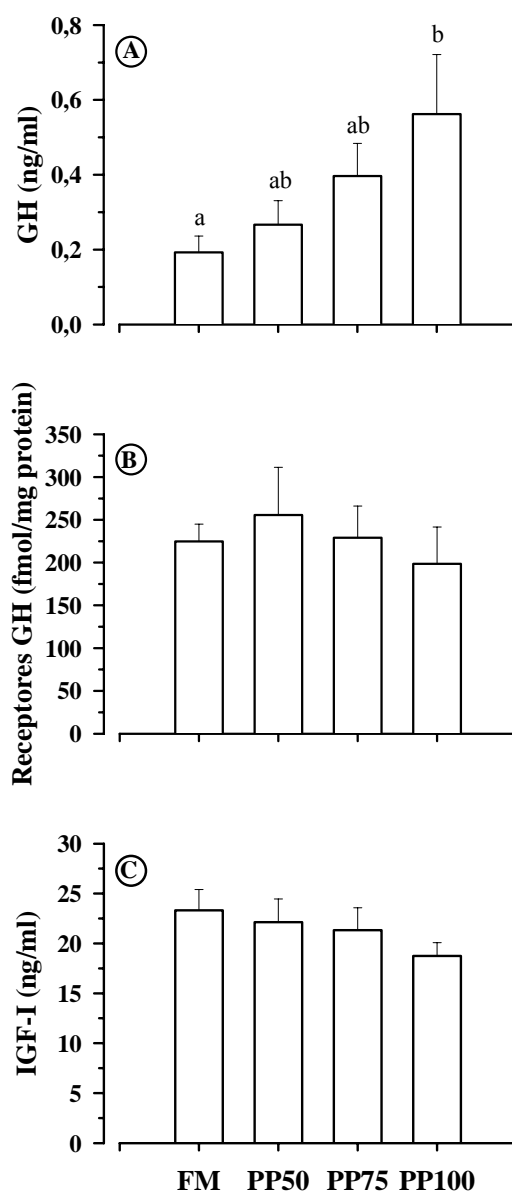


Fig. 4.25: Niveles circulantes de GH (A), receptores hepáticos de GH (B) y niveles circulantes de IGF-I (C) en truchas alimentadas con las dietas experimentales (engorde 2b). Cada valor representa la media \pm error estándar de 10-15 animales. Valores con distintas letras son significativamente diferentes (test de Student Newman-Keuls, $P < 0,05$).

La **Tabla 4.15** muestra medidas de expresión génica del GHR y de IGFs en hígado, músculo y tejido adiposo de peces alimentados con las dietas experimentales.

No se encontraron diferencias significativas en la expresión del GHR y de las IGFs en el tejido hepático de los peces alimentados con las dietas extremas (FM y PP100).

Los transcritos del GHR y las IGFs no experimentaron diferencias significativas en el músculo esquelético de los animales alimentados con las cuatro dietas experimentales.

En el tejido adiposo peri-visceral se observó un aumento de la expresión del GHR con el aumento del nivel de sustitución, encontrándose diferencias significativas entre el grupo control (FM) y los grupos PP75 y PP100.

Tabla 4.15: Expresión génica del GHR y de IGFs en hígado, músculo esquelético y tejido adiposo de truchas alimentadas con las dietas experimentales (engorde 2b). Cada valor representa la media \pm error estándar de 5-7 peces.

Unidades arbitrarias	FM	PP50	PP75	PP100
<i>Hígado</i>				
GHR	0,90 \pm 0,06			1,00 \pm 0,12
IGF-I	0,84 \pm 0,02			1,00 \pm 0,06
IGF-II	0,99 \pm 0,16			1,00 \pm 0,04
<i>Músculo esquelético</i>				
GHR	0,77 \pm 0,11	0,81 \pm 0,17	0,77 \pm 0,13	1,00 \pm 0,18
IGF-I	0,86 \pm 0,11	0,87 \pm 0,10	0,89 \pm 0,14	0,90 \pm 0,09
IGF-II	0,96 \pm 0,15	1,00 \pm 0,17	0,61 \pm 0,06	0,72 \pm 0,07
<i>Tejido adiposo</i>				
GHR	0,56 \pm 0,11 ^a	0,58 \pm 0,09 ^{ab}	0,70 \pm 0,10 ^b	1,00 \pm 0,11 ^b
IGF-I	0,70 \pm 0,13	0,94 \pm 0,05	0,98 \pm 0,25	1,03 \pm 0,18
IGF-II	0,96 \pm 0,08	0,93 \pm 0,03	0,94 \pm 0,05	1,00 \pm 0,20

Diferentes superíndices en cada fila indican diferencias significativas entre los tratamientos experimentales (test de Student Newman-Keuls, $P < 0,05$).

Los ensayos de *Western ligand blot* revelaron la existencia de dos bandas específicas de IGFBPs (47 y 33 kDa) en los cuatro grupos experimentales (**Fig. 4.26**).

La actividad de las dos bandas de IGFBPs aumentó progresivamente con el porcentaje de sustitución de las harinas de pescado, siendo ello estadísticamente significativo entre los dos grupos extremos (FM y PP100).

El cociente entre las dos bandas de IGFBPs (47/33 kDa) aumentó con el nivel de sustitución, siendo ello estadísticamente significativo entre los grupos FM y PP100.

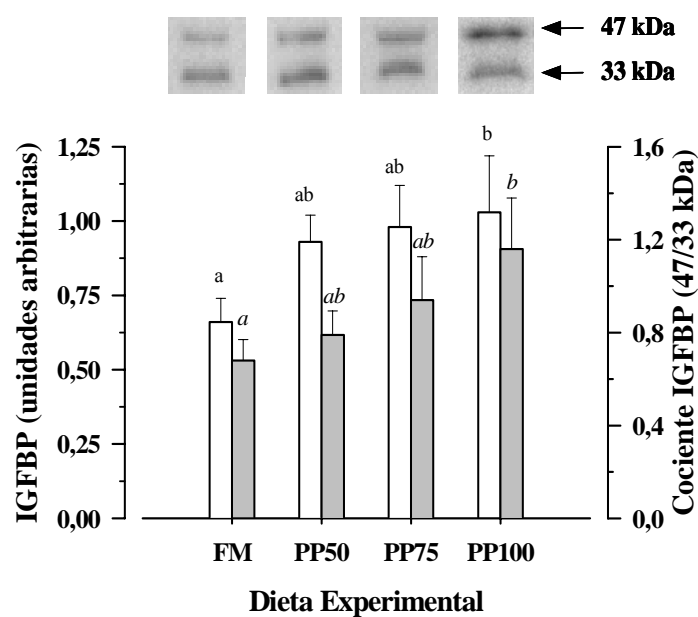


Fig. 4.26: En la parte superior de la figura se muestra un *Western ligand blot* de truchas alimentadas con las dietas experimentales (engorde 2b). El área de las dos bandas de IGFBPs se representa en color blanco. El cociente de las bandas se representa en color gris. Cada valor representa la media \pm error estándar de 8 animales. Valores con distintas letras (letra normal y en cursiva) son significativamente diferentes (test de Student Newman-Keuls, $P < 0,05$).

4.3.4. Discusión

En los últimos años uno de los hechos más sobresalientes en relación al modo de acción y regulación del sistema somatotrópico de peces ha sido la clonación y secuenciación de los GHRs tanto en salmónidos como en no salmónidos. No obstante, existen diferencias significativas entre ellos, y las secuencias disponibles de salmón plateado y de salmón masu carecen de un par de residuos extracelulares de cisteínas (C5, C6) y de tres residuos intracelulares de tirosinas (Y1, Y3, Y6), que conservan los GHRs de tetrápodos y de peces no salmónidos (Zhu y cols., 2001; Pérez-Sánchez y cols., 2002).

Esta aparente contradicción ha llevado a varios autores a especular acerca de una evolución divergente de los GHRs de peces salmónidos (Björnsson y cols., 2002). Sin embargo, el hecho de que la secuencia de GHR de trucha muestre una mayor identidad con la de peces no salmónidos apunta a una posible duplicación genómica de los GHRs de peces, como así se ha demostrado posteriormente en trucha arco iris, dorada y lubina (Saera-Vila y cols., 2005a). Esta duplicación ha sido también confirmada mediante el análisis de las bases genómicas del pez cebra y de fugu (www.ensembl.org), denominándose GHR tipo 1 a la forma descrita en peces no salmónidos y GHR tipo 2 a la inicialmente descrita en salmónidos. El análisis exhaustivo de estas secuencias ha puesto de relieve que el GHR tipo 1 es la forma conservada en vertebrados superiores. Es más, estudios que se están llevando a cabo en nuestro laboratorio demuestran que el GHR tipo 1 es la variante de GHR que está especialmente correlacionada con la expresión de IGFs en peces.

Es por ello que en los estudios de regulación nutricional del sistema somatotrópico de la trucha nos hemos seguido centrando en el GHR tipo 1.

Al igual que en dorada, en nuestro modelo experimental de trucha la sustitución progresiva de las harinas de pescado por harinas vegetales comportó una disminución de las tasas de crecimiento. Aparentemente, ello está en contradicción con los resultados obtenidos en trucha por otros autores, en los que se

aboga por una sustitución total y con éxito de las harinas de pescado (Kaushik y cols., 1995; Watanabe y cols., 1998). No obstante, en el caso que nos ocupa, las tasas de conversión del alimento en todos los grupos experimentales se pueden calificar de excelentes al oscilar entre el 117-133%. Por tanto, en unas condiciones presumiblemente óptimas de cultivo que permiten explotar al máximo el potencial de crecimiento de la especie, es de suponer que las posibles limitaciones de la estrategia de sustitución se ven potenciadas o agravadas. En cualquier caso, como se indica a continuación, las alteraciones observadas a nivel del sistema somatotrópico difirieron notablemente entre la dorada y la trucha.

Como se demostró anteriormente en la dorada, los niveles circulantes de GH aumentaron con el nivel de sustitución (**Fig. 4.25A**). Sin embargo, en este caso, el aumento significativo de la GH circulante con el 100% de sustitución no estuvo acompañado por una reducción en la expresión hepática de IGFs y del GHR tipo 1. Por el contrario, en el tejido adiposo peri-visceral y hasta cierto punto en el músculo esquelético, los ARNm del GHR tipo 1 aumentaron de manera progresiva con el nivel de sustitución del 75-100% (**Tabla 4.15**). Dado que en peces, al igual que en vertebrados superiores, el efecto lipolítico de la GH no está mediado por las IGFs (Vega-Rubín de Celis y cols., 2003), el incremento conjunto de la GH circulante y de los GHRs en el tejido adiposo representa una posible vía para movilizar y metabolizar sustratos energéticos de depósitos lipídicos periféricos.

En mamíferos, los estados catabólicos caracterizados por el aumento de los niveles circulantes de GH normalmente van acompañados de un aumento en la expresión del GHR en el músculo esquelético (Combes y cols., 1997). Sin embargo, hasta el momento dicho aumento en la cantidad de GHR en tejidos periféricos diana no había sido demostrado en una especie inferior de vertebrados. Ello puede ser de especial relevancia a la hora de modular la acción de la GH en una especie de pez que refleja una marcada condición de hiposomatotropismo ($GH < 2$ ng/ml), con independencia de la edad y del estado nutricional (Pérez-Sánchez y Le Bail, 1999).

Los mecanismos implicados en el aumento de los niveles circulantes de GH en ausencia de una aparente insensibilidad hepática a la acción de dicha hormona (sin cambios en los transcritos hepáticos del GHR y de la IGF-I) permanecen sin ser del todo comprendidos. Sin embargo, hay cada vez más evidencias de que las IGFBPs modulan la actividad de las IGFs, activando o inhibiendo sus efectos *in vivo*.

En peces, existen evidencias de la presencia de al menos tres tipos de IGFBPs, incluyendo una forma de elevado peso molecular (40-50 kDa) y dos formas de IGFBPs en el rango de los 31-24 kDa (Kelley y cols., 1992; Niu y Le Bail, 1993; Park y cols., 2000; Cheng y cols., 2002). Al igual que ocurre en mamíferos, la forma de mayor peso molecular es la más abundante en condiciones fisiológicas. Por el contrario, las IGFBPs de menor peso molecular están, a menudo, por debajo de los límites de detección en peces alimentados, pero aumentan en varios órdenes de magnitud en condiciones catabólicas (Kelley y cols., 2001, 2002; Peterson y Small, 2004). Después de la clonación y secuenciación de la IGFBP-2 de dorada (Funkenstein y cols., 2002) y de la IGFBP-1 y -2 de pez cebra (Duan y cols., 1999; Maures y Duan, 2002), se ha hecho evidente que las IGFBPs con un peso molecular menor de 31 kDa, identificadas originalmente por *Western ligand blotting*, deben corresponderse con las IGFBP-1 y -2 de mamíferos. A su vez, se ha sugerido que los dobletes de proteínas de mayor peso molecular representan diferentes formas de glicosilación de la IGFBP-3.

En la IGFBP-3 de mamíferos existen dos sitios principales de glicosilación, mientras que un tercer sitio alternativo incorpora unos 5 kDa de carbohidratos, dando lugar al doblete de 40-45 kDa con un núcleo proteico de 29 kDa (Firth y Baxter, 2002). La IGFBP-3 de peces también existe como proteína glicosilada (Shimizu y cols., 2003), encontrándose en el plasma del salmón plateado un doblete de 45-34 kDa (Shimizu y cols., 1999). En trucha, nosotros también hemos detectado un doblete de IGFBPs de elevado peso molecular, aumentando la concentración total de las IGFBPs y el cociente 47/33 kDa con el aumento de la ingesta de proteínas de origen vegetal (**Fig. 4.26**).

Actualmente se sabe que la escisión proteolítica es el mecanismo implicado en liberar las IGFs de las IGFbps (Bunn y Fowlkes, 2003). Sin embargo, las modificaciones producidas después de la traducción (como, p.e., la glicosilación) regulan la tasa a la que se produce la proteólisis de las IGFbps, protegiéndolas contra la acción de las metaloproteasas. En nuestro modelo experimental de trucha, desconocemos los mecanismos implicados en la glicosilación de las IGFbps con el aporte de harinas vegetales. Sin embargo, esta situación podría limitar la degradación proteolítica de las IGFbps, evitando así la liberación de las IGFs (forma biológicamente activa). En última instancia, ello limitaría la retroalimentación negativa de las IGFs sobre la secreción hipofisaria de GH. Por consiguiente, a pesar de que la estrategia de sustitución en trucha no afectó a la producción total de IGFs, el efecto observado sobre la regulación de la secreción de la GH es el mismo que en la dorada, al verse disminuida la fracción libre o biológicamente activa de IGFs.

En resumen, en este último apartado se abordó la clonación y secuenciación del GHR de trucha, lo que sentó las bases para estudios posteriores en los que se ha evidenciado la duplicación genómica del GHR de peces. Por otra parte, los resultados derivados del modelo de sustitución de harinas de pescado indican alteraciones en el patrón de IGFbps. En comparación con la dorada, ello supone que las disfunciones en el eje somatotrópico sólo se producen al final de la cascada de regulación. Ello explicaría el hecho generalmente asumido de una mayor tolerancia de la trucha frente a las estrategias de sustitución de las fuentes de proteínas. A su vez, esto aporta nuevas evidencias sobre la idoneidad del sistema somatotrópico como marcador del estado nutricional y metabólico de los peces en cultivo, aunque dadas las peculiaridades de cada especie no se puede establecer un modelo global de alteración y/o disfunción endocrina del crecimiento.



Conclusiones

PRIMERA: Dietas basadas en el perfil aminoacídico del músculo esquelético mejoran la conversión y la retención proteica del alimento.

SEGUNDA: La alteración de la conversión del alimento con la modificación del perfil aminoacídico de la dieta está estrechamente relacionada con los niveles circulantes de IGF-I.

TERCERA: Las harinas de soja inhiben la lipogénesis hepática y disminuyen la deposición grasa en el conjunto del organismo.

CUARTA: La actividad de las aminotransferasas hepáticas en una especie con elevados requerimientos proteicos no se ve afectada por el perfil aminoacídico y la fuente de proteína.

QUINTA: La sustitución total de las harinas de pescado por harinas vegetales en los piensos de engorde de dorada comporta la disminución drástica de la ingesta y del crecimiento, provocando esteatosis hepática, acumulación lipídica en los enterocitos, infiltración masiva de eosinófilos en la submucosa intestinal y pérdida de la actividad del complemento.

SEXTA: La sustitución parcial del 75% ejerce un efecto antioxidante y no provoca alteraciones significativas de la arquitectura hepática y gastro-intestinal, habiéndose detectado una acción inmunoestimulante en algunos de los parámetros analizados (estallido respiratorio).

SÉPTIMA: La sustitución parcial del 75% a lo largo de todo un ciclo de engorde mejora la conversión del alimento sin merma significativa del crecimiento y de las propiedades sensoriales y organolépticas del producto final.

OCTAVA: La sustitución de harinas de pescado por proteínas vegetales disminuye progresivamente la expresión hepática de la IGF-I y de los GHRs.

NOVENA: En trucha, la sustitución progresiva de las harinas de pescado por harinas vegetales no provoca aparentemente una insensibilización hepática a la acción anabólica de la GH.

DÉCIMA: En trucha, la sustitución progresiva de harinas de pescado por proteínas vegetales aumenta el grado de glicosilación de las IGFBPs circulantes, disminuyendo la fracción libre y biológicamente activa de IGF-I.

UNDÉCIMA: En los dos modelos experimentales (dorada y trucha), las alteraciones del crecimiento estuvieron acompañadas de un aumento de la GH circulante como consecuencia de un defecto en la retroalimentación negativa de la IGF-I sobre la secreción hipofisaria de GH.



Bibliografía

- A -

- Abelseth, T.K., Stensvag, K., Espelid, S., Nygaard, R., Ellingsen, T., Bogwald, J., Dalmo, R.A., 2003. The spotted wolf fish (*Anarhichas minor* Olafsen) complement component C3: isolation, characterisation and tissue distribution. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 13-27.
- Adom, K.K., Liu, R.H., 2002. Antioxidant activity of grains. *J. Agr. Food. Chem.* 50, 6182-6187.
- Agrimi, U., Conte, M., Morelli, L., Di Bari, M.A., Di Guardo, G., Ligios, C., Antonucci, G., Aufiero, G.M., Pozzato, N., Mutinelli, F., Nonno, R., Vaccari, G., 2003. Animal transmissible spongiform encephalopathies and genetics. *Vet. Res. Communications* 27, 31-38.
- Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A., 2004. Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. *Ecotox. Environ. Safe.* 57, 290-302.
- Akiyama, T., Oohara, I., Yamamoto, T., 1997. Comparison of essential amino acid requirements with A/E ratio among fish species (review paper). *Fisheries Sci.* 63, 963-970.
- Alegre, M., Ciudad, C.J., Fillat, C., Guinovart, J.J., 1988. Determination of glucose-6-phosphatase activity using the glucose-dehydrogenase-coupled reaction. *Anal. Biochem.* 173, 185-189.
- Alexander, J.B., 1985. Non-immunoglobulin humoral defence mechanisms in fish. En: Manning, M.J., Tatner, M.F. (Eds.), *Fish Immunology*. Academic Press, Londres, pp. 133-140.
- Alexis, M., Nengas, I., 2001. Current State of Knowledge Concerning the Use of Soy Products in Diets for Feeding Sea Bass and Sea Bream. Needs for Future Research. *Publ. American Soybean Assn., Brussels, Belgium, No. 5*, 32 pp.

- Alexis, M.N., Papaparaskev-Papoutsoglou, E. Theochari, V., 1985. Formulation of practical diets for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) made by partial or complete substitution of fish meal by poultry by-products and certain plant by-products. *Aquaculture* 50, 61–73.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 1990. Heldrich, K. (Ed.), *Official Methods of Analysis*. Arlington, VA.
- Arias, A., 1976. Sobre la biología de la dorada, *Sparus aurata* L., de los esteros de la provincia de Cádiz. *Inv. Pesq.* 40, 201-222.
- Arias, A. M., 1980. Crecimiento, régimen alimentario y reproducción de la dorada (*Sparus aurata* L.) y del róbalo (*Dicentrarchus labrax* L.) en los esteros de Cádiz. *Inv. Pesq.* 44, 59-83.
- Arias, A. M., Drake, P., 1990. Estados juveniles de la ictiofauna en los caños de las salinas de la Bahía de Cádiz. *Inst. Cien. Mar. Andalucía (CSIC), Cádiz*, 163 pp.
- Aursand, M., Mabon, F., Martin, G. J., 2000. Characterization of farmed and wild salmon (*Salmo salar*) by a combined use of compositional and isotopic analyses. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77, 659–666.

- B -

- Baars, A.J., Bakker, M.I., Baumanna, R.A., Boonb, P.E., Freijer, J.I., Hoogenboomb, L.A.P., Hoogerbrugge, R., Van Klaveren, J.D., Liema, A.K.D., Traag, W.A., de Vries, J., 2004. Dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in foodstuffs: occurrence and dietary intake in The Netherlands. *Toxicol. Letters* 151, 51-61.
- Babior, B.M., 1984. Oxidants from phagocytes: agents of defence and destruction. *Blood* 64, 959-966.

- Baeverfjord, G., Krogdahl, A., 1996. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *J. Fish Dis.* 19, 375-387.
- Balmir, F., Staack, R., Jeffrey, E., Berber Jiménez, M.D., Wang, L., Potter, S.M., 1996. An extract of soy flour influences serum cholesterol and thyroid hormones in rats and hamsters. *J. Nutr.* 126, 3046-3053.
- Ballestrazzi, R., Lanari, D., D'Agaro, E., Mion, A., 1994. The effect of dietary protein level and source on growth, body composition, total ammonia and reactive phosphorus excretion of growing sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 127, 197-206.
- Barlow, S., 2000. Fish meal and fish oil: sustainable feed ingredients for aquafeeds. *The Global Aquaculture Advocate* 4, 85-88.
- Bauchot, M.L., Hureau, J.C., 1986. Sparidae. En: Whitehead, P.J.P., Bauchot, M.L., Hureau, J.C., Nilsen, J., Tortonese, E. (Eds.), *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*. UNESCO, U.K., pp. 883-907.
- Bautista, J.M., Garrido-Pertierra, A., Soler, G., 1988. Glucose-6-phosphatase dehydrogenase from *Dicentrarchus labrax* liver: kinetic mechanism and kinetics of NADPH inhibition. *Biochim. Biophys. Acta* 967, 354-363.
- Beckman, B.R., Dickhoff, W.W., 1998. Plasticity of smolting in spring chinook salmon: relation to growth and insulin-like growth factor-I. *J. Fish Biol.* 53, 808-826.
- Behncken, S.N., Waters, M.J., 1999. Molecular recognition events involved in the activation of the growth hormone receptor by growth hormone. *J. Mol. Recognit.* 12, 355-362.
- Bell, J.G., Cowey, C.B., 1985. Roles of vitamin E and selenium in the prevention of pathologies related to fatty acid oxidation

- in salmonids. En: Cowey, C.B., Mackie, A.M., Bell, J.G. (Eds.), Nutrition and feeding in fish. London, Academic Press, pp. 333-347.
- Bell, J.G., McEvoy, J., Webster, J.L., McGhee, F., Millar, R.M., Sargent, J.R., 1998. Flesh lipid and carotenoid composition of Scottish farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). J. Agric. Food Chem. 46, 119–127.
- Bell, J.G., McGhee, F., Campbell, P.J., Sargent, J.R., 2003. Rapeseed oil as an alternative to marine fish oil in diets of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*): changes in flesh fatty acid composition and effectiveness of subsequent fish oil “wash out”. Aquaculture 218, 515–528.
- Bell, M.V., Dick, J.R., Thrush, M., Navarro, J.C., 1996. Decreased 20:4n-6/20:5n-3 ratio in sperm from cultured sea bass *Dicentrarchus labrax*, broodstock compared to wild fish. Aquaculture 144, 189-199.
- Belló, A.R., Fortes, E., Belló-Klein, A., Belló, A.A., Llesuy, S.F., Robaldo, R.B., Bianchini, A., 2000. Lipid peroxidation induced by *Clinostomum detrunctatum* in muscle of the freshwater fish *Rhamdia quelen*. Dis. Aquat. Org. 42, 233-236.
- Ben-Tuvia, A., 1979. Studies of the population and fisheries of *Sparus aurata* in the Bardawil Lagoon, eastern Mediterranean. Invest. Pesq. 43, 43-67.
- Berthe, F.C.J., Michel, C., Bernardet, J.F., 1995. Identification of *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from several fish species in France. Dis. Aquat. Organ. 21, 151-155.
- Betti, C., Davini, T., Barale, R., 1992. Genotoxic activity of methyl mercuric chloride and dimethylmercury in human lymphocytes. Mutat. Res. 281, 255-260.
- Björnsson, B.Th., 1997. The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance. Fish Physiol. Biochem. 17, 9-24.

- Björnsson, B.Th., Johansson, V., Benedet, S., Einarsdottir, I.E., Hildahl, J., Ágústsson, T., Jönsson, E., 2002. Growth hormone endocrinology of salmonids: regulatory mechanisms and mode of action. *Fish Physiol. Biochem.* 27, 227-242. Publicación especial "Fish Growth and Metabolism. Experimental, Nutritional and Hormonal Regulation". Plisetskaya, E.M. (Ed.) (publicado en el 2004).
- Bloom, N.S., 1992. On the chemical form of mercury in edible fish and marine invertebrate tissue. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49, 1010-1017.
- Bolognesi, C., Landini, E., Roggieri, P., Fabri, R., Viarengo, A., 1999. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies. *Environ. Mol. Mutagen.* 33, 287-292.
- Bovo, G., Borghesan, F., Comuzzi, M., Ceschia, G., Giorgetti, G., 1995. "Winter disease" in orata di allevamento: osservazioni preliminari. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica.* 17, 2-11.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brandsen, M.P., Carter, C.G., Nowak, B.F., 2001. Alternative protein sources for farmed salmon. *Feed Mix* 9, 18-21.
- Bub, A., Watzl, B., Blockhaus, M., Briviba, K., Liegibel, U., Müller, H., Pool-Zobel, B.L., Rechkemmer, G., 2003. Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage. *J. Nutr. Biochem.* 14, 90-98.
- Buentello, J.A., Gatlin, D.M., 2001. Plasma citrulline and arginine kinetics in juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus*, given oral gabaculine. *Fish Physiol. Biochem.* 24, 105-112.

- Bunn, R.C., Fowlkes, J.L., 2003. Insulin-like growth factor binding protein proteolysis. *Trends Endocrinol. Metab.* 14, 176-181.
- Burel, C., Boujard, T., Corraze, G., Kaushik, S.J., Boeuf, G., Mol, K.A., Van der Geyten, S. Kuhn, E.R., 2000. Incorporation of high levels of extruded lupin in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): nutritional value and effect on thyroid status. *Aquaculture* 188, 285–298.
- Burrells, C., Williams, P.D., Southgate, P.J., Crampton, V.O., 1999. Immunological, physiological and pathological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary concentrations of soybean proteins. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 72, 277-288.
- Buzina, R., Stegnar, P., Buzina-Suboticanec, K., Horvat, M., Petric, I., Farley, T. M. M., 1995. Dietary mercury intake and human exposure in an Adriatic population. *Sci. Total Environ.* 170, 199-208.

- C -

- Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., Kjorsvik, E., Montero, D., Socorro, J., Fernández, J.A., Rosenlund, G., 2003. Morphological aspects of intestinal cells from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture* 225, 325-340.
- Calduch-Giner, J-A., Duval, H., Chesnel, F., Boeuf, G., Pérez-Sánchez, J., Boujard, D., 2001. Fish growth hormone receptor: molecular characterization of two membrane-anchored forms. *Endocrinology* 142, 3269-3273.
- Calduch-Giner, J.A., Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, S., Boujard, D., Pérez-Sánchez, J., 2003. Molecular cloning and characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone receptor (GHR). Assessment of alternative splicing. *Comp. Biochem. Physiol.* 136B, 1-13.

- Calduch-Giner, J.A., Sitjà-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P., Pérez-Sánchez, J., 1997. Growth hormone as an *in vitro* phagocyte-activating factor in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Cell. Tissue Res. 287, 535-540.
- Caseras, A., Metón, I., Fernández, F., Baanante, I.V., 2000. Glucokinase gene expression is nutritionally regulated in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Biochim. Biophys. Acta 1493, 135-141.
- Castro, R., Couso, N., Obach, A., Lamas, J., 1999. Effect of different β -glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. Fish Shellfish Immunol. 9, 529-541.
- Chamberlain, G.W., 2000. Aquaculture projections for use of fishmeal and oil. Presentación oral, Meeting anual del IFOMA. Lima, Perú, 30 octubre - 3 noviembre.
- Cheng, R., Chang, K.M., Wu, J.L., 2002. Different temporal expressions of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) insulin-like growth factor-I and IGF binding protein-3 after growth hormone induction. Mar. Biotechnol. 4, 218-225.
- Cheng, Z.J., Hardy, R.W., Blair, M., 2003a. Effects of supplementing methionine hydroxy analogue in soybean meal and distiller's dried grain-based diets on the performance and nutrient retention of rainbow trout [*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)]. Aquacult. Res. 34, 1303-1310.
- Cheng, Z.J., Hardy, R.W., Usry, J.L., 2003b. Effects of lysine supplementation in plant protein-based diets on the performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and apparent digestibility coefficients of nutrients. Aquaculture 215, 255-265.
- Chesney, R., 1985. Taurine: its biological role and clinical implications. Adv. Pediatr. 32, 1-42.

- Childs, M.T., Dorsett, C.S., King, I.B., Ostrander, J.G., Yamanaka, W.K., 1990. Effects of shellfish consumption on lipoproteins in normolipidemic men. *Am. J. Clin. Nutr.* 51, 1020–1027.
- Choi, M.H., Cech, J.J., 1998. Unexpectedly high mercury level in pelleted commercial fish feeds. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1979–1981.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Cole, D.J.A., Van Lunen, T.A., 1994. Ideal amino acid patterns. En: D'Mello, J.P.F. (Ed.), *Amino Acids in Farm Animal Nutrition*. CAB International, Wallingford, U.K., pp. 99–112.
- Combes, S., Louveau, I., Bonneau, M., 1997. Moderate feed restriction affects skeletal muscle and liver growth hormone receptors differently in pigs. *J. Nutr.* 127, 1944-1949.
- Company, R., Calduch-Giner, J.A., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 1999. Growth performance and adiposity in gilthead seabream (*Sparus aurata*): risks and benefits of high energy diets. *Aquaculture* 171, 279-292.
- Cowey, C.B., Walton, M.J., 1989. Intermediary metabolism. En: Halver, J.E. (Ed.), *Fish Nutrition*. Academic Press, Nueva York, pp. 259-329.
- Cuesta, A., Ortuño, J., Esteban, M.A., Rodríguez, M.A., Meseguer, J., 2002. Changes in some innate defence parameters of seabream (*Sparus aurata* L.) induced by retinol acetate. *Fish Shellfish Immunol.* 13, 279-291.

- D -

- Dalmo, R.A., Ingebrigtsen, K., Bogwald, J., 1997. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *J. Fish Dis.* 20, 241-273.
- Davies, S. J., Morris, P. C., Baker, R. T. M., 1997. Partial substitution of fish meal and full-fat soya bean meal with wheat gluten and influence of lysine supplementation in diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquacult. Res.* 28, 317-328.
- De Deckere, E.A.M., Korver, O., Verschuren, P.M., Katan, M.B., 1998. Health aspects of fish and n-3 polyunsaturated fatty acids from plant and marine origin. *Eur. J. Clin. Nutr.* 52, 749– 753.
- De Francesco, M., Parisi, G., Vigiani, V., Gómez-Requeni, P., Pérez-Sánchez, J., Médale, F., Kaushik, S.J., Poli, B.M., 2004a. High level of fish meal replacement by plant proteins in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). I. Effect on growth, quality traits and chemical composition. *Aquaculture Europe 2004, "Biotechnologies for Quality"*. Barcelona, España, 20-23 Octubre.
- De Francesco, M., Parisi, G., Mecatti, M., Scappini, F., Vega-Rubín de Celis, S., Pérez-Sánchez, J., Kaushik, S.J., Poli, B.M., 2004b. High level of fish meal replacement by plant proteins in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). II. Effects on sensory, physical and chemical traits during shelf-life. *Aquaculture Europe 2004, "Biotechnologies for Quality"*. Barcelona, España, 20-23 Octubre.
- De Francesco, M., Parisi, G., Pérez-Sánchez, J., Gómez-Requeni, P., Médale, F., Kaushik, S.J., Mecatti, M., Poli, B.M., 2005. Effect of high level fish meal replacement by plant proteins in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on growth and body/fillets quality traits. *Aquaculture (en consideración)*.

- Deng, L., Zhang, W.M., Lin, H.R., Cheng, C.H.K., 2004. Effects of food deprivation on expression of growth hormone receptor and proximate composition in liver of black seabream *Acanthopagrus schlegeli*. *Comp. Biochem. Physiol.* 137B, 421-432.
- Devauchelle, N., 1984. Reproduction décalée du bar (*Dicentrarchus labrax*) et de la daurade (*Sparus aurata*). En: Billard, R., Barnabé, G. (Eds.), *L'Aquaculture de Bar et des Sparidés*. INRA, Paris, pp. 53-63.
- Dias, J., 1999. Lipid deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): nutritional control of hepatic lipogenesis. Tesis Doctoral, Universidad de Porto (Portugal) y Universidad de Bordeaux (France). 190 pp. + anexos.
- Dias, J., Gomes, E.F., Kaushik, S.J., 1997. Improvement of feed intake through supplementation with an attractant mix in European sea bass fed plant-protein rich diets. *Aquat. Living Resour.* 10, 385-389.
- Dias, J., Alvarez, M.J., Diez, A., Arzel, J., Corraze, G., Bautista, J.M., Kaushik, S.J., 1998. Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein/energy in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 161, 169-186.
- Doimi, M., 1996. A new winter disease in sea bream (*Sparus aurata*): a preliminary report. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 16, 17-18.
- Doménech, A., Fernández-Garayzábal, J.F., García, J.A., Cutuli, M.T., Blanco, M., Gibello, A., Moreno, M.A., Domínguez, L., 1999. Association of *Pseudomonas anguilliseptica* infection with "winter disease" in sea bream, *Sparus aurata* L. *J. Fish Dis.* 22, 69-71.
- Dosdat, A., Servais, F., Métailler, R., Huelvan, C., Desbruyères, E., 1996. Comparison of nitrogenous losses in five teleost fish species. *Aquaculture* 141, 107-127.

Duan, C., Ding, J., Li, Q., Tsai, W., Pozios, K., 1999. Insulin-like growth factor binding protein 2 is a growth inhibitory protein conserved in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 15274-15279.

- E -

Ellis, A.E., 1990. Lysozyme assays. En: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., Muiswinkel, W.B. (Eds.), *Techniques in fish immunology*. SOS Publications, Fair Haven, New Jersey, USA, pp. 101-103.

Endo, T., Hotta, Y., Haraguchi, K., Sakata, M., 2003. Mercury contamination in the red meat of whales and dolphins marketed for human consumption in Japan. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2681-2685.

- F -

Fine, M., Amuly, R., Sandowski, Y., Marchant, T.A., Chan, S.J., Gertler, A., Funkenstein, B., 1997. Recombinant gilthead sea bream (*Sparus aurata*) insulin-like growth factor-I: subcloning, expression in *Escherichia coli*, purification and characterization. *J. Endocrinol.* 153, 139-150.

Firth, S.M., Baxter, R.C., 2002. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr. Rev.* 23, 824-854.

Fletcher, T.C., 1982. Non-specific defence mechanisms of fish. *Dev. Comp. Immunol.* 2, 123-132.

Fletcher, T.C., 1997. Dietary effects on stress and health. En: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Schreck, C.B. (Eds.), *Fish stress and health in aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 223-244.

- Folch, J., Lees, M., Sloanestanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 1986. The production of fish meal and oil. Fishery Industries Division, FAO Fish. Tech. Pap. 142, Rev. 1, 63 pp.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2002. El estado actual de la pesca y la acuicultura. FAO Fisheries Department, Rome, 150 pp.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2004. El estado actual de la pesca y la acuicultura. FAO Fisheries Department, Rome, 168 pp.
- Fountoulaki, E., Alexis, M.N., Nengas, I., Venou, B., 2003. Effects of dietary arachidonic acid (20:4n-6), on growth, body composition, and tissue fatty acid profile of gilthead bream fingerlings (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* 225, 309-323.
- Francescon, A., Barbaro, A., La Rocca, A., Bertaggia, R., 1987. Stima quantitativa della dieta naturale dell'orata (*Sparus aurata*) in ambiente salmastro. *Arch. Oceanogr. Limnol.* 21, 45-61.
- Francis, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, 197-227.
- Fukada, H., Ozaki, Y., Pierce, A.L., Adachi, S., Yamauchi, K., Hara, A., Swanson, P., Dickhoff, W.W., 2004. Salmon growth hormone receptor: Molecular cloning, ligand specificity, and response to fasting. *Gen. Comp. Endocrinol.* 139, 61-71.
- Funkenstein, B., Tsai, W., Maures, T., Duan, C., 2002. Ontogeny, tissue distribution, and hormonal regulation of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) in a

marine fish, *Sparus aurata*. Gen. Comp. Endocrinol. 128, 112-122.

- G -

Gabrielsen, B.O., Austreng, E., 1998. Growth, product quality and immune status of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed wet feed with alginate. Aquacult. Res. 29, 397-401.

George, S.G., 1990. Biochemical and cytological assessment of heavy metal toxicity in marine animals. En: Firness, R.W., Rainbow, P.S. (Eds.), Heavy Metals in the Marine Environment. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 123-141.

Globefish, 2001. Commodity update. Fishmeal, Fishoil. FAO, Roma, Italia. 76 pp.

Gomes, E., Kaushik, S., 1992. Effect of the replacement of dietary inorganic zinc by zinc/methionine on vegetable and animal protein utilization by rainbow trout. En: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), Fish Nutrition in Practice, Biarritz, Francia, 24-27 Junio 1991. INRA Editions, Les Colloques, pp. 897-902.

Gomes, E.F., Rema, P., Kaushik, S.J., 1995. Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): digestibility and growth performance. Aquaculture 130, 177-186.

Gordin, H., Zohar, Y., 1978. Induced spawning of *Sparus aurata* (L.) by mean of hormonal treatments. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 18, 985-990.

Gorman, N.T., Halliwell, R.E.W., 1992. Complemento. En: Halliwell, R.E.W., Gorman, N.T. (Eds.), Inmunología Clínica Veterinaria. Acribia, Zaragoza, pp. 77-100.

Gouveia, A., Davies, S.J., 2000. Inclusion of an extruded dehulled pea seed meal in diets for juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 182, 183-193.

Greenwood, R.C., Hunter, W.M., Glover, J.S., 1963. The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89, 114-23.

- H -

Hansen, L.G., Wiekhorst, W.B., Simon, J., 1976. Effects of dietary Aroclor 1242 on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and the selective accumulation of PCB components. *J. Fish. Res. Board Can.* 33, 1343-1352.

Happe, A., Zohar, Y., 1988. Self-fertilization in the protandrous hermaphrodite *Sparus aurata*. Development of the technology. En: Zohar, Y., Breton, B. (Eds.), *Reproduction in Fish*. INRA Press, Paris, France, 177-180.

Hardy, R.W., 1995. Current issues in salmonid nutrition. En: Lim, C., Sessa, D.J. (Eds.), *Nutrition and Utilization Technology in Aquaculture*. AOCS Press, Campaign, IL, USA, pp. 26-35.

Hardy, R. W., 1996. Alternate protein sources for salmon and trout diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 59, 71-80.

Hardy, R.W., 1999. Collaborative opportunities between fish nutrition and other disciplines in aquaculture: an overview. *Aquaculture* 177, 217-230.

Hendricks, J.D., 2002. Adventitious toxins. En: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*. Academic Press, San Diego, Capítulo 10, pp. 601-649.

Herzberg, G.R., Rogerson, M., 1984. Hepatic lipogenesis in the young rats given proteins of different quality. *Br. J. Nutr.* 52, 131-137.

Higgs, D.A., Prendergast, A.F., Dosanjh, B.S., Beames, R.M., Deacon, G., 1995. Potential for reducing cost of salmon production by dietary inclusion of novel rapeseed/canola protein products. Murphy, D. (Ed.), Proceedings of the 9th Int. Rapeseed Congr., Rapeseed Today and Tomorrow. GCIRC, Cambridge, UK, Vol. 1, 133-138.

Hites, R.A., Foran, J.A., Carpenter, D.O., Hamilton, M.C., Knuth, B.A., Schwager, S.J., 2004. Global assessment of organic contaminants in farmed salmon. *Science* 303, 226-229.

Horrocks, L.A., Yeo, Y.K., 1999. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol. Res.* 40, 211– 225.

Hossain, M.A., Focken, U., Becker, K., 2001. Evaluation of an unconventional legume seed, *Sesbania aculeata*, as a dietary protein source for common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture* 198, 129-140.

Hsu, R.Y., Butterworth, P.H.W., Porter, J.W., 1969. Pigeon liver fatty acid synthetase. En: Lowenstein, J.M. (Ed.), *Methods in Enzymology*, Vol. 14. Academic Press, New York, USA, pp. 33-39.

- I -

IFFO, 2002. Perspectiva del Mercado mundial de harina y aceite de pescado (por S.M. Barlow). 2ª Conferencia sobre Sub-Productos Marinos, Alaska. <http://www.iffo.org.uk/tech-sp/alaska-Sp.htm>

Ingram, G.A., 1990. Complement-fixation test. En: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., Muiswinkel, W.B. (Eds.), *Techniques in fish immunology (I)*. SOS Publications, Fair Haven, New Jersey, USA, pp. 25-44.

Iritani, N., Nagashima, K., Fukuda, H., Katsurada, A., Tanaka, T., 1986. Effects of dietary proteins on lipogenic enzymes in rat liver. *J. Nutr.* 116, 190-197.

Iritani, N., Hosomi, H., Fukuda, H., Tada, K., Ikeda, H., 1996. Soybean protein suppresses hepatic lipogenic enzyme gene expression in Wistar fatty rats. *J. Nutr.* 126, 380-388.

- J -

Jacobs, M.N., Johnston, P.A., Santillo, D., Wyatt, C.L., 1997. Organo-chlorine pesticide and PCB residues in pharmaceutical and industrial grade fish oils. *Int. J. Environ. Poll.* 8, 74-93.

Jacobs, M.N., Johnston, P.A., Santillo, D., Wyatt, C.L., 1998. Organo-chlorine residues in fish oil dietary supplements: comparison with industrial grade oils. *Chemosphere* 37, 1709-1731.

Jacobson, J.L., Jacobson, S.W., 1996. Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *New Engl. J. Med.* 335, 783-789.

Jensen, S., Jernelov, A., 1969. Biological methylation of mercury in aquatic organisms. *Nature* 223, 753-754.

Judd, N., Griffith, W.C., Faustman, E.M., 2004. Contribution of PCB exposure from fish consumption to total dioxin-like dietary exposure. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 40, 125-135.

- K -

Kanazawa, A., 1985. Essential fatty acid and lipid requirement of fish. En: Cowey, C.B., Mackie, A.M., Bell, J.G. (Eds.), *Nutrition and Feeding in Fish*. Academic Press, London, pp. 281-298.

- Kaushik, S.J., 1990. Use of alternative protein sources for the intensive rearing of carnivorous fishes. En: Flos, R., Tort, L., Torres, P. (Eds.), Mediterranean Aquaculture. Ellis Horwood, UK, pp. 125-138.
- Kaushik, S.J., 1998. Whole body amino acid composition of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Psetta maxima*) with an estimation of their IAA requirement profiles. Aquat. Living Resour. 11, 355-358.
- Kaushik S.J., Cowey C.B., 1991. Ammoniogenesis and dietary factors affecting nitrogen excretion. En: Cowey, C.B., Cho, C.Y. (Eds.), Nutritional Strategies & Aquaculture Waste. Univ. Guelph, Guelph, Canada, pp. 3-19.
- Kaushik, S.J., Luquet, P., 1979. Influence of dietary amino acid patterns on the free amino acid contents of blood and muscle of rainbow trout (*Salmo gairdnerii* R.). Comp. Biochem. Physiol. 64B, 175-180.
- Kaushik, S.J., Oliva-Teles, A., 1985. Effects of digestible energy on nitrogen and energy balance in rainbow trout. Aquaculture 50, 89-101.
- Kaushik, S.J., Cravedi, J.P., Lalles, J.P., Sumpter, J., Fauconneau, B., Laroche, M., 1995. Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 133, 257-274.
- Kayashita, J., Shimaoka, I., Nakajoh, M., Kato, N., 1996. Feeding buckwheat protein extract reduces hepatic triglyceride concentration, adipose tissue weight, and hepatic lipogenesis in rats. J. Nutr. Biochem. 7, 555-559.
- Kelley, K.M., Haigwood, J.T., Perez, M., Galima, M.M., 2001. Serum insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs)

- as markers for anabolic/catabolic condition in fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 129B, 229-236.
- Kelley, K.M., Schmidt, K.E., Berg, L., Sak, K., Galima, M.M., Gillespie, C., Balogh, L., Hawayek, A., Reyes, J.A., Jamison, M., 2002. Comparative endocrinology of the insulin-like growth factor-binding protein. *J. Endocrinol.* 175, 3-18.
- Kelley, K.M., Siharath, K., Bern, H.A., 1992. Identification of insulin-like growth factor-binding protein in the circulation of four teleost fish species. *J. Exp. Zool.* 263, 220-224.
- Kern, M., Ellison, D., Marroquin, Y., Ambrose, M., Mosier, K., 2002. Effects of soy protein supplemented with methionine on blood lipids and adiposity of rats. *Nutrition* 18, 654.
- Ketola, G.H., 1982. Amino acid nutrition of fishes: Requirements and supplementation of diet. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B, 17-24.
- Kibria, G., Nugegoda, D., Fairclough, R., Lam, P., Bradley, A., 1999. Utilization of wastewater-grown zooplankton: Nutritional quality of zooplankton and performance of silver perch *Bidyanus bidyanus* (Mitchell 1838) (Teraponidae) fed on wastewater-grown zooplankton. *Aquacult. Nutr.* 5, 221-227.
- Kiron, V., Puangkaew, J., Ishizaka, K., Satoh, S., Watanabe, T. 2004. Antioxidant status and nonspecific immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two levels of vitamin E along with three lipid sources. *Aquaculture* 234, 361-379.
- Kissil, G.W., 1991. Gilthead sea bream, *Sparus aurata*. En: Wilson, R.P. (Ed.), *Handbook of nutrient requirements of finfish*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 83-88.
- Kissil, G.W., Lupatsch, I., Higgs, D.A., Hardy, R.W., 2000. Dietary substitution of soy and rapeseed protein concentrates for fish meal, and their effects on growth and nutrient

- utilization in gilthead seabream *Sparus aurata* L. Aquacult. Res. 31, 595-601.
- Knobeloch, L., Anderson, H.A., Imm, P., Peters, D., Smith, A., 2005. Fish consumption, advisory awareness, and hair mercury levels among women of childbearing age. Environ. Res. 97, 220-227.
- Kopchick, J.J., Andry, J.M., 2000. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. Mol. Genet. Metab. 71, 293-314.
- Krogdahl, A., Bakke-Mckellep, A.M., Baeverjord, G., 2003. Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquacult. Nutr. 9, 361-371.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei, M., 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software.

- L -

- Langston, W.J., 1990. Toxic effects of metals and the incidence of metal pollution in marine ecosystems. En: Firness, R.W., Rainbow, P.S. (Eds.), Heavy Metals in the Marine Environment. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 101-122.
- Le Corre, P., Treguer, P., 1976. Contribution à l'étude de la matière organique dissoute et des sels nutritifs dans l'eau de mer. Caractéristiques chimiques du golfe de Gascogne et des upwellings côtiers de l'Afrique du Nord-Ouest. Thèse de doctorat es Sciences. UBO, Brest, 490 pp.
- Lee, L.T., Nong, G., Chan, Y.H., Tse, D.L., Cheng, C.H., 2001. Molecular cloning of a teleost growth hormone receptor and its functional interaction with human growth hormone. Gene 270, 121-129.

- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 1993. Principios de Bioquímica (Segunda Edición). Ediciones Omega S.A., Barcelona, 1013 pp.
- Li, P., Gatlin III, D.M., 2003. Evaluation of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*). *Aquaculture* 219, 681–692.
- Liang, X-F., Oku, H., Ogata, H.Y., 2002. The effects of feeding condition and dietary lipid level on lipoprotein lipase gene expression in liver and visceral adipose tissue of red sea bream *Pagrus major*. *Comp. Biochem. Physiol.* 131A, 335-342.
- Lima, L., Matus, P., Drujan, B., 1989. Spacial distribution of glutamate, taurine and GABA in teleosts and mammal retina: in vivo and in vitro study. *Int. J. Dev. Neurosci.* 7, 295-300.
- Lindberg, A., Olivecrona, G., 2002. Lipoprotein lipase from rainbow trout differs in several respects from the enzyme in mammals. *Gene* 292, 213–223.
- Lumare, F., 1978. Present state of knowledge on cultivable species in the Mediterranean. United Nations Environment Programme-UNEP, Document UNEP/WG-15/3, 30 January 1978, w/G 6802, 84 pp.
- Lupatsch, I., Kissil, G.W., Sklan, D., Pfeffer, E., 1997. Apparent digestibility coefficients of feed ingredients and their predictability in compound diets for gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquacult. Nutr.* 3, 81-89.
- Luquet, P., Sabaut, J.J., 1974. Nutrition azotée et croissance chez la daurade et la truite. En: CNEXO (Ed.), Colloque sur l'Aquaculture. Actes de Colloques no. 1, Brest 1973, France, pp. 243-253.

Lyndon, A.R., Davidson, I., Houlihan, D.F., 1993. Changes in tissue and plasma free amino acid concentrations after feeding in Atlantic cod. *Fish Physiol. Biochem.* 10, 365-375.

- M -

Mambrini, M., Kaushik, S.J., 1995. Indispensable amino acid requirements of fish: correspondence between quantitative data and amino acid profiles of tissue proteins. *J. Applied Ichthyol.* 11, 240-247.

Martí-Palanca, H., Martínez-Barberá, J.P., Pendón, C., Valdivia, M.M., Pérez-Sánchez, J., Kaushik, S., 1996. Growth hormone as a function of age and dietary protein:energy ratio in a marine teleost, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Growth Regul.* 6, 253-259.

Martínez-Barberá, J.P., Pendón, C., Rodríguez, R.B., Pérez-Sánchez, J., Valdivia, M.M., 1994. Cloning, expression, and characterization of a recombinant gilthead seabream growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 96, 179-188.

Martínez-Barberá, J.P., Pendón, C., Martí-Palanca, H., Calduch-Giner, J.A., Rodríguez, R., Valdivia, M.M., Pérez-Sánchez, J., 1995. The use of recombinant gilthead sea bream growth hormone for radioiodination and standard preparation in radioimmunoassay. *Comp. Biochem. Physiol.* 110A, 335-340.

Martino, R.C., Cyrino, J.E.P., Portz, L., Trugo, L.C., 2002. Performance and fatty acid composition of surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) fed diets with animal and plant lipids. *Aquaculture* 209, 233-246.

Maures, T.J., Duan, C., 2002. Structure, developmental expression, and physiological regulation of zebrafish IGF binding protein-1. *Endocrinology* 143, 2722-2731.

- McGowan, M.W., Artiss, J.D., Strandbergh, D.R., Zak, B., 1983. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin. Chem.* 29, 538-542.
- Médale, F., Brauge, C., Vallée, F., Kaushik, S.J., 1995. Effects of dietary protein/energy ratio, ration size, dietary energy source and water temperature on nitrogen excretion in rainbow trout. *Water Sci. Technol.* 31, 185-194.
- Mente, E., Coutteau, P., Houlihan, D.F., Davidson, I., Sorgeloos, P., 2002. Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*: effects of dietary protein source. *J. Exp. Biol.* 205, 3107-3122.
- Metón, I., Mediavilla, D., Caseras, A., Cantó, E., Fernández, F., Baanante, I.V., 1999. Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br. J. Nutr.* 82, 223-232.
- Millamena, O.M., Golez, N.V., 2001. Evaluation of processed meat solubles as replacement for fish meal in diet for juvenile grouper *Epinephelus coioides* (Hamilton). *Aquacult. Res.* 32, 281-287.
- Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, S., Astola, A., Pendón, C., Martínez-Valdivia, M., Pérez-Sánchez, J., 2002. Endocrine mediators of seasonal growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): growth hormone and somatolactin paradigm. *Gen. Comp. Endocrinol.* 128, 102-111.
- Montero, D., Marrero, M., Izquierdo, M.S., Vergara, J.M., Tort, L., 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture* 171, 269-278.

- Montero, D., Kalinowski, T., Obach, A., Robaina, L., Tort, L., Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., 2003. Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health. *Aquaculture* 225, 353-370.
- Moretti, A., Fernández-Criado, M.P., Cittolin, G., Guidastri, R., 1999. Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream. FAO, Roma, 194 pp.
- Mourente, G., Good, J.E., Bell, J.G., 2005. Partial substitution of fish oil with rapeseed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E₂ and F_{2α}, immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Aquacult. Nutr.* 11, 25-40.
- Moyano, F.G.C., De la Higuera, M., 1991. Nutritive and metabolic utilization of proteins with high glutamic acid content by the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* 100A, 759-762.
- Mulero, V., Esteban, M.A., Muñoz, J., Meseguer, J., 1998. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 8, 49-62.
- Mundheim, H., Aksnes, A., Hope, B., 2004. Growth, feed efficiency and digestibility in salmon (*Salmo salar* L.) fed different dietary proportions of vegetable protein sources in combination with two fish meal qualities. *Aquaculture* 237, 315-331.
- Muñoz, P., Calduch-Giner, J.A., Sitjà-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P., Pérez-Sánchez, J., 1998. Modulation of the respiratory burst activity of Mediterranean sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) phagocytes by growth hormone and parasitic status. *Fish Shellfish Immunol.* 8, 25-36.
- Muñoz, P., Sitjà-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P., 2000. Cellular and humoral immune response of European sea bass

(*Dicentrarchus labrax* L.) (Teleostei: Serranidae) immunized with *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporea: Bivalvulida). *Parasitology* 120, 465-477.

Murai, T., Wang, D., Ogata, H., 1989. Supplementation of methionine to soy flour diets for fingerling carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* 77, 373-385.

Mwachireya, S.A., Beames, R.M., Higgs, D.A., Dosanjh, B.S., 1999. Digestibility of canola protein products derived from the physical, enzymatic and chemical processing of commercial canola meal in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) held in fresh water. *Aquacult. Nutr.* 5, 73-82.

- N -

National Research Council (NRC), 1993. Nutrient Requirements of Fish. National Academy Press, Washington, DC., 124 pp.

National Research Council (NRC), 1999. Sustaining Marine Fisheries. National Academy Press, Washington, DC., 164 pp.

Naylor, R.L., Goldburg, R.J., Primavera, J.H., Kautsky, N., Beveridge, M.C.M., Clay, J., Folke, C., Lubchenco, J., Mooney, H., Troell, M., 2000. Effects of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405, 1017-1024.

Nengas, I., Alexis, M.N., Davies, S.J., Petichakis, G., 1995. Investigation to determine digestibility coefficients of various raw materials in diets for gilthead sea bream, *Sparus auratus* L. *Aquacult. Res.* 26, 185-194.

Nengas, I., Alexis, M.N., Davies, S.J., 1996. Partial substitution of fishmeal with soybean meal products and derivatives in diets for the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquacult. Res.* 27, 147-156.

Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E., Boelens, P.G., van Norren, K., van Leeuwen, P.A., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 418-425.

Niu, D., Le Bail, P-Y., 1993. Presence of insulin-like growth factor binding-protein (IGF-BP) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum. *J. Exp. Zool.* 265, 627-636.

- O -

Ochoa, S., 1955. Malic enzyme. En: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. 1. Academic Press, New York, pp. 739-753.

Ogino, C., 1980. Requirement of carp and rainbow trout for essential amino acids. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 46, 171-174.

Oku, H., Ogata, H.Y., Liang, X-F., 2002. Organization of the lipoprotein lipase gene of red sea bream *Pagrus major*. *Comp. Biochem. Physiol.* 131B, 775-785.

Oliva-Teles, A., Gonçalves, P., 2001. Partial replacement of fishmeal by brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture* 202, 269-278.

Olsen, R.E., Myklebust, R., Kaino, T., Ringoe, E., 1999. Lipid digestibility and ultrastructural changes in the enterocytes of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) fed linseed oil and soybean lecithin. *Fish Physiol. Biochem.* 21, 35-44.

Olsen, R.E., Myklebust, R., Ringoe, E., Mayhew, T.M., 2000. The influences of dietary linseed oil and saturated fatty acids on caecal enterocytes in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.): a quantitative ultrastructural study. *Fish Physiol. Biochem.* 22, 207-216.

Organización Mundial de la Salud (OMS), 1989. Environmental Health Criteria, Mercury-Environmental Aspects, vol. 86, World Health Organization, Geneva, pp. 115.

Organización Mundial de la Salud (OMS), 2003. Summary and conclusions of the sixty-first meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), JECFA/61/SC, Rome, 10-19 June 2003.

Ortuño, J., Esteban, M.A., Meseguer, J., 1999. Effect of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune response of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Fish Shellfish Immunol. 9, 429-443.

Ortuño, J., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2000. High dietary intake of alpha-tocopherol acetate enhances the non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish Shellfish Immunol. 10, 293-307.

Ortuño, J., Cuesta, A., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2001. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. Vet. Immunol. Immunopathol. 79, 167-180.

Ortuño, J., Cuesta, A., Rodríguez, A., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2002. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Vet. Immunol. Immunopathol. 85, 41-50.

- P -

Panserat, S., Médale, F., Brèque, J., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Gomes, E., Krishnamoorthy, R., Kaushik, S., 2000a. Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). Am. J. Physiol. 278, 1164-1170.

- Panserat, S., Médale, F., Brèque, J., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S., 2000b. Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on glucose-6-phosphatase expression in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Nutr. Biochem. 11, 22-29.
- Papadopoulos, A., Vassiliadou, I., Costopoulou, D., Papanicolaou, C., Leondiadis, L., 2004. Levels of dioxins and dioxin-like PCBs in food samples on the Greek market. Chemosphere 57, 413-419.
- Park, G., Takeuchi, T., Yokoyama, M., Seikai, T., Park, G.S., 2002. Optimal dietary taurine level for growth of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish. Sci. 68, 824-829.
- Park, R., Sheperd, B.S., Nishioka, R.S., Grau, E.G., Bern, H.A., 2000. Effects of homologous pituitary hormone treatment on serum insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) in hypophysectomized tilapia, *Oreochromis mossambicus*, with special reference to a novel 20-kDa IGFBP. Gen. Comp. Endocrinol. 117, 404-412.
- Park, T., Oh, J., Lee, K., 1999. Dietary taurine or glycine supplementation reduces plasma and liver cholesterol and triglyceride concentrations in rats fed a cholesterol-free diet. Nutr. Res. 19, 1777-1789.
- Parpoura, A.C.R., Alexis, M.N., 2001. Effects of different dietary oils in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) nutrition. Aquacult. Int. 9, 463-476.
- Pascual, P., Pedrajas, J.R., Toribio, F., López-Barea, J., Peinado, J., 2003. Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). Chem-Biol. Interactions 145, 191-199.
- Peña-Llopis, S., Ferrando, M.D., Peña, J.B., 2003. Increased recovery of brain acetylcholinesterase activity in dichlorvos-intoxicated European eels (*Anguilla anguilla*) by bath

- treatment with N-acetylcysteine. *Dis. Aqua. Org.* 55, 237-245.
- Pereira, T.G., Oliva-Teles, A., 2002. Preliminary evaluation of pea seed meal in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquacult. Res.* 33, 1183-1189.
- Pérez-Sánchez, J., 2000. The involvement of growth hormone in growth regulation, energy homeostasis and immune function in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*): a short review. *Fish Physiol. Biochem.* 22, 135-144.
- Pérez-Sánchez, J., Le Bail, P-Y., 1999. Growth hormone axis as marker of nutritional status and growth performance in fish. *Aquaculture* 177, 117-128.
- Pérez-Sánchez, J., Martí-Palanca, H., Le Bail, P-Y., 1994. Homologous growth hormone binding in gilthead sea bream. Effect of fasting and refeeding on hepatic GH-binding and plasma somatomedin-like immunoreactivity. *J. Fish Biol.* 44, 287-301.
- Pérez-Sánchez, J., Martí-Palanca, H., Kaushik, S., 1995. Ration size and protein intake affect circulating growth hormone concentration, hepatic growth hormone binding and plasma insulin-like growth factor-I immunoreactivity in a marine teleost, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Nutr.* 125, 546-552.
- Pérez-Sánchez, J., Weil, C., Le Bail, P-Y., 1992. Effects of human insulin-like growth factor-I on release of growth hormone by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pituitary cells. *J. Exp. Zool.* 262, 287-290.
- Pérez-Sánchez, J., Caldach-Giner, J.A., Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, S., Gómez-Requeni, P., Saera-Vila, A., Astola, A., Valdivia, M.M., 2002. Overview of fish growth hormone family. New insights in genomic organization and heterogeneity of growth hormone receptors. *Fish Physiol. Biochem.* 27, 243-258. Publicación especial "Fish Growth

and Metabolism. Experimental, Nutritional and Hormonal Regulation”. Plisetskaya, E.M. (Ed.) (publicado en el 2004).

Peterson, B.C., Small, B.C., 2004. Effects of fasting on circulating IGF-binding proteins, glucose, and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Domest. Anim. Endocrinol. 26, 231-240.

Plascencia-Jatomea, M., Olvera-Novoa, M.A., Arredondo-Figueroa, J.L., Hall, G.M., Shirai, K., 2002. Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L) diets. J. Sci. Food Agricult. 82, 753-759.

Prusiner, S.B., 1998. Prions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13363-13383.

- Q -

Quade, M.J., Roth, J.A., 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. Vet. Immunol. Immunopathol. 58, 239-248.

- R -

Ravi J., Devaraj K.V., 1991. Quantitative essential amino acid requirements for growth of Catla catla (Hamilton). Aquaculture 96, 281-291.

Reeds, P.J., Burin, D.G., Stoll, B., Jahoor, F., 2000. Intestinal glutamate metabolism. J. Nutr. 130, 978-982.

Refsgaard, H.H.F., Brockhoff, P.B., Jensen, B., 1998. Biological variation of lipid constituents and distribution of tocopherols and astaxanthin in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). J. Agric. Food Chem. 46, 808-812.

- Regost, C.J., Arzel, J., Kaushik, S.J., 1999. Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 180, 99-117.
- Regost, C., Arzel, J., Cardinal, M., Robin, J., Laroche, M., Kaushik, S.J., 2001. Dietary lipid level, hepatic lipogenesis and flesh quality in turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 193, 291-309.
- Robaina, L., Izquierdo, M.S., Moyano, F.J., Socorro, J., Vergara, J.M., Montero, D., Fernández-Palacios, H., 1995. Soybean and lupin seed meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implications. *Aquaculture* 130, 219-233.
- Robaina, L., Izquierdo, M.S., Moyano, F.J., Socorro, J., Vergara, J.M., Montero, D., 1998. Increase of the dietary n – 3 / n – 6 fatty acid ratio and addition of phosphorus improves liver histological alterations induced by feeding diets containing soybean meal to gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 161, 281-293.
- Robaina, L., Corraze, G., Aguirre, P., Blanc, D., Melcion, J.P., Kaushik, S., 1999. Digestibility, postprandial ammonia excretion and selected plasma metabolites in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed pelleted or extruded diets with or without wheat gluten. *Aquaculture* 179, 45-56.
- Rodriguez, A., Cuesta, A., Ortuño, J., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2003. Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata* L.). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 96, 183-192.
- Roeschlau, P., Bernt, E., Gruber, W.A., 1974. Enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Clin. Chem. Clin. Biochem.* 12, 226-227.
- Rudd, H.L., 1970. Chemicals in the environment. *Calif. Med.* 113, 27-32.

Rumsey, G.L., Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Bowser, P.R., 1994. Effect of soybean protein on serological response, nonspecific defence-mechanisms, growth, and protein-utilization in rainbow-trout. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 41, 323-339.

- S -

Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.-A., Pérez-Sánchez, J., 2005a. Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 193-203.

Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.A., Gómez-Requeni, P., Médale, F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2005b. Molecular characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) lipoprotein lipase. Transcriptional regulation by season and nutritional condition in liver and extrahepatic sites. *Comp. Biochem. Physiol.* 142B, 224-232.

Sanden, M., Bruce, I.J., Rahman, M.A., Hemre, G.-I., 2004. The fate of transgenic sequences present in genetically modified plant products in fish feed, investigating the survival of GM soybean DNA fragments during feeding trials in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture* 237, 391-405.

Santinha, P.J.M., Médale, F., Corraze, G., Gomes, E.F.S., 1999. Effects of the dietary protein:lipid ratio on growth and nutrient utilization in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquacult. Nutr.* 5, 147-156.

Sargent, J.R., Tacon, A.G., 1999. Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *Proc. Nutr. Soc.* 58, 377-383.

Sargent, J.R., Bell, J.G., Bell, M.V., Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1995. Requirement criteria for essential fatty acids.

- Symposium of European Inland Fisheries Advisory Commission. J. Appl. Ichthyol. 11, 183-198.
- Sargent, J., Bell, J.G., McEvoy, L., Tocher, D., Estevez, A., 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. Aquaculture 177, 191-199.
- Sargent, J.R., Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1989. The lipids. En: Halver, J.E. (Ed.), Fish Nutrition. Academic Press, New York, NY, pp. 154–218.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2002. The lipids. En: Halver, J.E, Hardy, R.W. (Eds.), Fish Nutrition. Academic Press, San Diego, Capítulo 4, pp. 181-257.
- SCAN, 2000. Dioxin contamination of feedingstuffs and their contribution to the contamination of food of animal origin. Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition, Brussels, Belgium, European Commission for Health and Consumer Protection Directorate-General. 105 pp. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.html.
- Schuhmacher, A., Muench, M., Gropp, J.M., 1995. Non-essential amino acid sources in crystalline amino acid diets for trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Appl. Ichthyol. 11, 317-321.
- Segner, H., Böhm, R., 1994. Enzymes of lipogenesis. En: Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds.), Biochemistry and molecular biology of fishes: Analytical techniques. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands, pp. 313-325.
- Shimizu, M., Swanson, P., Dickhoff, W.W., 1999. Free and protein-bound insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins in plasma of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. Gen. Comp. Endocrinol. 115, 398-405.
- Shimizu, M., Swanson, P., Fukada, H., Hara, A., Dickhoff, W.W., 2000. Comparison of extraction methods and assay validation for salmon insulin-like growth factor-I using

- commercially available components. *Gen. Comp. Endocrinol.* 119, 26–36.
- Shimizu, M., Swanson, P., Hara, A., Dickhoff, W.W., 2003. Purification of a 41 kDa insulin-like growth factor binding protein from serum of Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 132, 103-111.
- Sidhu, K.S., 2003. Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 38, 336–344.
- Simopoulos, A.P., 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am. J. Nutr.* 70, 560–569.
- Simopoulos, A.P., 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids (Dossier: Polyunsaturated fatty acids in biology and diseases). *Biomed. Pharmacother.* 56, 365–379.
- Sitjà-Bobadilla, A., Mingarro, M., Pujalte, M.J., Garay, E., Alvarez-Pellitero, P., Pérez-Sánchez, J., 2003. Immunological and pathological status of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) under different long-term feeding regimes. *Aquaculture* 220, 707-724.
- Sitjà-Bobadilla, A., Peña-Llopis, S., Gómez-Requeni, P., Médale, F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2005. Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* (en prensa).
- Spitsbergen, J.M., Walker, M.K., Olson, J.R., Peterson, R.E., 1991. Pathologic alterations in early life stages of lake trout, *Salvelinus namaycush*, exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin as fertilized eggs. *Aquat. Toxicol.* 19, 41–72.
- Storelli, M.M., Storelli, A., Giacomini-Stuffler, R., Marcotrigiano, G.O., 2005. Mercury speciation in the muscle

of two commercially important fish, hake (*Merluccius merluccius*) and striped mullet (*Mullus barbatus*) from the Mediterranean sea: estimated weekly intake. Food Chem. 89, 295-300.

Suau, P., López, J., 1976. Contribución al estudio de la dorada, *Sparus aurata* L. Inv. Pesq. 40, 169-199.

Sunyer, J.O., Tort, L., 1995. Natural hemolytic and bacterial activities of seabream *Sparus aurata* serum are affected by the alternative complement pathway. Vet. Immunol. Immunopathol. 45, 333-345.

Svensson, B.G., Hallberg, T., Schutz, A., Hagmar, L., 1994. Parameters of immunological competence in subjects with high consumption of fish contaminated with persistent organochlorine compounds. Arch. Occup. Environ. Health 65, 351-358.

Svensson, B.G., Mikoczy, Z., Stroemberg, U., Hagmar, L., 1995. Mortality and cancer incidence among Swedish fishermen with a high dietary intake of persistent organochlorine compounds. Scand. J. Work Environ. Health 21, 106-115.

- T -

Tacon, A.G.J., 1994. Feed ingredients for carnivorous fish species alternatives to fishmeal and other fishery resources. FAO Fish. Circ., no. 881, FAO, Roma, 35 pp.

Tacon, A.G.J., 1997a. Feeding tomorrow's fish: keys for sustainability. En: Tacon, A., Basurco, B. (Eds.), Feeding Tomorrow's Fish. Cahiers Options Méditerranéennes 22, 153-182.

Tacon, A.G.J., 1997b. Fishmeal replacers. Review of antinutrients within oilseeds and pulses-a limited factor for the aquafeed green revolution? En: Tacon, A., Basurco, B.

- (Eds.), Feeding Tomorrow's Fish. Cahiers Options Méditerranéennes 22, 153-182.
- Takeuchi, K., Toyohara, H., Sakaguchi, M., 2000. A hyperosmotic stress-induced mRNA of carp cell encodes Na⁺- and Cl⁻-dependent high affinity taurine transporter. Biochim. Biophys. Acta 1464, 219-230.
- Tchounwou, P.B., Ayensu, W.K., Ninashvili, N., Sutton, D., 2003. Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. Environ. Toxicol. 18, 149-175.
- Thiessen, D.L., Campbell, G.L., Adelizi, P.D., 2003. Digestibility and growth performance of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with pea and canola products. Aquacult. Nutr. 9, 67-75.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22, 4673-4680.
- Tidwell, J.H., Allan, G.L., 2001. Fish as food: aquaculture's contribution. EMBO Rep. 2, 958-963.
- Tocher, D.R., 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. Rev. Fish. Sci. 11, 107-184.
- Tressou, J., Crépet, A., Bertail, P., Feinberg, M.H., Leblanc, J.Ch., 2004. Probabilistic exposure assessment to food chemicals based on extreme value theory. Application to heavy metals from fish and sea products. Food Chem. Toxicol. 42, 1349-1358.
- Trinder, P., 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. Ann. Clin. Biochem. 6, 24-27.

Trudeau, V. L., Sloley, B. D., Kah, O., Mons, N., Dulka, J. G., Peter, R. E., 1996. Regulation of growth hormone secretion by amino acid neurotransmitters in the goldfish (I): inhibition by N-methyl-D,L-aspartic acid. *Gen. Comp. Endocrinol.* 103, 129-137.

Tse, D.L.Y., Tse, M.C.L., Chan, C.B., Deng, L., Zhang, W.M., Lin, H.R., Cheng, C.H.K., 2003. Sea bream growth hormone receptor: molecular cloning and functional studies of the full length cDNA, and tissue expression of two alternatively spliced forms. *Biochim. Biophys. Acta* 1265, 64-76.

Tusnády, G.E., Simon I., 2001. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 17, 849-850.

- U -

Uauy, R., Valenzuela, A., 2000. Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. *Nutrition* 16, 680-684.

- V -

Valentino, L., Torregrossa, M.V., Saliba, L.J., 1995. Health effects of mercury ingested through consumption of seafood. *Water Sci. Technol.* 32, 41-47.

Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A., Brunstroem, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S., Kubiak, T., Larsen, J., Van Leeuwen, F., Liem, A., Nolt, C., Peterson, R., Poellinger, L., Safe, S., Schenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Waern, F., Zacharewski, T., 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.* 106, 775-792.

Van Leeuwen, F.X.R., Feeley, M., Schrenk, D., Larsen, J.C., Farland, W., Younes, M., 2000. Dioxins: WHO's tolerable daily intake (TDI) revisited. *Chemosphere* 40, 1095-1101.

Vega-Rubín de Celis, S., Gómez, P., Calduch-Giner, J.A., Médale, F., Pérez-Sánchez, J., 2003. Expression and characterization of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) somatolactin: assessment of in vivo metabolic effects. *Mar. Biotechnol.* 5, 92-101.

Vega-Rubín de Celis, S., Gómez-Requeni, P., Pérez-Sánchez, J., 2004. Production and characterization of recombinantly derived peptides and antibodies for accurate determinations of somatolactin, growth hormone and insulin-like growth factor-I in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 139, 266–277.

- W -

Waagbø, R., 1994. The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a review. *Aquacult. Fish Manag.* 25, 175-197.

Walker, M.K., Peterson, R.E., 1991. Potencies of polychlorinated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran and biphenyl congeners, relative to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin for producing early life stage mortality in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 21, 219–238.

Wang, T.C., Fuller, M.F., 1989. The optimum dietary amino acid pattern for growing pigs. 1. Experiments by amino acid deletion. *Br. J. Nutr.* 62, 77-89.

Watanabe, T., Verakunpiriya, V., Watanabe, K., Viswanath, K., Satoh, S., 1998. Feeding of rainbow trout with non-fish meal diets. *Fish. Sci.* 63, 258-266.

Wilson, R.P., 1989. Amino acids and proteins. En: Halver, J. (Ed.), *Fish Nutrition*. Academic Press, London, UK, pp. 112-153.

Wilson, R.P., Poe, W.E., 1985. Apparent digestibility protein and energy coefficients of feed ingredients for channel catfish. *Prog. Fish-Cult.* 47, 154-158.

Wood, J.M., 1974. Biological cycles for toxic elements in the environment. *Science* 183, 1049-1052.

- Y -

Yao, K., Niu, P-D., Le Gac, F., Le Bail, P-Y., 1991. Presence of specific growth hormone binding sites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues: characterization of the hepatic receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.* 81, 72-82.

Yano, T., 1992. Assays of hemolytic complement activity. En: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Kaattari, S.L., Rowley, A.F. (Eds.), *Techniques in fish immunology (II)*. SOS Publications, Fair Haven, New Jersey, USA, pp. 131-141.

Yokoyama, M.J., Nakazoe, I., 1992. Accumulation and excretion of taurine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets supplemented with methionine, cystine and taurine. *Comp. Biochem. Physiol.* 102A, 565-568.

- Z -

Zagarese, H.E., Williamson, C.E., 2001. The implications of solar UV radiation exposure for fish and fisheries. *Fish Fisheries* 2, 250-260.

Zaldívar, F.J., 2002. Las harinas y aceites de pescado en la alimentación acuícola. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M.G., Simoes, N. (Eds.), *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3-6 de septiembre del 2002*. Cancún, Quintana Roo, México.

- Zhu, T., Goh, E.L.K., Graichen, R., Ling, L., Lobie, P.E., 2001. Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell. Signal.* 13, 599-616.
- Zohar, Y., Gordin, H., 1979. Spawning kinetics in the gilthead sea-bream, *Sparus aurata* L. after low doses of human chorionic gonadotropin. *J. Fish Biol.* 15, 665-670.
- Zohar, Y., Billard, R., Weil, C., 1984. La reproduction de la daurade (*Sparus aurata*) et du bar (*Dicentrarchus labrax*): connaissance du cycle sexuel et contrôle de la gamétogenèse et de la ponte. En: Barnabé, G., Billard, R. (Eds.), *L'Aquaculture du Bar et des Sparidés*. INRA Press., Paris, pp. 3–24.
- Zohar, Y., Goren, A., Tosky, M., Pagelson, G., Liebovitz, D., Koch, Y., 1989. The bioactivity of gonadotropin-releasing hormones and its regulation in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*, in vivo and in vitro studies. *Fish Physiol. Biochem.* 7, 59-67.



Apéndices



Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotropic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*)

P. Gómez-Requeni^a, M. Mingarro^a, S. Kirchner^b,
J.A. Calduch-Giner^a, F. Médale^b, G. Corraze^b, S. Panserat^b,
S.A.M. Martin^c, D.F. Houlihan^c, S.J. Kaushik^b, J. Pérez-Sánchez^{a,*}

^aInstituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC), 12595 Ribera de Cabanes, Castellón, Spain

^bLaboratoire de Nutrition, Unité Mixte INRA-IFREMER, 64310 Saint-Pée-sur-Nivelle, France

^cDepartment of Zoology, AB24 2TZ University of Aberdeen, Aberdeen, Scotland, UK

Received 9 September 2002; received in revised form 2 December 2002; accepted 2 December 2002

Abstract

Juvenile gilthead sea bream were fed to visual satiety with isonitrogenous diets based on fish meal and different plant ingredients (33–35% replacement) supplemented with free amino acids to meet the desired indispensable amino acid (IAA) profile and dispensable amino acid (DAA) content. In diets M and WB, IAA profile and DAA content resemble that of the muscle or whole body, respectively. In diets MGLu and WBGLu, DAA content was increased by adding L-glutamic acid (Glu) and thus the IAA/DAA ratio varied from 1.13 (diet M) to 0.80 (diet WBGLu). Growth rates were not significantly different among experimental groups, but feed conversion ratio and nitrogen retention were impaired by the decrease of dietary IAA/DAA ratio. Postprandial ammonia excretion increased with the increase of dietary DAA content irrespective of IAA profile. Conversely, hepatic activity of glutamate dehydrogenase (GDH) was lower in fish fed diet WBGLu than in fish fed diet M. Hepatic growth hormone (GH) binding was not significantly affected by the dietary treatment, but circulating levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and GH were, respectively, down- and up-regulated in fish fed diet WBGLu, which suggests some defect in the transmission of GH receptor signal. Fat retention and hepatic activities of lipogenic enzymes (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD; malic enzyme, ME) were decreased in fish fed diet MGLu. Key metabolic enzymes of hepatic glycolysis (glucokinase, GK) and gluconeogenesis (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK) were also altered in this group of fish. Since soybean meal concentration was highest in diet

* Corresponding author. Tel.: +34-964-319500; fax: +34-964-319509.

E-mail address: jperez@iats.csic.es (J. Pérez-Sánchez).

MGLu, results on lipid and carbohydrate metabolism can be primarily attributed to this component of the diet. In contrast, data on growth performance, ammonia excretion and GH axis mainly reflect changes in the dietary amino acid profile, which reveals that a muscle IAA profile and a high IAA/DAA ratio are important in feeds for gilthead sea bream.

© 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Dietary amino acids; Ammonia excretion; Protein accretion; Lipogenesis; Glycolysis; Gluconeogenesis; Growth hormone; Insulin-like growth factor-I; Gilthead sea bream

1. Introduction

Formulated feeds for intensively reared carnivorous fish generally contain 40–50% protein (Wilson and Halver, 1986; NRC, 1993; Kaushik, 1995), most of which is supplied by fish meal. However, while the annual production of fish meal is stabilised at 6–7 million tonnes, aquaculture is expanding at a rate of 11% per year (Tidwell and Allan, 2001). This growth cannot be supported by only fish-meal-based diets, and attention has been directed towards the incorporation of plant protein sources in feeds of even carnivorous fish, such as rainbow trout (Kaushik et al., 1995; Teskeredzic et al., 1995; Vielma et al., 2000), chinook salmon (Bureau et al., 1998), Atlantic salmon (Storebakken et al., 2000), gilthead sea bream (Robaina et al., 1995, 1998; Alarcón et al., 1999), European sea bass (Gouveia and Davies, 1998), striped bass (Gallagher, 1994), Japanese flounder (Kikuchi, 1999) and turbot (Burel et al., 2000).

Plant raw materials contain, however, a wide variety of antinutritional factors that affect health and interfere with intermediary metabolism (Kaushik, 1990; Tacon, 1997; Clarke and Wiseman, 2000b; Francis et al., 2001). Moreover, plant proteins are limiting in one or more IAAs (Kaushik, 1990; NRC, 1993; Clarke and Wiseman, 2000a), and fish feeds containing plant protein ingredients must be formulated to correct IAA deficiencies or imbalances. This fact seems to be especially relevant for marine teleosts that generally exhibit a higher protein requirement than their freshwater counterparts (Kaushik, 1995). Thus, more attention has been focused on the beneficial effects of amino acid supplementation on growth performance, but the possible consequences of imbalances of both IAA and DAA on metabolic and endocrine parameters are little known in teleosts. Using ingredients commonly used in aquafeeds, we studied in the present work the combined effect of dietary IAA profile and DAA content on growth performance, intermediary metabolism and endocrine growth markers (somatotrophic axis) of gilthead sea bream, a major aquaculture species in the Mediterranean area.

2. Material and methods

2.1. Animals

Juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) were obtained from a Spanish fish farm (Tina Menor, Santander, Spain). Fish were acclimated to laboratory conditions for 20 days before being randomly distributed into experimental tanks of 500-l capacity.

2.2. Diets

Four isoproteic (crude protein: 52% of dry matter, DM) and isoenergetic (22 kJ/g DM) diets based on fish meal and plant ingredients (33–35% replacement) supplemented with free amino acids were formulated. In M and WB diets, IAA profile and DAA content was based on the gilthead sea bream amino acid profile of muscle and whole body, respectively. In MGlu and WBGlu diets, DAA content was increased by the incorporation of L-glutamic acid, changing the IAA/DAA ratio from 1.13 (M) to 0.80 (WBGlu). Diet samples were hydrolysed (6 N HCl, 110 °C) and amino acid analysis was performed by Ajinomoto (Gravelines, France) using high-performance liquid chromatography. Tryptophan was determined by the colorimetric method of Basha and Roberts (1977) after alkaline hydrolysis of each sample (Tables 1 and 2).

Table 1
Ingredient and chemical composition of the four experimental diets

Ingredient (g/kg)	M	MGlu	WB	WBGlu
CPSPG ^a	50	0	0	0
Fish meal (CP 70%)	499.9	478.1	529.3	484.1
Wheat gluten	0	0	100	100
Extruded whole wheat	0	56.1	147.9	138.5
Extruded peas (Aquatex)	199.15	0	100	100
Soybean meal (CP 42%)	121.89	300	0	0
Fish oil	83.61	94.51	89.23	94.29
Binder	10	10	10	10
Mineral premix ^b	10	10	10	10
Vitamin premix ^c	10	10	10	10
L-His	2.04	2.00	0	0
L-Lys	3.14	4.85	0	0
DL-Met	0.95	1.18	3.46	0
L-Thr	0.60	1.54	0	0
L-Ile	5.57	4.58	0	0
L-Val	3.07	2.61	0	0
L-Glu	0	24.58	0	53.09
<i>Proximate composition</i>				
Dry matter (DM, %)	92.1	93.8	89.3	92.7
Crude protein (% DM)	52.7	53.0	52.1	50.9
Crude fat (% DM)	15.7	16.4	15.9	15.2
Gross energy (kJ/g DM)	22.5	22.5	22.5	22.4

^a Fish soluble protein concentrate with fat from Sopropêche (Boulogne sur Mer, France).

^b Supplied the following (mg/kg diet, except as noted): calcium carbonate (40% Ca) 2.15 g, magnesium hydroxide (60% Mg) 1.24 g, potassium chloride 0.9 g, ferric citrate 0.2 g, potassium iodine 4 mg, sodium chloride 0.4 g, calcium hydrogen phosphate 50 g, copper sulphate 0.3, zinc sulphate 40, cobalt sulphate 2, manganese sulphate 30, sodium selenite 0.3.

^c Supplied the following (mg/kg diet): retinyl acetate 2.58, DL-cholecalciferol 0.037, DL- α tocopheryl acetate 30, menadione sodium bisulphite 2.5, thiamin 7.5, riboflavin 15, pyridoxine 7.5, nicotinic acid 87.5, folic acid 2.5, calcium pantothenate 2.5, vitamin B₁₂ 0.025, ascorbic acid 250, inositol 500, biotin 1.25 and choline chloride 500.

Table 2
Analysed amino acid composition of the four experimental diets

Amino acid (% DM)	M	MGlu	WB	WBGlu
ARG	3.26	3.25	3.14	2.76
CYS	0.49	0.53	0.63	0.56
HIS	1.41	1.33	1.23	1.09
ILE	2.60	2.84	2.32	2.03
LEU	3.68	3.85	4.01	3.50
LYS	4.05	4.05	3.60	3.14
MET	1.29	1.30	1.70	1.15
PHE	2.04	2.09	2.28	2.02
THR	2.16	2.18	2.15	1.83
TRP	0.56	0.59	0.59	0.52
TYR	1.56	1.57	1.66	1.48
VAL	2.78	2.84	2.75	2.39
Ala	2.98	2.85	3.05	2.64
Asp	4.80	4.84	4.55	3.91
Glu	6.87	9.74	9.64	13.57
Gly	3.10	2.86	3.15	2.73
Pro	3.00	3.16	3.68	3.14
Ser	2.09	2.12	2.27	1.96
IAA (%) ^a	25.88	26.42	26.06	22.47
DAA (%) ^b	22.84	25.57	26.34	27.95
IAA/DAA	1.13	1.03	0.99	0.80

^a IAA: Indispensable amino acids.

^b DAA: Dispensable amino acids.

2.3. Growth trial

Fish of 14–15 g initial body weight were distributed into 12 fibreglass tanks (500-l) in groups of 90 fish each. Water flow was 20 l/min, and the oxygen content of outlet water was always higher than 85% saturation. Day length and temperature increased over the course of the trial (April 27–July 20), following the natural changes at our latitude (40°5'N, 0°10'E). Water temperature ranged from 17 to 25 °C.

Each diet was distributed to triplicate groups of fish for 82 days (12 weeks) according to a random design. Feed was offered to apparent visual satiety in two meals per day (0900 h, 1400 h), and feed consumption was recorded daily. Every 3 weeks, fish were counted and group-weighted under moderate anaesthesia (3-aminobenzoic acid ethyl ester, MS 222; 100 µg/ml).

Whole body composition was determined in a pooled sample of 10 fish at the beginning and in pools of 5 fish per tank at the end of the growth trial. Specimens for body analysis were ground, and small aliquots were dried (105 °C) to estimate water content. The remaining samples were freeze-dried and chemical analyses for protein, fat and ash were performed according to [AOAC methods \(1990\)](#).

Additional liver and blood sampling was done at the end of the growth trial from randomly selected fish killed by a blow to the head. Six hours after the morning meal, livers of 12 animals per diet were excised and immediately treated for lipogenic enzyme assays or frozen in liquid nitrogen until assays for glycolytic and gluconeogenic enzymes

were performed. Following overnight fasting (15 animals per diet), blood samples were taken from caudal vessels with heparinised syringes, and centrifuged at $3000 \times g$ for 20 min at 4°C . Plasma samples were stored at -30°C until further metabolite and hormone analyses.

2.4. Nitrogen metabolism

Twenty-two fish of uniform size were selected from each tank of the growth trial and transferred to a separate metabolism tank (90-l capacity; water flow rate: 3.5 l/min; temperature: $23\text{--}25^\circ\text{C}$). Fish were acclimatised to these experimental conditions for 2 weeks before the beginning of measurements. Ammonia-nitrogen excretion was measured hourly after a single test meal (1000 h) for two 22-h cycles, using a colorimetric method (Le Corre and Treguer, 1976). Fifty milliliters of water were sampled from each tank through a plastic tube, and the assay was performed in triplicate with 5 ml of water. Following the last water sampling (overnight fasting), six fish per diet were killed by a blow to the head, and liver and white muscle were rapidly excised and frozen in liquid nitrogen until further analysis (hepatic enzymes of amino acid catabolism, muscle free amino acids).

2.5. Free amino acids

Muscle free amino acids levels were measured using the method outlined by Lyndon et al. (1993) and validated by Mente et al. (2002). Briefly, tissue free amino acids were extracted from 200 mg tissue by homogenising in 4 ml absolute ethanol in the presence of 0.1 M norleucine as internal standard. Samples were then made to 5 ml with water, and bound and free amino acids were separated by centrifugation at $6000 \times g$ for 10 min. Free amino acids were determined with an automatic analyser (Applied Biosystems), and results were calculated as micromoles per gram wet weight.

2.6. Enzyme activities

Crude extracts of liver for assaying enzyme activities of amino acid catabolism were obtained by homogenisation of frozen tissues in 10 volumes of ice-cold buffer (30 mM Hepes, 0.25 mM saccharose, 50 mM EDTA, 5 mM K_2HPO_4 , 1 mM dithiotreitol; pH 7.2). Activities of alanine aminotransferase (ALAT, EC 2.6.1.2) and aspartate aminotransferase (ASAT, EC 2.6.1.1) were measured on supernatants (after centrifugation at $10000 \times g$ at 4°C for 20 min) with commercial kits (Enzyline, Biomerieux, Marcy l'Etoile, France). To measure glutamate dehydrogenase (GDH, EC 1.4.1.2) activity, the first crude homogenate was centrifuged at $1000 \times g$ at 4°C for 10 min. Supernatants were then treated by ultrasound (100 W, 1 min) to break mitochondrial membranes, and the formation of NADH was followed after centrifugation at $15000 \times g$ at 4°C for 10 min by adding L-glutamic acid to the reaction mixture (175 mM Tris-HCl, 100 mM semi-carbazine, 1.1 mM NAD, 1 mM ADP, 5 mM L-leucine; pH 8.5).

Assays for lipogenic enzymes were done following liver homogenisation in 3 volumes of ice-cold buffer (20 mM Tris-HCl, 250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 100 mM NaF, 0.5

mM phenyl methyl sulphonyl fluoride, 10 mM β -mercaptoethanol; pH 7.4). Homogenates were centrifuged at $15\,000 \times g$ at 4°C for 20 min and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD, EC 1.1.1.49) and malic enzyme (ME, EC 1.1.1.40) activities were assayed using spectrophotometric procedures according to Bautista et al. (1988) and Ochoa (1955). Fatty acid synthetase (FAS, EC 2.3.1.38) was assayed using an isotopic method (Hsu et al., 1969).

Crude extracts of liver for assaying glucokinase (GK, EC 2.7.1.1) activity were obtained by homogenisation of tissue samples in 10 volumes of ice-cold buffer (80 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM benzamidine, 1 mM 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride; pH 7.6). Homogenates were centrifuged at $900 \times g$ for 10 min, and GK activity was measured by coupling the formation of ribulose-5-phosphate from glucose-6-phosphate to reduction of NADP (Panserat et al., 2000a).

To measure glucose-6-phosphatase (G6Pase, EC 3.1.3.9), liver microsomes were isolated and suspended in phosphate buffer (100 mM NaH_2PO_4 , 25 mM Na_2HPO_4 , 2 mM EDTA, 1 mM DTT; pH 7) as described elsewhere (Panserat et al., 2000b). Enzyme activity was then determined by monitoring NADH production with an excess of glucose dehydrogenase (Sigma, St. Louis, MO) as coupling enzyme (Alegre et al., 1988).

In all assays, the soluble hepatic protein content in the assayed reaction was determined by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard. Enzyme activity units (IU), defined as micromoles of substrate converted to the product per minute at the assay temperature (37°C), were expressed per milligram of hepatic soluble protein (specific activity).

2.7. Northern blot analysis

Total RNA was extracted from liver using the method of Chomczynski and Sacchi (1987). Extracted RNA (20 μg) was electrophoresed in 1% agarose gels containing 5% formaldehyde and capillary transferred onto nylon membranes (Hybond-N, Amersham, England). After transfer, RNA blots were stained with methylene blue to locate 26S and 16S rRNAs, and to determine the relative amount of loaded RNA. Membranes were hybridised with gilthead sea bream [^{32}P]-DNA probes [(Genbank accession numbers: GK-AF053330; G6Pase-AF427866; phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (EC 4.1.1.32)-AF427868; fructose-2,6-biphosphatase (FBPase, EC 3.1.3.11)-AF427867)] labelled by random priming (Stratagene, Cedar Creek, USA). After stringent washing ($2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS for 20 min; $1 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS for 20 min; $0.2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS for 15 min), membranes were exposed to X-ray films and the resulting images were quantified using Visio-Mic II software (Genomic, Courtaboeuf, France).

2.8. Hormone and metabolite assays

Plasma glucose and triglyceride levels were measured spectrophotometrically using commercial kits (Sigma 315-100; Sigma 337-B).

Plasma growth hormone (GH) levels were determined by a homologous gilthead sea bream radioimmunoassay (RIA) described by Martínez-Barbera et al. (1995). The sensitivity and the midrange (ED_{50}) of the assay were 0.15 and 1.8 ng/ml, respectively.

Hepatic GH-binding was assayed by a radioreceptor assay (Pérez-Sánchez et al., 1994), based on the use of recombinant gilthead sea bream GH as iodinated tracer and cold hormone to measure total and nonspecific GH binding.

After acid–ethanol precipitation, total plasma levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) were measured using a fish IGF-I RIA. The assay is based on the use of red sea bream (*Pagrus major*) IGF-I (GroPep) as tracer and standard, and anti-barramundi (*Lates calcarifer*) IGF-I serum (GroPep) (1:8000) as a first antibody. A goat anti-rabbit IgG (1:20) (Biogenesis, Poole, UK) was used as a precipitating antibody. The amino acid similarity of red sea bream IGF-I and gilthead sea bream IGF-I is 100%, and curve displacements of gilthead sea bream IGF-I (Fine et al., 1997), red sea bream IGF-I (GroPep) and barramundi IGF-I (GroPep) are identical. The sensitivity and midrange of the assay were 0.05 and 0.7–0.8 ng/ml, respectively.

2.9. Statistics

Data were analysed by one-way analysis of variance, followed by Student–Newman–Keuls test at a significance level of $P < 0.05$. Tank average values of feed intake, growth,

Table 3

Data on growth performance, whole body composition, and nutrient gain and retention of fish fed the four experimental diets for 12 weeks

	M	MGlu	WB	WBGlu	P^1
Initial body weight (g)	14.7 ± 0.16	14.7 ± 0.02	14.6 ± 0.09	14.9 ± 0.11	0.361
Final body weight (g)	74.9 ± 0.67	70.9 ± 1.37	72.9 ± 1.35	70.9 ± 1.24	0.127
Feed Intake (% ABW/d)	1.78 ± 0.02	1.85 ± 0.10	1.81 ± 0.04	1.90 ± 0.10	0.788
SGR ² (%)	1.98 ± 0.003	1.91 ± 0.002	1.96 ± 0.03	1.90 ± 0.02	0.079
FCR ³	1.18 ± 0.02 ^a	1.26 ± 0.06 ^{ab}	1.22 ± 0.02 ^{ab}	1.35 ± 0.01 ^b	0.043
PER ⁴	1.61 ± 0.03	1.51 ± 0.08	1.59 ± 0.03	1.50 ± 0.05	0.546
<i>Whole body composition (% wet matter)</i>					
Moisture	67.1 ± 0.22	67.4 ± 0.11	66.9 ± 0.20	66.9 ± 0.26	0.304
Crude protein	16.2 ± 0.34 ^a	17.1 ± 0.10 ^b	16.4 ± 0.06 ^a	15.9 ± 0.17 ^a	0.015
Crude lipid	11.8 ± 0.15	10.7 ± 0.22	11.5 ± 0.25	11.7 ± 0.40	0.081
Ash	3.3 ± 0.07	3.5 ± 0.09	3.3 ± 0.13	3.4 ± 0.09	0.355
<i>Gain [mg(g)/kg ABW/day]</i>					
Nitrogen (mg)	409.4 ± 0.80	416.1 ± 2.90	398.3 ± 4.60	369.8 ± 13.8	0.053
Lipid (g)	1.78 ± 0.02	1.5 ± 0.11	1.7 ± 0.06	1.7 ± 0.10	0.230
<i>Retention (% intake)</i>					
Nitrogen	27.4 ± 0.60 ^b	25.2 ± 0.02 ^{ab}	26.5 ± 0.35 ^{ab}	24.3 ± 0.72 ^a	0.043
Lipid	65.49 ± 0.74 ^b	48.3 ± 3.11 ^a	61.1 ± 2.93 ^b	60.0 ± 1.57 ^b	0.018

Each value is the mean ± S.E.M. of triplicate groups.

Initial body composition: water 68.82%, protein 14.96%, lipid 11.12%, ash 3.60%.

¹ P values result from analysis of variance. Different superscript letters in each row indicate significant differences among dietary treatments (Student–Newman–Keuls test, $P < 0.05$).

² Specific growth rate = $[100 \times (\ln \text{ final fish weight} - \ln \text{ initial fish weight})] / \text{days}$.

³ Feed conversion ratio = dry feed intake/wet weight gain.

⁴ Protein efficiency ratio = wet weight gain/protein intake.

body composition and nutrient accretion were used as experimental units for statistical analysis. Correlation was made by Pearson product–moment correlations.

3. Results

Juvenile gilthead sea bream grew from 14–15 g to 70–75 g over the course of the 12-week growth trial (Table 3). Growth rates did not vary significantly among fish groups, although the tendency was a reduction in growth rates with the increase of dietary DAA content irrespective of IAA profile. Feed conversion ratio (FCR) and nitrogen retention were significantly improved in fish fed diet M in comparison to fish fed diet WBGlu. Whole body lipid content was slightly lower in fish fed diet MGlu, and lipid retention was significantly lower than in the other three groups.

Table 4
Specific activity and gene expression of hepatic enzymes of lipogenesis, glycolysis and gluconeogenesis of fish fed the four experimental diets

	M	MGlu	WB	WBGlu	P^1
<i>Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)</i>					
Activity (mUI/mg protein)	202.2 ± 10.2 ^b	143.2 ± 8.20 ^a	219.9 ± 17.4 ^b	223.4 ± 10.4 ^b	0.001
<i>Malic enzyme (ME)</i>					
Activity (mUI/mg protein)	19.6 ± 1.70 ^b	14.4 ± 1.60 ^a	22.7 ± 2.80 ^b	25.9 ± 2.20 ^b	0.007
<i>Fatty acid synthetase (FAS)</i>					
Activity (mUI/mg protein)	0.092 ± 0.007	0.071 ± 0.004	0.096 ± 0.02	0.098 ± 0.003	0.173
<i>Glucokinase (GK)</i>					
GK activity (mUI/mg protein)	27.38 ± 1.46 ^b	18.63 ± 0.76 ^a	28.92 ± 2.29 ^b	28.45 ± 2.50 ^b	0.003
GK gene expression (GK/16S RNA ratio) ²	1.10 ± 0.12 ^b	0.36 ± 0.04 ^a	1.20 ± 0.24 ^b	1.25 ± 0.21 ^b	0.006
<i>Glucose-6-phosphatase (G6Pase)</i>					
G6Pase activity (mUI/mg protein)	28.80 ± 2.24	29.00 ± 4.41	32.02 ± 4.00	24.97 ± 8.94	0.687
G6Pase gene expression (G6Pase/16S RNA ratio) ²	1.24 ± 0.13	0.60 ± 0.07	1.39 ± 0.39	1.74 ± 0.66	0.155
<i>Fructose biphosphatase (FBPase)</i>					
FBPase gene expression (FBPase/16S RNA ratio) ²	0.61 ± 0.06	0.75 ± 0.05	0.90 ± 0.06	0.77 ± 0.17	0.265
<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)</i>					
PEPCK gene expression (PEPCK/16S RNA ratio) ²	0.31 ± 0.05 ^{ab}	0.27 ± 0.03 ^a	0.51 ± 0.06 ^b	0.38 ± 0.04 ^{ab}	0.028

Each value is the mean ± S.E.M. of six animals.

¹ P values result from analysis of variance. Different superscript letters in each row indicate significant differences among dietary treatments (Student–Newman–Keuls test, $P < 0.05$).

² Arbitrary densitometric units.

Data on hepatic lipogenic, glycolytic and gluconeogenic enzymes are summarised in Table 4. The specific activity of G6PD was 10 times higher than that of ME, and activities of these two lipogenic enzymes were lower in fish fed diet MGlU than in the other three experimental groups. Specific activity of FAS exhibited the same pattern, although differences were not significant. Gene expression and specific activity of GK (first glycolytic step) were also decreased in fish fed diet MGlU. Concerning the gluconeogenic enzymes, G6Pase and FBPase were unaffected by the dietary treatment, but at the molecular level the first step of this metabolic pathway (PEPCK) remained at a lower level in fish fed diet MGlU than in fish fed diet WB.

Plasma glucose levels of fish fed diet WBGlU were lower than in the other three groups (Fig. 1A). Plasma triglyceride levels decreased with the increase of dietary DAA content

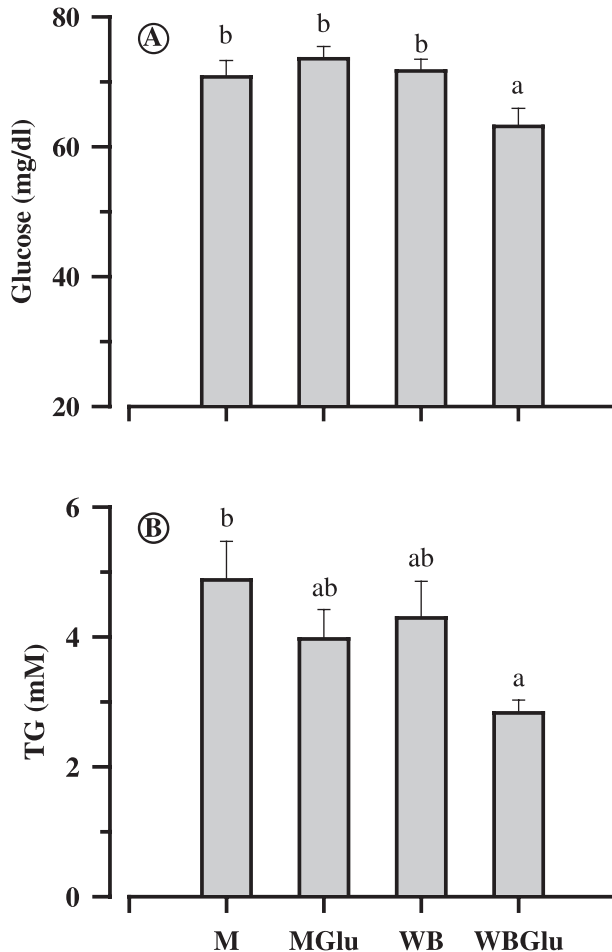


Fig. 1. Plasma glucose (A) and plasma triglyceride (B) levels of fish fed the four experimental diets. Each value is the mean \pm S.E.M. of 12–15 animals. Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

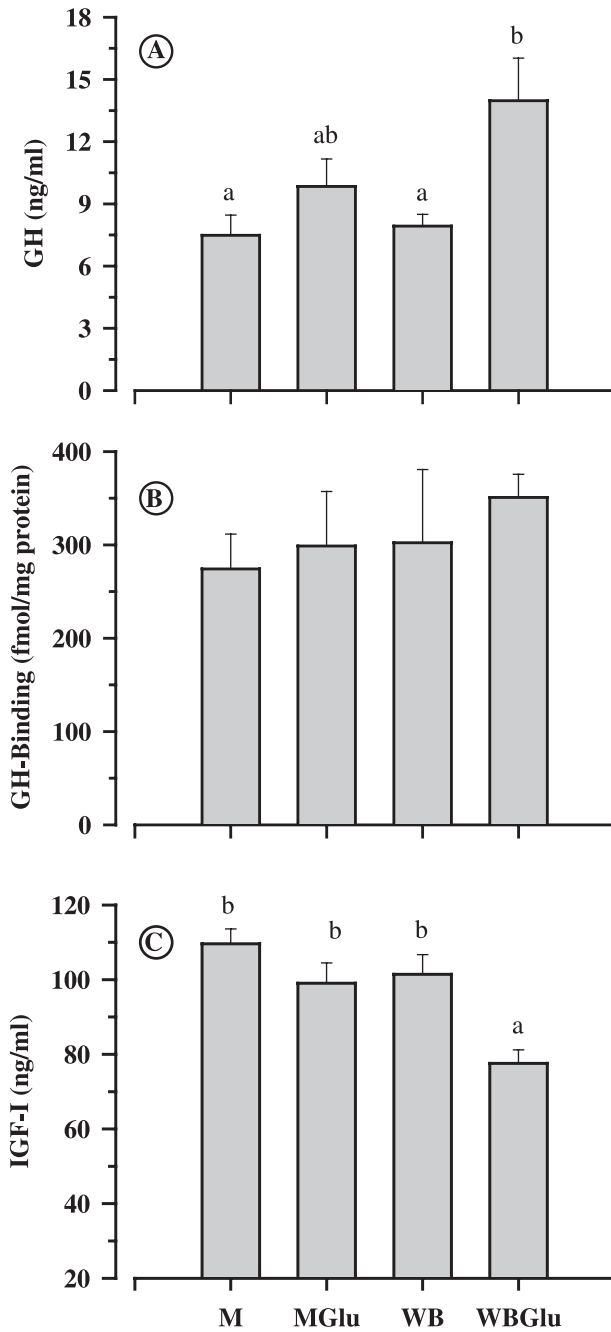


Fig. 2. Plasma GH levels (A), hepatic GH binding (B) and plasma IGF-I levels (C) in fish fed the four experimental diets. Each value is the mean \pm S.E.M. of 12–15 animals. Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

irrespective of IAA profile; plasma triglyceride concentration was thus significantly greater in fish fed diet M than in fish fed diet WBGlu (Fig. 1B). Plasma levels of GH were significantly lower in fish fed diet M than in fish fed diet WBGlu (Fig. 2A), and a significant negative correlation ($P < 0.001$) between plasma levels of GH and triglycerides was found. Hepatic GH binding increased slightly (non significantly) with the decrease of dietary IAA/DAA ratio (Fig. 2B). In contrast, plasma levels of IGF-I decreased with the increase of dietary DAA content irrespective of IAA profile, with a significantly higher plasma IGF-I level in fish fed diet M than in fish fed diet WBGlu (Fig. 2C).

In all the experimental groups, the postprandial pattern of ammonia excretion was similar, with a rapid increase after meals, reaching maximum values at 3 h postfeeding and a steady state during the dark period (Fig. 3A). However, cumulative ammonia excretion was increased by the decrease of dietary IAA/DAA ratio irrespective of IAA profile (Fig. 3B). In the same group of animals, muscle free amino acids were analysed (Table 5). Taurine, histidine and glycine represented more than 80% of all the free amino acids (no data were obtained for cysteine and leucine). Significant differences among experimental groups were found for IAAs (histidine, threonine, methionine, lysine and valine) and DAAs (hydroxyproline, glutamic acid, serine, glycine, alanine and proline). A significant positive correlation ($P < 0.01$) between IAA/DAA ratios for dietary and muscle free amino acids was found, and there was a trend for the total amount of muscle free amino acids to increase with the increase of dietary DAA content irrespective of IAA profile.

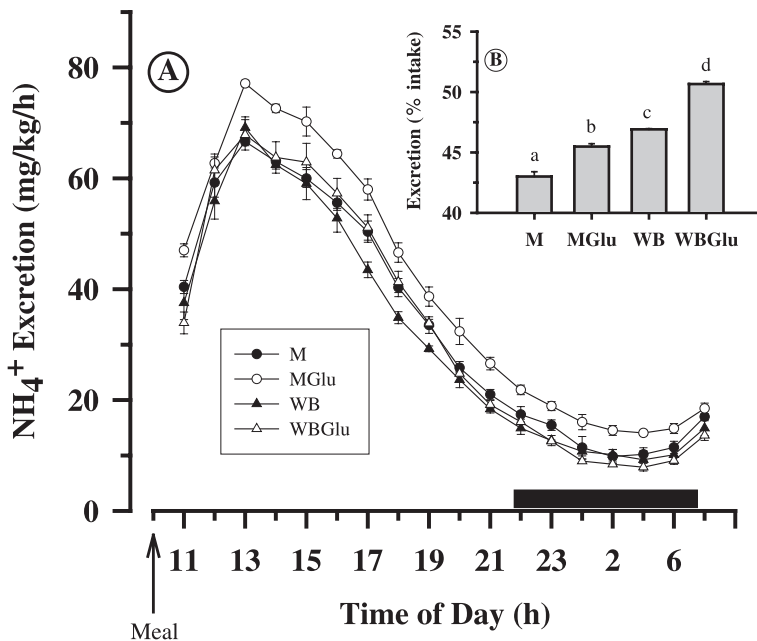


Fig. 3. Postprandial ammonia excretion in fish fed the four experimental diets. Each value is the mean \pm S.E.M. of two separate cycles. Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table 5

White muscle free amino acids (micromoles per gram wet weight) of fish fed the four experimental diets (metabolism trial)

Amino acid	M	MGlu	WB	WBGlu	P ¹
ARG	0.72 ± 0.05	0.67 ± 0.05	0.60 ± 0.05	0.57 ± 0.06	0.265
HIS	7.11 ± 0.68 ^a	10.62 ± 0.70 ^b	7.11 ± 0.57 ^a	7.50 ± 0.26 ^a	0.003
ILE	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.565
LYS	0.86 ± 0.11 ^b	0.83 ± 0.10 ^b	0.44 ± 0.06 ^a	0.30 ± 0.06 ^a	0.001
MET	0.06 ± 0.02 ^{ab}	0.07 ± 0.00 ^b	0.01 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.01 ^{ab}	0.021
PHE	0.16 ± 0.07	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.079
THR	0.29 ± 0.03 ^a	0.55 ± 0.03 ^b	0.30 ± 0.05 ^a	0.40 ± 0.04 ^{ab}	0.001
TRP	0.15 ± 0.08	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.087
TYR	0.08 ± 0.00 ^a	0.14 ± 0.01 ^b	0.12 ± 0.01 ^b	0.11 ± 0.01 ^{ab}	0.001
VAL	0.05 ± 0.01 ^a	0.11 ± 0.00 ^b	0.10 ± 0.01 ^b	0.12 ± 0.00 ^b	0.001
Ala	0.63 ± 0.05 ^a	1.16 ± 0.14 ^b	0.71 ± 0.03 ^a	0.90 ± 0.10 ^{ab}	0.008
Asn	0.41 ± 0.05	0.91 ± 0.15	0.61 ± 0.05	0.61 ± 0.16	0.082
Asp	0.09 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.241
Gln	0.32 ± 0.03	0.62 ± 0.04	0.45 ± 0.02	0.46 ± 0.04	0.078
Glu	0.27 ± 0.06 ^a	0.54 ± 0.09 ^c	0.27 ± 0.04 ^a	0.33 ± 0.08 ^b	0.001
Gly	9.06 ± 0.78 ^a	15.66 ± 1.68 ^c	12.02 ± 1.53 ^{abc}	15.51 ± 1.05 ^{bc}	0.014
Hyp	0.37 ± 0.05 ^a	0.59 ± 0.02 ^{ab}	0.52 ± 0.09 ^{ab}	0.75 ± 0.09 ^b	0.019
Pro	0.26 ± 0.02 ^a	0.39 ± 0.02 ^a	0.45 ± 0.05 ^{ab}	0.69 ± 0.11 ^b	0.004
Ser	0.17 ± 0.01 ^a	0.29 ± 0.03 ^{ab}	0.21 ± 0.02 ^a	0.37 ± 0.06 ^b	0.008
Tau	19.33 ± 1.84	21.00 ± 0.86	20.85 ± 1.70	21.18 ± 1.51	0.852
Total	40.41 ± 1.82 ^a	54.32 ± 2.99 ^b	44.94 ± 3.59 ^{ab}	50.03 ± 2.29 ^{ab}	0.026
IAA/DAA ²	0.305 ± 0.02 ^b	0.311 ± 0.01 ^b	0.238 ± 0.009 ^a	0.222 ± 0.02 ^a	0.001

Each value is the mean ± S.E.M. of six animals.

¹ P values result from analysis of variance. Different superscript letters in each row indicate significant differences among dietary treatments (Student–Newman–Keuls test, $P < 0.05$).

² IAA: indispensable amino acids; DAA: dispensable amino acids.

Data on hepatic activities of the three main enzymes involved in amino acid catabolism are shown in Table 6. GDH tendency was to decrease with the increase of dietary DAA content irrespective of IAA profile; GDH activity in fish fed diet M was significantly

Table 6

Specific activity of hepatic enzymes of amino acid catabolism of fish fed the four experimental diets (N-metabolism trial)

	M	MGlu	WB	WBGlu	P ¹
<i>Glutamate dehydrogenase (GDH)</i>					
Activity (mUI/mg protein)	212.1 ± 12.7 ^b	197.3 ± 12.2 ^{ab}	162.1 ± 13.6 ^{ab}	142.8 ± 21.1 ^a	0.02
<i>Alanine aminotransferase (ALAT)</i>					
Activity (mUI/mg protein)	874.6 ± 57.8	782.5 ± 59.7	721.1 ± 40.3	775.9 ± 50.1	0.29
<i>Aspartate aminotransferase (ASAT)</i>					
Activity (mUI/mg protein)	1725.5 ± 85.2	1531.8 ± 96.2	1625.6 ± 127.2	1676.2 ± 125.5	0.66

Each value is the mean ± S.E.M. of six animals.

¹ P values result from analysis of variance. Different superscript letters in each row indicate significant differences among dietary treatments (Student–Newman–Keuls test, $P < 0.05$).

greater than in fish fed diet WBGl_u. No significant differences among groups were found for ASAT and ALAT.

4. Discussion

Available data show that currently about 30% to 50% of fish meal can be replaced successfully by plant protein sources in fish feeds (Francis et al., 2001). There are, however, important fish species differences and some studies reveal that a total substitution is possible at least in rainbow trout (Kaushik et al., 1995; Watanabe et al., 1998), whereas data on gilthead sea bream are not so conclusive (Robaina et al., 1995, 1998). Since plant proteins are deficient in one or more IAAs, corrections are often made with regard to the ideal IAA profile (Gallagher, 1994; Robaina et al., 1999). However, few studies (Schuhmacher et al., 1995; Akiyama et al., 1997) have stressed the possible importance of dietary IAA/DAA ratios in fish feeds. Moreover, the use of DAAs as partial substitutes of fishmeal have led to variable results (Hughes, 1985; Fauconneau, 1988; Mambriini and Kaushik, 1994), and it is still difficult to define the ideal IAA/DAA ratio. In the present study, fish meal was replaced by 35% plant ingredients, and growth rates were consistent with previous gilthead sea bream studies (Martí-Palanca et al., 1996; Company et al., 1999; Mingarro et al., 2002). Nevertheless, protein retention was significantly improved by the higher dietary IAA/DAA ratio, which reveals some advantage of the diet based on muscle IAA profile and DAA content (diet M). This was also supported by data on ammonia excretion and somatotrophic axis responsiveness.

Ammonia excretion represents a high percentage (>85%) of total nitrogen waste in fish (Kaushik and Cowey, 1991), and in gilthead sea bream the maximum postprandial excretion occurs 3 h after feeding in fish reared at elevated temperatures (Dosdat et al., 1996; Robaina et al., 1999). This agrees with our results, in which ammonia excretion rapidly increased after a meal to reach a steady state over the course of darkness (14 h after the meal). In rainbow trout, the pattern of ammonia excretion is affected by dietary changes in digestible protein to digestible energy ratios (Kaushik and Oliva-Teles, 1985; Médale et al., 1995). In this study, the different protein sources and proportions of plant ingredients used to achieve the desired IAA profile and DAA content did not alter the time course of ammonia excretion. We assume therefore that the postprandial pattern of ammonia excretion remained unaltered by dietary treatment, although rates of amino acid catabolism (cumulative ammonia excretion, % N intake) were apparently increased by the increase of dietary DAA content irrespective of IAA profile. We did not, however, find any significant effect of dietary treatment on the activity of hepatic aminotransferases; this finding is not surprising taking into account that the response of ALT and AST in starved fish and fish fed high-protein diets is quite variable in different fish species (Cowey and Walton, 1989; Fynn-Aikins et al., 1995; Metón et al., 1999).

High dietary glutamate induces an increase in hepatic GDH activity in rainbow trout (Moyano and De La Higuera, 1991). Conversely, our data showed that the specific activity of this most active deaminating enzyme, the mitochondrial GDH, was significantly decreased by the increase of glutamic acid in fish fed diet WBGl_u. There is not an easy explanation for this controversy, but it appears likely that this decreased activity may serve

to limit the conversion of glutamate to ammonia in a state of low cell energy charge in association with increased feed intake and perhaps protein breakdown. This agrees with the observation that the pool of some muscle free amino acids (Thr, Val, Glu, Gly, Hyp, Pro) increased in fish fed diets MGlu and WBGl. Besides, knowledge on the specific utilisation of glutamic acid by the digestive tract, as shown in higher vertebrates (Reeds et al., 2000) is altogether inexistent in fish, although the involvement of dietary glutamic acid in the endogenous synthesis of citrulline (and consequently of arginine) has been proposed (Buentello and Gatlin, 2001). The possible contribution of glutamate in the energy metabolism of the gastrointestinal tract in fish warrants, however, specific studies.

The somatotrophic axis plays a key role in growth regulation and nutrient partitioning in gilthead sea bream, and it responds quickly to changes in ration size (Pérez-Sánchez et al., 1995; Company et al., 1999), dietary protein/energy ratio (Martí-Palanca et al., 1996), and environmental conditions (Pérez-Sánchez et al., 1994; Mingarro et al., 2002). As a characteristic feature, hepatic GH binding and plasma levels of IGF-I are depressed under catabolic states and poor nutrition, which in turn results in a pronounced increase of plasma GH levels as a consequence of the lack of the negative feedback inhibition of IGF-I on pituitary GH synthesis and release. GH receptors (GHR) of turbot (Calduch-Giner et al., 2001) and catfish (Lee et al., 2001) have been cloned and sequenced, and interestingly, splicing variants encoding for truncated forms retaining the transmembrane region but diverging in the cytoplasmatic domain have been detected in the liver tissue of turbot. As it has been reported in mammals for GH (Ross et al., 1997; Edens and Talamantes, 1998) and PRL (Perrot-Appplanat et al., 1997; Bole-Feysot et al., 1998) receptors, these truncated isoforms would compete for ligand binding acting as negative regulators of receptor signalling. Thus, in the present study, it is not surprising that a slight increase of hepatic GH binding (binding for long and truncated GHRs) was related to down-regulation of plasma levels of IGF-I. In any case, some defect in the transmission of GHR signal is suspected in the poorest growing fish, which is consistent with the up-regulation (lack of negative feedback inhibition) of plasma GH levels in fish fed diet WBGl. There is also evidence that glutamate is an important regulator of fish GH secretion, as demonstrated by the inhibitory effect of glutamate agonists (*N*-methyl-D,L aspartic acid) on GH release in goldfish (Trudeau et al., 1996). However, if this effect exists in our case, it must have been overridden by other stimulatory signals like the decrease of plasma IGF-I levels.

The preferential site of *de novo* fatty acid synthesis in fish is the liver, and the specific activity found for hepatic lipogenic enzymes such as G6PD, ME and FAS were of the same order of magnitude to those in European sea bass (Dias et al., 1998) but higher than in turbot (Regost et al., 2001). From our results, it is also conclusive that specific activities of G6PD and ME were significantly reduced in fish fed diet MGlu. In mammals, it is known that the nature of protein sources affects lipogenic enzyme activities, and rats fed soybean or buckwheat protein show a decreased activity of G6PD, ME and FAS compared to those fed casein and fish proteins (Herzberg and Rogerson, 1984; Iritani et al., 1986, 1996; Kayashita et al., 1996). The possible effect of dietary protein source on fish lipogenesis have not been yet reported, but in the present study whole body fat retention and hepatic lipogenic activity were down-regulated in fish fed MGlu. Since soybean meal was absent in whole-body-based diets and less abundant in diet M than in diet MGlu, it is likely that this effect is due to nonprotein

components found in soybean. In rats and hamsters, isoflavones have been identified as one of these factors (Balmir et al., 1996), although methionine deficiency can also induce confounding effects (Kern et al., 2002). These findings are consistent with a previous study, in which Robaina et al. (1998) reported a reduction in muscle lipid levels with the same degree of fish meal replacement by soybean meal. Compounds in soybean meal may reduce digestibility and/or palatability of diets, although our results indicate that they also affect hepatic lipogenic enzymes.

It is now accepted that gilthead sea bream are able to regulate hepatic glucose utilisation by induction of GK gene expression and activity (Metón et al., 1999; Caseras et al., 2000; Panserat et al., 2000a). Our results confirm this regulation, but they also revealed that the enzyme of the first step of the glycolytic pathway was expressed at a low level in fish fed the diet MGlu. Moreover, analyses of PEPCK gene expression suggest that the first step of the gluconeogenic pathway was down-regulated in fish fed diets based on the muscle IAA profile (M and MGlu). This effect seems to be favoured by the increase of DAA content, and PEPCK expression was significantly lower in fish fed diet MGlu than in fish fed diet WB. However, the extent to which the effects observed with MGlu diet are due to amino acid profile rather than the nature of protein source remains to be clarified. In fact, carbohydrate metabolic pathways were always inhibited in fish fed diet MGlu. Thus, a complex regulation of glycolytic, gluconeogenic, and lipogenic pathways is argued, and the lowest concentration of plasma glucose and triglycerides was found in fish fed WBGlu and not in fish fed MGlu. According to this, both in this and in a previous seasonal study (Mingarro et al., 2002), the resulting pattern of circulating triglycerides was clearly opposite to that of circulating GH. This hormone is a well known lipolytic factor that inhibits *in vivo* the hepatic activity of acetyl-CoA-carboxylase in gilthead sea bream (Vega-Rubín de Celis et al., 2002), but perhaps also has a major role on the modulation of circulating lipid availability acting upon synthesis and release of hepatic lipoproteins and peripheral tissue uptake.

In summary, the best growth performance occurred with diet M that resembles the IAA profile and IAA/DAA ratio of muscle. However, major changes in lipid and carbohydrate metabolism were found in fish fed diet MGlu. This suggests that not only IAA and DAA content, but also some secondary metabolites of soybean meal play, in concert with hormones, an important role in the regulation of growth, energy homeostasis and adiposity.

Acknowledgements

This research was funded by EU (Q5RS-2000-30068; PEPPA). J.A.C.-G. was the recipient of a research contract from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología. M.M. was the recipient of a research grant from the Diputación Provincial de Castellón. S.K. is the recipient of a scholarship from the French Ministry of Research.

References

- Akiyama, T., Oohara, I., Yamamoto, T., 1997. Comparison of essential amino acid requirements with A/E ratio among fish species (review paper). *Fish. Sci.* 63, 963–970.

- Alarcón, F.J., Moyano, F.J., Díaz, M., 1999. Effect of inhibitors present in protein sources on digestive proteases of juvenile sea bream (*Sparus aurata*). *Aquat. Living Resour. (Montrouge)* 12, 233–238.
- Alegre, M., Ciudad, C.J., Fillat, C., Guinovart, J.J., 1988. Determination of glucose-6-phosphatase activity using the glucose-dehydrogenase-coupled reaction. *Anal. Biochem.* 173, 185–189.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990. In: Heldrich, K. (Ed.), *Official Methods of Analysis*. AOAC, Arlington, VA.
- Balmir, F., Staack, R., Jeffrey, E., Berber Jiménez, M.D., Wang, L., Potter, S.M., 1996. An extract of soy flour influences serum cholesterol and thyroid hormones in rats and hamsters. *J. Nutr.* 126, 3046–3053.
- Basha, S.M.M., Roberts, R.M., 1977. A simple colorimetric method for the determination of tryptophan. *Anal. Biochem.* 77, 378–386.
- Bautista, J.M., Garrido-Pertierra, A., Soler, G., 1988. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Dicentrarchus labrax* liver: kinetic mechanism and kinetics of NADPH inhibition. *Biochim. Biophys. Acta* 967, 354–363.
- Bole-Feyssot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., Kelly, P.A., 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr. Rev.* 19, 225–268.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Buentello, J.A., Gatlin, D.M., 2001. Plasma citrulline and arginine kinetics in juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus*, given oral gabaculine. *Fish Physiol. Biochem.* 24, 105–112.
- Bureau, D.P., Harris, A.M., Cho, C.Y., 1998. The effect of purified alcohol extracts from soy products on feed intake and growth of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 161, 27–43.
- Burel, C., Boujard, T., Kaushik, S.J., Boeuf, G., Van Der Geyten, S., Mol, K.A., Kühn, E.R., Quinsac, A., Krouti, M., Ribaillier, D., 2000. Potential of plant-protein sources as fish meal substitutes in diets for turbot (*Psetta maxima*): growth, nutrient utilization and thyroid status. *Aquaculture* 188, 363–382.
- Calduch-Giner, J.A., Duval, H., Chesnel, F., Boeuf, G., Pérez-Sánchez, J., Boujard, D., 2001. Fish growth hormone receptor: molecular characterisation of two membrane-anchored forms. *Endocrinology* 142, 3269–3273.
- Caseras, A., Meton, I., Fernandez, F., Baanante, I.V., 2000. Glucokinase gene expression is nutritionally regulated in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biochim. Biophys. Acta* 1493, 135–141.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Clarke, E.J., Wiseman, J., 2000a. Developments in plant breeding for improved nutritional quality of soya beans: I. Protein and amino acid content. *J. Agric. Sci. (Cambridge)* 134, 111–124.
- Clarke, E.J., Wiseman, J., 2000b. Developments in plant breeding for improved nutritional quality of soya beans: II. Anti-nutritional factors. *J. Agric. Sci. (Cambridge)* 134, 125–136.
- Company, R., Calduch-Giner, J.A., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 1999. Growth performance and adiposity in gilthead seabream (*Sparus aurata*): risks and benefits of high energy diets. *Aquaculture* 171, 279–292.
- Cowey, C.B., Walton, M.J., 1989. Intermediary metabolism. In: Halver, J.E. (Ed.), *Fish Nutrition*. Academic Press, New York, pp. 259–329.
- Dias, J., Alvarez, M.J., Diez, A., Arzel, J., Corraze, G., Bautista, J.M., Kaushik, S.J., 1998. Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein/energy in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 161, 169–186.
- Dosdat, A., Servais, F., Métailler, R., Huelvan, C., Desbruyères, E., 1996. Comparison of nitrogenous losses in five teleost fish species. *Aquaculture* 141, 107–127.
- Edens, A., Talamantes, F., 1998. Alternative processing of growth hormone receptor transcripts. *Endocr. Rev.* 19, 559–582.
- Fauconneau, B., 1988. Partial substitution of protein by a single amino acid or an organic acid in rainbow trout diets. *Aquaculture* 70, 97–106.
- Fine, M., Amuly, R., Sandowski, Y., Marchant, T.A., Chan, S.J., Gertler, A., Funkenstein, B., 1997. Recombinant gilthead seabream (*Sparus aurata*) insulin-like growth factor I: subcloning, expression in *Escherichia coli*, purification and characterization. *J. Endocrinol.* 153, 139–150.

- Francis, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, 197–227.
- Fynn-Aikins, K., Hughes, S.G., Vandenberg, G.W., 1995. Protein retention and liver aminotransferase activities in Atlantic salmon fed diets containing different energy sources. *Comp. Biochem. Physiol.*, 111A, 163–170.
- Gallagher, M.L., 1994. The use of soybean meal as a replacement for fish meal in diets for hybrid striped bass (*Morone saxatilis* × *M. chrysops*). *Aquaculture* 126, 119–127.
- Gouveia, A., Davies, S.J., 1998. Preliminary nutritional evaluation of pea seed meal (*Pisum sativum*) for juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 166, 311–320.
- Herzberg, G.R., Rogerson, M., 1984. Hepatic lipogenesis in the young rats given proteins of different quality. *Br. J. Nutr.* 52, 131–137.
- Hsu, R.Y., Butterworth, P.H.W., Porter, J.W., 1969. Pigeon liver fatty acid synthetase. In: Lowenstein, J.M. (Ed.), *Methods in Enzymology*, vol. 14. Academic Press, New York, pp. 33–39.
- Hughes, S.G., 1985. Evaluation of glutamic acid and glycine as sources of nonessential amino acids for lake trout (*Salvelinus namaycush*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 81A, 669–671.
- Iritani, N., Nagashima, K., Fukuda, H., Katsurada, A., Tanaka, T., 1986. Effects of dietary proteins on lipogenic enzymes in rat liver. *J. Nutr.* 116, 190–197.
- Iritani, N., Hosomi, H., Fukuda, H., Tada, K., Ikeda, H., 1996. Soybean protein suppresses hepatic lipogenic enzyme gene expression in Wistar fatty rats. *J. Nutr.* 126, 380–388.
- Kaushik, S.J., 1990. Use of alternative protein sources for the intensive rearing of carnivorous fishes. In: Flos, R., Tort, L., Torres, P. (Eds.), *Mediterranean Aquaculture*. Ellis Horwood, UK, pp. 125–138.
- Kaushik, S.J., 1995. Protein and amino acid nutrition of fish in comparison to terrestrial vertebrates. In: Nunes, A.F., Portugal, A.V., Costa, J.P., Ribeiro, J.R. (Eds.), *Protein Metabolism and Nutrition*. INIA, Portugal, pp. 47–56.
- Kaushik, S.J., Cowey, C.B., 1991. Ammoniogenesis and dietary factors affecting nitrogen excretion. In: Cowey, C.B., Cho, C.Y. (Eds.), *Nutritional Strategies and Aquaculture Waste*. University of Guelph, Guelph, Canada, pp. 3–19.
- Kaushik, S.J., Oliva-Teles, A., 1985. Effects of digestible energy on nitrogen and energy balance in rainbow trout. *Aquaculture* 50, 89–101.
- Kaushik, S.J., Cravedi, J.P., Lalles, J.P., Sumpter, J., Fauconneau, B., Laroche, M., 1995. Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 133, 257–274.
- Kayashita, J., Shimaoka, I., Nakajoh, M., Kato, N., 1996. Feeding buckwheat protein extract reduces hepatic triglyceride concentration, adipose tissue weight, and hepatic lipogenesis in rats. *J. Nutr. Biochem.* 7, 555–559.
- Kern, M., Ellison, D., Marroquin, Y., Ambrose, M., Mosier, K., 2002. Effects of soy protein supplemented with methionine on blood lipids and adiposity of rats. *Nutrition* 18, 654.
- Kikuchi, K., 1999. Use of defatted soybean meal as a substitute for fish meal in diets of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 179, 3–11.
- Le Corre, P., Treguer, P., 1976. Contribution à l'étude de la matière organique dissoute et des sels nutritifs dans l'eau de mer. Caractéristiques chimiques du golfe de Gascogne et des upwellings côtiers de l'Afrique du Nord-Ouest. Thèse de doctorat es Sciences. UBO, Brest. 490 pp.
- Lee, L.T., Nong, G., Chan, Y.H., Tse, D.L., Cheng, C.H., 2001. Molecular cloning of a teleost growth hormone receptor and its functional interaction with human growth hormone. *Gene* 270, 121–129.
- Lyndon, A.R., Davidson, I., Houlihan, D.F., 1993. Changes in tissue and plasma free amino acid concentrations after feeding in Atlantic cod. *Fish Physiol. Biochem.* 10, 365–375.
- Mambrini, M., Kaushik, S., 1994. Partial replacement of dietary protein nitrogen with dispensable amino acids in diets of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109A, 469–477.
- Martí-Palanca, H., Martínez-Barberá, J.P., Pendón, C., Valdivia, M.M., Pérez-Sánchez, J., Kaushik, S., 1996. Growth hormone as a function of age and dietary protein:energy ratio in a marine teleost, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Growth Regul.* 6, 253–259.
- Martínez-Barbera, J.P., Pendón, C., Martí-Palanca, H., Calduch-Giner, J.A., Rodríguez, R., Valdivia, M.M.,

- Pérez-Sánchez, J., 1995. The use of recombinant gilthead sea bream growth hormone for radioiodination and standard preparation in radioimmunoassay. *Comp. Biochem. Physiol.*, 110A, 335–340.
- Médale, F., Brauge, C., Vallée, F., Kaushik, S.J., 1995. Effects of dietary protein/energy ratio, ration size, dietary energy source and water temperature on nitrogen excretion in rainbow trout. *Water Sci. Technol.* 31, 185–194.
- Mente, E., Coutteau, P., Houlihan, D.F., Davidson, I., Sorgeloos, P., 2002. Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*: effects of dietary protein source. *J. Exp. Biol.* 205, 3107–3122.
- Metón, I., Mediavilla, D., Caseras, A., Cantó, E., Fernández, F., Baanante, I.V., 1999. Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Br. J. Nutr.* 82, 223–232.
- Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, S., Astola, A., Pendón, C., Martínez-Valdivia, M., Pérez-Sánchez, J., 2002. Endocrine mediators of seasonal growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): growth hormone and somatolactin paradigm. *Gen. Comp. Endocrinol.* 128, 102–111.
- Moyano, F.G.C., De La Higuera, M., 1991. Nutritive and metabolic utilization of proteins with high glutamic acid content by the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* 100A, 759–762.
- National Research Council (NRC), 1993. *Nutrient Requirements of Fish*. National Academy Press, Washington, DC. 124 pp.
- Ochoa, S., 1955. Malic enzyme. In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology*, vol. 1. Academic Press, New York, pp. 739–753.
- Panserat, S., Médale, F., Blin, C., Brèque, J., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Gomes, E., Krishnamoorthy, R., Kaushik, S., 2000a. Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Am. J. Physiol.* 278, 1164–1170.
- Panserat, S., Médale, F., Brèque, J., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S., 2000b. Lack of significant long-term effect of dietary carbohydrates on glycucose-6-phosphatase expression in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Nutr. Biochem.* 11, 22–29.
- Pérez-Sánchez, J., Martí-Palanca, H., Le Bail, P.-Y., 1994. Homologous growth hormone binding in gilthead sea bream. Effect of fasting and refeeding on hepatic GH-binding and plasma somatomedin-like immunoreactivity. *J. Fish Biol.* 44, 287–301.
- Pérez-Sánchez, J., Martí-Palanca, H., Kaushik, S., 1995. Ration size and protein intake affect circulating growth hormone concentration, hepatic growth hormone binding and plasma insulin-like growth factor-I immunoreactivity in a marine teleost, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Nutr.* 125, 546–552.
- Perrot-Appianat, M., Gualillo, O., Buteau, H., Edery, M., Kelly, P.A., 1997. Internalization of prolactin receptor and prolactin in transfected cells does not involve nuclear translocation. *J. Cell Sci.* 110, 1123–1132.
- Reeds, P.J., Burrin, D.G., Stoll, B., Jahoor, F., 2000. Intestinal glutamate metabolism. *J. Nutr.* 130, 978–982.
- Regost, C., Arzel, J., Cardinal, M., Robin, J., Laroche, M., Kaushik, S.J., 2001. Dietary lipid level, hepatic lipogenesis and flesh quality in turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 193, 291–309.
- Robaina, L., Izquierdo, M.S., Moyano, F.J., Socorro, J., Vergara, J.M., Montero, D., Fernández-Palacios, H., 1995. Soybean and lupin seed meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implications. *Aquaculture* 130, 219–233.
- Robaina, L., Izquierdo, M.S., Moyano, F.J., Socorro, J., Vergara, J.M., Montero, D., 1998. Increase of the dietary n-3/n-6 fatty acid ratio and addition of phosphorus improves liver histological alterations induced by feeding diets containing soybean meal to gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 161, 281–293.
- Robaina, L., Corraze, G., Aguirre, P., Blanc, D., Melcion, J.P., Kaushik, S., 1999. Digestibility, postprandial ammonia excretion and selected plasma metabolites in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed pelleted or extruded diets with or without wheat gluten. *Aquaculture* 179, 45–56.
- Ross, R.J.M., Esposito, N., Shen, X.Y., Von Laue, S., Chew, S.L., Dobson, P.R.M., Postel-Vinay, M.-C., Finidori, J., 1997. A short isoform of the human growth hormone receptor functions as a dominant negative inhibitor of the full-length receptor and generates large amounts of binding protein. *Mol. Endocrinol.* 11, 265–273.
- Schuhmacher, A., Muench, M., Gropp, J.M., 1995. Non-essential amino acid sources in crystalline amino acid diets for trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Appl. Ichthyol.* 11, 317–321.
- Storebakken, T., Shearer, K.D., Baeverfjord, G., Nielsen, B.G., Åsgård, T., Scott, T., De Laporte, A., 2000.

- Digestibility of macronutrients, energy and amino acids, absorption of elements and absence of intestinal enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed diets with wheat gluten. Aquaculture 184, 115–132.
- Tacon, A.G.J., 1997. Fishmeal replacers: review of antinutrients within oilseeds and pulses. A limiting factor for the aquafeed green revolution? Feeding Tomorrow's Fish. Proceedings Workshop CIHEAM Network on Technology of Aquaculture in the Mediterranean (TECAM). Cah. Options Mediterr., vol. 22, pp. 153–182.
- Teskeredzic, Z., Higgs, D.A., Dosanjh, B.S., McBride, J.R., Hardy, R.W., Beames, R.M., Jones, J.D., Simell, M., Vaara, T., Bridges, R.B., 1995. Assessment of undephytinized and dephytinized rapeseed protein concentrate as sources of dietary protein for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 131, 261–277.
- Tidwell, J.H., Allan, G.L., 2001. Fish as food: aquaculture's contribution. EMBO Rep. 2, 958–963.
- Trudeau, V.L., Sloley, B.D., Kah, O., Mons, N., Dulka, J.G., Peter, R.E., 1996. Regulation of growth hormone secretion by amino acid neurotransmitters in the goldfish: I. Inhibition by *N*-methyl-D,L-aspartic acid. Gen. Comp. Endocrinol. 103, 129–137.
- Vega-Rubín de Celis, S., Gómez, P., Caldach-Giner, J.A., Médale, F., Pérez-Sánchez, J., 2002. Expression and characterisation of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) somatolactin (SL): assessment of in vivo metabolic effects. Mar. Biotechnol. 4, 1–10.
- Vielma, J., Mäkinen, T., Ekholm, P., Koskela, J., 2000. Influence of dietary soy and phytase levels on performance and body composition of large rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and algal availability of phosphorus load. Aquaculture 183, 349–362.
- Watanabe, T., Verakunpiriya, V., Watanabe, K., Viswanath, K., Satoh, S., 1998. Feeding of rainbow trout with non-fish meal diets. Fish. Sci. 63, 258–266.
- Wilson, R.P., Halver, J.E., 1986. Protein and amino acid requirements of fishes. Annu. Rev. Nutr. 6, 225–244.



Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)

P. Gómez-Requeni^a, M. Mingarro^a, J.A. Calduch-Giner^a,
F. Médale^b, S.A.M. Martin^c, D.F. Houlihan^c,
S. Kaushik^b, J. Pérez-Sánchez^{a,*}

^aInstituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC), 12595 Ribera de Cabanes, Castellón, Spain

^bLaboratoire de Nutrition des Poissons, Unité Mixte INRA-IFREMER, 64310 Saint-Pée-sur-Nivelle, France

^cDepartment of Zoology, AB24 2TZ University of Aberdeen, Aberdeen, Scotland, UK

Received 7 April 2003; received in revised form 14 July 2003; accepted 14 July 2003

Abstract

Partial or total replacement of fish meal by a mixture of plant protein sources (corn gluten meal, wheat gluten, extruded peas, rapeseed meal) balanced with indispensable amino acids (IAA) was examined in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) over the course of a 12-week growth trial. A diet with fish meal (FM) as the sole protein source was compared to diets with 50%, 75% and 100% of replacement (PP50, PP75, PP100). Protein retention was improved with more plant protein supply, and just a slight decrease in the final weight gain was found in fish fed PP50 and PP75 diets. However, in the PP100 group, weight gain was depressed up to 30% mainly as the result of a marked reduction of feed intake. These fish also showed a lower fat gain along with a marked hypocholesterolemic effect. Dietary treatment did not alter the hepatic activity of amino acid catabolising enzymes (alanine aminotransferase (ALAT), aspartate aminotransferase (ASAT), glutamate dehydrogenase (GDH)), although the size of the total muscle free amino acid (FAA) pool was increased by more plant protein supply. The activity of the somatotropic axis also varied among experimental groups, and the up-regulation of circulating growth hormone (GH) levels with a high plant protein supply followed the decrease in growth rates, plasma levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I), and liver mRNA transcripts of IGF-I

* Corresponding author. Tel.: +34-64-319500; fax: +34-64-319509.

E-mail address: jperez@iats.csic.es (J. Pérez-Sánchez).

and GH receptors. This catabolic feature evidenced a liver desensitisation to the anabolic action of GH in the PP100 group, and to a lesser extent in the PP75 group. Taken together all these findings, up to 50–75% of fish meal replacement seems to be feasible with IAA supplementation, but further research is needed to fully identify the responsible factors for the depressed feed intake in order to achieve a full replacement in a fish species having high dietary protein requirements.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Gilthead sea bream; Plant protein; Nutrient utilisation; Free amino acids; Growth hormone; Growth hormone receptor; Insulin-like growth factor-I

1. Introduction

Fish meal is still the most important protein source for aquaculture industry, but this is a limited food resource and there is serious concern on the long-term availability of this feedstuff for use in fish diets (Hardy, 1996; Sargent and Tacon, 1999). Thus, for the continued development of aquaculture on the basis of sustainable and renewable food resources, basic knowledge on the physiological consequences of a total or partial replacement of fish meal by alternative protein sources is needed. Given that plant feedstuffs are readily available, they have received most attention over the past years (Kaushik, 1990; Tacon, 1994). Fish meal free diets have been successfully used in rainbow trout (Kaushik et al., 1995; Watanabe et al., 1998), but problems related to amino acid imbalances (NRC, 1993) and anti-nutritional factors (Francis et al., 2001) have not allowed so far a total substitution of fish meal, especially in marine finfish of interest in the Mediterranean area.

In gilthead sea bream, a major species for European aquaculture, available data (Robaina et al., 1995; Kissil et al., 2000; Pereira and Oliva-Teles, 2002) indicate that only a partial replacement of fish meal by plant protein sources is possible. Since an optimal supply of indispensable amino acids (IAA) is essential for maximising protein growth, a supplementation with deficient IAA is often required to improve the nutritive value of plant protein meals (Murai et al., 1989; Davies et al., 1997; Regost et al., 1999; Cheng et al., 2003). Watanabe et al. (1998) observed that if the dietary protein source supplies adequate levels of IAA, there is no need for further addition of crystalline amino acids in trout diets. Our own earlier work in gilthead sea bream (Gómez-Requeni et al., 2003) showed that about one third of fish meal could be replaced by plant proteins, and that the ideal amino acid profile would be that of the gilthead sea bream muscle with a relative high ratio of indispensable to dispensable amino acids (DAA). In this context, it was of interest to further explore the feasibility of total fish meal replacement by plant protein ingredients supplemented with IAA, meeting the theoretical IAA requirement profile of gilthead sea bream (Luquet and Sabaut, 1974; Kaushik, 1998) and to simulate muscle IAA profile. We focused our attention not only on growth performance and amino acid utilisation, but also on the responsiveness of the somatotrophic axis that plays a key role in the regulation of growth and nutrient utilisation (Pérez-Sánchez and Le Bail, 1999).

2. Materials and methods

2.1. Diets

Isoproteic and isolipidic diets based on fish meal (FM) or graded levels of plant protein sources (corn gluten, wheat gluten, extruded peas, rapeseed meal and sweet white lupin) were formulated to replace the 50% (PP50), 75% (PP75) and 100% (PP100) of fish meal protein (Table 1). All diets were formulated to contain similar levels of digestible protein and digestible energy levels based on data available on the apparent digestibility coefficients for the different ingredients (Lupatsch et al., 1997; Nengas et al., 1995; and our own unpublished work). Crystalline amino acids were added to plant protein-based diets to meet the IAA requirement profile. The IAA/DAA ratio was close to 1.1 in all diets,

Table 1
Ingredient and chemical composition of the four experimental diets

Ingredient (g/kg)	FM	PP50	PP75	PP100
Fish meal, LT (CP 70%)	703.7	352.0	176.0	0
Corn gluten meal	0	120.0	180.0	250.0
Wheat gluten	0	120.0	180.0	250.0
Extruded peas (Aquatex)	0	60.0	90.0	120.0
Rapeseed meal (Primor 00)	0	30.9	67.2	27.3
Lupin, sweet white	0	0	0	6.9
Extruded whole wheat	142.0	94.9	30.6	15.5
Fish oil	124.3	141.3	149.8	158.0
Binder (Na Alginate)	10.0	10.0	10.0	10.0
Mineral premix ^a	10.0	10.0	10.0	10.0
Vitamin premix ^b	10.0	10.0	10.0	10.0
CaHPO ₄ ·2H ₂ O (18% P)	0	6.5	30.7	51.1
L-Arg	0	7.6	11.3	15.9
L-His	0	2.3	3.4	4.8
L-Lys	0	15.9	23.6	32.5
DL-Met	0	2.5	3.6	5.4
L-Trp	0	1.4	2.2	2.9
L-Thr	0	5.0	7.4	10.4
L-Ile	0	4.2	6.2	8.4
L-Val	0	5.4	8.0	11.1
<i>Proximate composition</i>				
Dry matter (DM, %)	93.7	94.3	91.9	90.1
Crude protein (% DM)	46.1	47.5	44.8	42.8
Crude fat (% DM)	16.5	16.6	17.2	16.8
Gross energy (kJ/g DM)	20.4	21.3	21.4	21.7

^a Supplied the following (mg/kg diet, except as noted): calcium carbonate (40% Ca) 2.15 g, magnesium hydroxide (60% Mg) 1.24 g, potassium chloride 0.9 g, ferric citrate 0.2 g, potassium iodine 4 mg, sodium chloride 0.4 g, calcium hydrogen phosphate 50 g, copper sulphate 0.3, zinc sulphate 40, cobalt sulphate 2, manganese sulphate 30, sodium selenite 0.3.

^b Supplied the following (mg/kg diet): retinyl acetate 2.58, DL-cholecalciferol 0.037, DL- α tocopheryl acetate 30, menadione sodium bisulphite 2.5, thiamin 7.5, riboflavin 15, pyridoxine 7.5, nicotinic acid 87.5, folic acid 2.5, calcium pantothenate 2.5, vitamin B₁₂ 0.025, ascorbic acid 250, inositol 500, biotin 1.25 and choline chloride 500.

but levels of some DAA (proline and glutamic acid) were higher and some others (alanine, glycine and aspartic acid) lower in plant protein-based diets than in the FM diet (Table 2).

2.2. Growth trial

Juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) were obtained from a fish farm (Cupimar, Cádiz, Spain). Fish were acclimated to laboratory conditions for 20 days before being randomly distributed into fibreglass tanks of 500-l capacity. Fish of 16–17 g initial body weight (IBW) were distributed into 12 experimental tanks (500-l) in groups of 90 fish each. Water flow was 20 l/min, and oxygen content of outlet water remained higher than 85% saturation. Day length and temperature increased over the course of the trial (April 29–July 19), following natural changes at our latitude (40°5'N; 0°10'E). Water temperature ranged from 17 to 25 °C.

Each diet was randomly allocated to triplicate groups of fish for 81 days (12 weeks). Feed was offered by hand to apparent visual satiety in two meals per day (9 h, 14 h), and feed consumption was recorded daily. Every 3 weeks, fish were counted and group-weighted under moderate anaesthesia (3-aminobenzoic acid ethyl ester, MS 222; 100 µg/ml).

Table 2

Amino acid composition (g/16 g N) of the four experimental diets along with data on ideal IAA profile for gilthead sea bream (Kaushik, 1998)

Amino acid	FM	PP50	PP75	PP100	Ideal IAA profile
ARG	6.5	6.5	5.5	5.5	5.4
HIS	2.2	2.5	2.7	2.9	1.7
ILE	4.8	4.8	5.0	5.5	2.6
LEU	8.2	8.3	8.7	9.5	4.5
LYS	8.6	9.5	10.3	7.0	5.0
MET	2.7	2.7	2.5	2.7	2.4 ^a
PHE	4.2	4.4	4.6	5.0	2.9 ^b
THR	4.2	4.2	4.4	4.8	2.8
TYR	3.5	3.3	3.5	3.7	
TRP ^c	1.2	1.2	1.2	1.2	0.6
VAL	5.5	5.7	6.1	6.5	3.0
Ala	6.8	5.4	4.9	4.4	
Asp	10.3	6.9	5.7	4.49	
Glu	15.5	18.5	22.2	25.8	
Gly	6.8	4.6	3.9	2.9	
Pro	4.0	5.1	6.0	7.6	
Ser	4.2	4.0	4.4	4.5	
IAA (%) ^d	50.3	51.9	53.4	53.1	
DAA (%) ^e	47.6	44.6	47.0	49.6	
IAA/DAA	1.06	1.16	1.14	1.07	

^a Met + Cys.

^b Phe + Tyr.

^c Data on Trp for the diets were estimated based on ingredient AA composition.

^d IAA: Indispensable amino acids.

^e DAA: Dispensable amino acids.

Blood and tissue sampling was done at the end of the growth trial from randomly selected fish killed by a blow to the head. Six hours after the morning meal (12 animals per diet; 4 animals per tank), blood samples were taken from caudal vessels with heparinised syringes. Following overnight fasting after the evening meal, 15 further fish per dietary treatment were withdrawn (9–10 h) for blood, liver and white muscle samplings. Plasma was obtained after centrifugation at $3000 \times g$ for 20 min at 4 °C, and stored at –30 °C until further metabolite and hormone analyses. Liver and white muscle were rapidly excised, frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C until analysis (enzyme activities, amino acid analysis, gene expression).

2.3. Food and body composition analyses

Chemical analysis of diets for protein, fat and ash was performed according to AOAC (1990) methods. Diet samples were hydrolysed (6 N HCl, 110 °C) and amino acid analysis was performed using high-performance liquid chromatography. Whole body composition was determined in a pooled sample of 10 fish at the beginning and in pools of 5 fish per tank at the end of growth trial. Specimens for body analysis were ground, and small aliquots were dried (105 °C) to estimate water content. The remaining samples were freeze-dried and chemical analysis for protein, fat and ash was performed as above. Based on data from chemical composition at the beginning and at the end of the trial, retention efficiencies and daily nitrogen and fat gains were calculated.

2.4. Tissue free amino acids

Free amino acid (FAA) levels of muscle were measured using the method outlined by Lyndon et al. (1993) and validated by Mente et al. (2002). Briefly, FAA were extracted from 200 mg tissue by homogenizing in 4 ml absolute ethanol in the presence of 2.5 mM norleucine as internal standard. Samples were then made to 5 ml with water and bound and FAA were separated by centrifugation at $6000 \times g$ for 10 min. FAA were determined with an automatic analyser (Applied Biosystems), and results were calculated as micromoles per gram wet weight of muscle.

2.5. Enzyme activities

Crude extracts of liver for assaying enzyme activities of amino acid catabolism were obtained by homogenisation of frozen tissue in 10 volumes of ice-cold buffer (30 mM Hepes, 0.25 mM saccharose, 50 mM EDTA, 5 mM K_2HPO_4 , 1 mM dithiotreitol; pH 7.2). Activities of alanine aminotransferase (ALAT, EC 2.6.1.2) and aspartate aminotransferase (ASAT, EC 2.6.1.1) were measured on supernatants (after centrifugation at $10,000 \times g$ at 4 °C for 20 min), using specific analytical procedures (Mathieu et al., 1982) and commercially available kits (Enzyline, Biomerieux, Marcy l'Etoile, France). To measure glutamate dehydrogenase (GDH, EC 1.4.1.2) activity, the first crude homogenate was centrifuged at $1000 \times g$ at 4 °C for 10 min. Supernatants were then treated by ultrasound (100 W, 1 min) to break mitochondrial membranes, and the formation of NADH was

followed after centrifugation at $15,000 \times g$ at 4°C for 10 min by adding L-glutamic acid to the reaction mixture (175 mM Tris-HCl, 100 mM semi-carbazine, 1.1 mM NAD, 1 mM ADP, 5 mM L-leucine; pH 8.5).

The soluble hepatic protein content in assayed reaction mixtures was determined by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard. Enzyme activity units (IU), defined as micromoles of substrate converted to the product per minute at the assay temperature (37°C), were expressed per gram of protein, per gram of liver and per whole liver weight of 100 g fish.

2.6. Hormone and metabolite assays

Plasma glucose (Trinder, 1969), triacylglycerol (McGowan et al., 1983) and cholesterol (Roeschlau et al., 1974) levels were determined spectrophotometrically using commercial kits (Sigma 315–100; Sigma 337-B; Sigma 401-25P).

Plasma growth hormone (GH) levels were assayed by a homologous gilthead sea bream radioimmunoassay (RIA) using recombinant GH (Martínez-Barbera et al., 1995) as tracer and standard. Midrange (ED_{50}) of assay was 1.8 ng/ml. Hepatic GH-binding was assayed by a radioreceptor assay (Pérez-Sánchez et al., 1994), based on the use of recombinant gilthead sea bream GH as iodinated tracer and cold hormone to measure total and nonspecific GH-binding.

After acid-ethanol precipitation, total plasma levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) were measured using a generic fish IGF-I RIA. The assay is based on the use of red sea bream (*Pagrus major*) IGF-I (GroPep, Adelaide, Australia) as tracer and standard, and anti-barramundi (Asian sea bass, *Lates calcarifer*) IGF-I serum (GroPep) (1:8000) as a first antibody. A goat anti-rabbit IgG (1:20) (Biogenesis, Poole, UK) was used as a precipitating antibody. The amino acid similarity of red sea bream IGF-I and that of gilthead sea bream IGF-I is 100%, and curve displacements of gilthead sea bream IGF-I (Fine et al., 1997), red sea bream IGF-I (GroPep) and Asian sea bass IGF-I (GroPep) are identical. The sensitivity and midrange of the assay were 0.05 and 0.7–0.8 ng/ml, respectively.

2.7. IGF-I and GHR gene expression

Total RNA from liver was extracted by the acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform method (Chomczynski and Sacchi, 1987). Quantity and purity of isolated RNA was determined by absorbance measurements at 260 and 280 nm, and its integrity was tested by electrophoresis in formaldehyde-agarose gels.

To assess the expression of GH receptor (GHR) and IGF-I genes, *real-time* PCR assays based on SYBR Green I were used according to Calduch-Giner et al. (in press). β -Actin was chosen as housekeeping gene to correct potential variations in RNA loading. The designed primers for GHR (forward: 5'-ACG TGT CAG CCA CCA CAT GA; reverse: 5'-TCG TGC AGA TCT GGG TCG TA) amplified a cytoplasmic 99-bp amplicon comprised between 1026 and 1124 nt positions. Alternative splicing of gilthead sea bream IGF-I did not occur at the 5' end, and IGF-I primers (forward: 5'-TGT CTA GCG CTC TTT CCT TTC A; reverse: 5'-AGA GGG TGT GGC TAC AGG

AGA TAC) amplified a 84-bp amplicon coding for the signal peptide (Duguay et al., 1996). Primers for β -actin (forward: 5'-TCC TGC GGA ATC CAT GAG A; reverse: 5'-GAC GTC GCA CTT CAT GAT GCT) amplified a 51-bp amplicon of the known gilthead sea bream sequence (Santos et al., 1997).

For the performed assays, isolated RNA (0.5–1.5 μ g) was DNase I-treated and reverse transcribed with oligo-dT. Plasmid constructs (pGEM-T vector) were used as external standards for each target gene. PCR amplification and analysis were carried out with the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems), using MicroAmp optical 96-well plates. The 25- μ l reactions contained 1 \times SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.05–1.00 μ l of RT reaction, and 0.3–0.9 μ M of each forward and reverse primer. Primer concentration was optimised according to manufacturer instructions, and templates were amplified in quadruplicate wells using the following protocol. Briefly, the AmpliTaq Gold DNA Polymerase was activated and cDNA denatured by preincubation for 10 min at 95 °C; the template was amplified for 40 cycles of denaturation for 15 s at 95 °C, and annealing/extension at 60 °C for 60 s. Fluorescent data, acquired during each extension phase, were analysed with the GeneAmp 5700 SDS Software. When PCR was ended, melting curves were obtained following a denaturation period at 95 °C, at a start temperature of 60 °C and slowly heating to 95 °C.

2.8. Statistical analysis

Data were analysed by one- and two-way analysis of variance, followed by Student–Newman–Keuls' test at a significance level of $P < 0.05$. Two-way analysis of variance was used for comparing endocrine and metabolic data between the two sampling times (6 h after feeding, overnight fasting). Tank average values of feed intake, growth, body composition and nutrient accretion were used as experimental units for statistical analysis.

3. Results

A three- to fourfold increase in body weight was found over the course of the 12-week growth trial with juvenile gilthead sea bream (Table 3). Final body weight and feed intake decreased progressively and significantly with the increase of dietary plant protein content, and specific growth rates ranged from 1.86 ± 0.01 (FM) to 1.56 ± 0.03 (PP100). Conversely, feed and protein efficiency ratios were higher in fish fed plant protein diets, and the best protein efficiency ratio was found in fish fed the PP75 diet. Hepatosomatic index and mesenteric fat index did not vary significantly among fish groups, but the whole body fat content was significantly lower in sea bream fed with the PP100 diet than in those fed the FM diet. Daily fat gain was lower in fish fed the diet PP100 than in the other three groups. Nitrogen gain in this fish group was also diminished, although N retention (as % of intake) was higher than in FM and PP50 groups.

The size of the total FAA pool of white muscle (with or without taurine) increased with the fish meal replacement (Table 4). Significant increases were found for histidine, leucine,

Table 3

Data on growth performance, whole body composition, and nutrient gain and retention of gilthead sea bream fed the four experimental diets for 12 weeks

	FM	PP50	PP75	PP100	<i>P</i> ¹
Initial body weight (g)	16.4 ± 0.07	16.7 ± 0.11	16.5 ± 0.19	16.4 ± 0.24	0.52
Final body weight (g)	73.8 ± 0.86 ^d	69.7 ± 0.52 ^c	66.5 ± 0.50 ^b	58.2 ± 0.71 ^a	< 0.001
Liver (g)	0.97 ± 0.07	1.03 ± 0.08	0.87 ± 0.08	0.76 ± 0.07	0.075
Mesenteric fat (g)	1.17 ± 0.07 ^b	1.09 ± 0.07 ^b	1.01 ± 0.06 ^{ab}	0.79 ± 0.07 ^a	0.001
HSI (%) ²	1.23 ± 0.06	1.31 ± 0.09	1.31 ± 0.13	1.38 ± 0.11	0.804
MFI (%) ³	1.49 ± 0.09	1.41 ± 0.11	1.39 ± 0.08	1.26 ± 0.09	0.395
Feed intake (g DM/fish)	63.8 ± 1.25 ^d	52.9 ± 0.42 ^c	47.6 ± 0.80 ^b	41.9 ± 0.83 ^a	< 0.001
Feed intake (%ABW/d)	1.75 ± 0.02 ^c	1.51 ± 0.02 ^b	1.42 ± 0.01 ^a	1.39 ± 0.02 ^a	< 0.001
Weight gain (%)	350.9 ± 4.32 ^c	317.6 ± 3.92 ^b	302.2 ± 3.56 ^b	255.4 ± 7.26 ^a	< 0.001
SGR ⁴ (%)	1.86 ± 0.01 ^c	1.76 ± 0.01 ^b	1.72 ± 0.01 ^b	1.56 ± 0.03 ^a	< 0.001
FE ⁵	0.89 ± 0.01 ^b	0.99 ± 0.03 ^a	1.03 ± 0.01 ^a	0.99 ± 0.04 ^a	< 0.001
PER ⁶	1.94 ± 0.01 ^a	2.09 ± 0.03 ^b	2.30 ± 0.02 ^c	2.04 ± 0.01 ^b	< 0.001
<i>Whole body composition (% wet matter)</i>					
Moisture	67.4 ± 0.32	67.3 ± 0.23	67.7 ± 0.50	68.3 ± 0.13	0.171
Protein	16.1 ± 0.05 ^{ab}	15.9 ± 0.09 ^a	16.1 ± 0.12 ^{ab}	16.4 ± 0.06 ^b	0.017
Fat	11.7 ± 0.16 ^b	11.8 ± 0.24 ^b	11.4 ± 0.46 ^{ab}	10.3 ± 0.05 ^a	0.015
Ash	3.49 ± 0.05	3.61 ± 0.07	3.67 ± 0.06	3.77 ± 0.08	0.097
<i>Gain [mg(g)/kg ABW/d]</i>					
Nitrogen (mg)	385.2 ± 1.99 ^c	367.3 ± 0.59 ^b	363.9 ± 2.97 ^b	344.6 ± 2.19 ^a	< 0.001
Fat (g)	1.85 ± 0.04 ^b	1.80 ± 0.05 ^b	1.70 ± 0.09 ^b	1.38 ± 0.02 ^a	0.001
<i>Retention (% intake)</i>					
Nitrogen	31.7 ± 0.21 ^a	33.6 ± 0.67 ^a	37.8 ± 0.27 ^b	38.9 ± 0.63 ^b	< 0.001
Energy	46.6 ± 0.30 ^b	51.3 ± 0.75 ^b	51.0 ± 1.18 ^b	47.3 ± 0.82 ^a	< 0.001

Each value is the mean ± S.E.M. of data from triplicate groups. Data on liver and mesenteric fat indices were calculated from 18–20 fish.

Initial body composition: water 71.1%, protein 15.4%, lipid 9.2%, ash 3.4 %.

¹ *P* values result from analysis of variance. Different superscript letters in each row indicate significant differences among dietary treatments (Student–Newman–Keuls test, *P* < 0.05).

² Hepatosomatic index = (100 × liver wt.)/fish wt.

³ Mesenteric fat index = (100 × mesenteric fat wt.)/fish wt.

⁴ Specific growth rate = [100 × (ln final fish wt. – ln initial fish wt.)/days].

⁵ Feed efficiency = wet weight gain/dry feed intake.

⁶ Protein efficiency ratio = wet weight gain/crude protein intake.

threonine, valine, asparagine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, proline and serine. Conversely, contents of arginine, lysine and taurine decreased with the increase of plant protein supply.

Data on hepatic activities of the three main enzymes involved in amino acid catabolism are shown in Table 5. When enzymatic activity was expressed as IU/g liver, a significant decrease for both GDH and ALAT activity was found with the increase of fish meal replacement. However, enzyme activities of all the three enzymes (GDH, ALAT, ASAT) did not vary significantly when measured values were normalized by the total liver weight or the protein content of the analysed supernatant.

Table 4

White muscle free amino acids ($\mu\text{mol/g}$ wet weight) of gilthead sea bream fed the four experimental diets

Amino acid	FM	PP50	PP75	PP100	P^1
ARG	1.43 \pm 0.05 ^c	0.83 \pm 0.02 ^b	0.61 \pm 0.09 ^b	0.24 \pm 0.09 ^a	<0.001
HIS	6.20 \pm 0.43 ^a	8.62 \pm 0.15 ^a	11.24 \pm 0.62 ^b	14.77 \pm 0.88 ^c	<0.001
ILE	0.04 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.077
LEU	0.34 \pm 0.03 ^a	0.37 \pm 0.02 ^{ab}	0.47 \pm 0.04 ^b	0.44 \pm 0.02 ^{ab}	0.025
LYS	1.65 \pm 0.19 ^b	1.12 \pm 0.13 ^{ab}	0.98 \pm 0.07 ^a	0.78 \pm 0.10 ^a	0.003
PHE	0.41 \pm 0.03	0.30 \pm 0.04	0.37 \pm 0.03	0.27 \pm 0.03	0.053
THR	0.88 \pm 0.06 ^a	1.24 \pm 0.14 ^{ab}	1.71 \pm 0.23 ^b	2.63 \pm 0.13 ^b	0.001
TYR	0.15 \pm 0.01	0.16 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01	0.17 \pm 0.01	0.625
VAL	0.14 \pm 0.01 ^{ab}	0.13 \pm 0.01 ^a	0.15 \pm 0.01 ^{ab}	0.17 \pm 0.01 ^b	0.040
Ala	1.18 \pm 0.12	1.05 \pm 0.17	1.08 \pm 0.10	0.96 \pm 0.10	0.647
Asn	0.56 \pm 0.13 ^a	1.32 \pm 0.18 ^{ab}	1.62 \pm 0.29 ^{bc}	2.28 \pm 0.18 ^c	0.01
Asp	0.13 \pm 0.02 ^a	0.18 \pm 0.03 ^{ab}	0.35 \pm 0.04 ^{bc}	0.48 \pm 0.07 ^c	0.01
Gln	0.54 \pm 0.09	0.56 \pm 0.10	0.64 \pm 0.10	0.68 \pm 0.10	0.727
Glu	0.46 \pm 0.01 ^a	0.74 \pm 0.06 ^b	0.70 \pm 0.04 ^b	0.79 \pm 0.04 ^b	0.01
Gly	15.64 \pm 1.49 ^a	21.58 \pm 1.93 ^{ab}	25.32 \pm 2.01 ^b	28.11 \pm 1.54 ^b	0.002
Hyp	1.17 \pm 0.08	1.27 \pm 0.11	1.32 \pm 0.24	1.28 \pm 0.07	0.903
Pro	0.44 \pm 0.02 ^a	1.36 \pm 0.17 ^{ab}	2.45 \pm 0.49 ^{bc}	3.17 \pm 0.35 ^c	<0.001
Ser	0.33 \pm 0.03 ^a	0.45 \pm 0.05 ^{ab}	0.53 \pm 0.08 ^b	1.03 \pm 0.13 ^c	0.001
Tau	22.39 \pm 2.02 ^b	17.01 \pm 1.02 ^{ab}	11.78 \pm 1.49 ^a	12.68 \pm 0.39 ^a	0.001
Sum FAA	54.08 \pm 0.98 ^a	58.30 \pm 2.87 ^a	61.48 \pm 2.46 ^a	70.94 \pm 2.02 ^b	0.001
Sum IAA	11.24 \pm 0.39 ^c	12.78 \pm 0.14 ^c	15.69 \pm 0.87 ^b	19.50 \pm 0.84 ^a	<0.001
Sum DAA	42.84 \pm 0.66 ^b	45.51 \pm 2.75 ^{ab}	45.79 \pm 1.85 ^{ab}	51.44 \pm 1.18 ^a	0.033
Sum FAA (excl. Tau)	31.69 \pm 1.53 ^a	41.28 \pm 2.65 ^b	49.70 \pm 3.78 ^c	58.28 \pm 1.77 ^d	<0.001

Each value is the mean \pm S.E.M. of data from six animals.¹ P values result from analysis of variance. Different superscript letters in each row indicate significant differences among dietary treatments (Student–Newman–Keuls' test, $P < 0.05$).

Table 5

Activity of hepatic enzymes of amino acid catabolism of gilthead sea bream fed the four experimental diets

	FM	PP50	PP75	PP100	P^1
<i>Glutamate dehydrogenase (GDH)</i>					
Activity (IU/g liver)	17.6 \pm 1.14 ^b	14.2 \pm 1.18 ^a	11.3 \pm 0.13 ^a	11.5 \pm 0.61 ^a	0.002
Activity (IU/whole liver 100 g fish)	13.4 \pm 1.43	14.2 \pm 1.2	13.0 \pm 0.98	12.2 \pm 0.61	0.66
Activity (IU/g protein)	0.26 \pm 0.02	0.26 \pm 0.02	0.21 \pm 0.01	0.22 \pm 0.02	0.17
<i>Alanine amino transferase (ALAT)</i>					
Activity (IU/g liver)	53.0 \pm 1.55 ^b	43.1 \pm 3.59 ^a	35.3 \pm 1.35 ^a	38.0 \pm 0.82 ^a	<0.001
Activity (IU/whole liver 100 g fish)	40.8 \pm 3.47	46.9 \pm 4.12	40.8 \pm 3.10	39.4 \pm 2.24	0.55
Activity (IU/g protein)	0.83 \pm 0.04	0.83 \pm 0.07	0.73 \pm 0.03	0.71 \pm 0.02	0.25
<i>Aspartate amino transferase (ASAT)</i>					
Activity (IU/g liver)	136.4 \pm 7.27	115.0 \pm 10.33	100.6 \pm 7.31	116.7 \pm 6.53	0.09
Activity (IU/whole liver 100 g fish)	104.0 \pm 7.55	112.4 \pm 5.18	106.8 \pm 5.63	126.7 \pm 3.55	0.09
Activity (IU/g protein)	2.11 \pm 0.09	2.18 \pm 0.06	1.94 \pm 0.06	2.24 \pm 0.06	0.13

Each value is the mean \pm S.E.M. of data from six animals.¹ P values result from analysis of variance. Different superscript letters in each row indicate significant differences among dietary treatments (Student–Newman–Keuls' test, $P < 0.05$).

When comparisons are made between sampling times, overall plasma values of glucose and triacylglycerol were higher ($P < 0.05$) in fish sampled 6 h after the morning meal than in fish sampled following overnight fasting (Fig. 1A and B). Dietary treatment did not affect significantly plasma glucose levels 6 h after meal. Following overnight fasting, plasma glucose levels decreased with the increase of fish meal replacement by plant protein sources, and significant differences were found between FM and PP75 fish groups. Plasma triacylglycerol levels 6 h after meal were significantly higher in fish fed diet FM than in fish fed diets PP75 and PP100. At both sampling times, plasma levels of cholesterol decreased significantly with the increase of fish meal replacement by plant proteins sources (Fig. 1C).

At 6 h after the morning meal, circulating GH levels did not differ significantly among groups (Fig. 2A). However, following overnight fasting, fish fed diet FM showed lower GH levels than fish fed diets PP75 and PP100. Dietary treatment also affected the total amount of circulating IGF-I (Fig. 2B). As a characteristic feature, plasma IGF-I levels

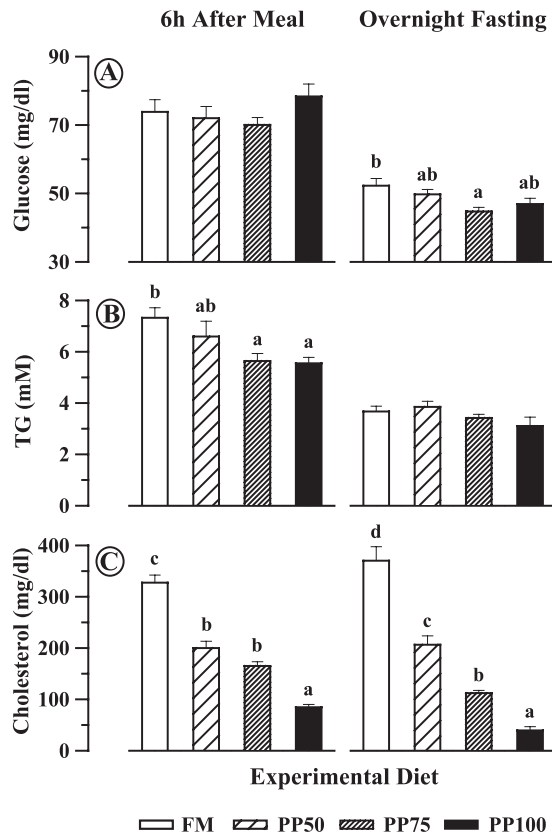


Fig. 1. Plasma glucose (A), plasma triacylglycerol (B) and plasma cholesterol (C) levels of gilthead sea bream fed the four experimental diets 6 h after the meal and following overnight fasting. Each value is the mean \pm S.E.M. of 12–15 animals. Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

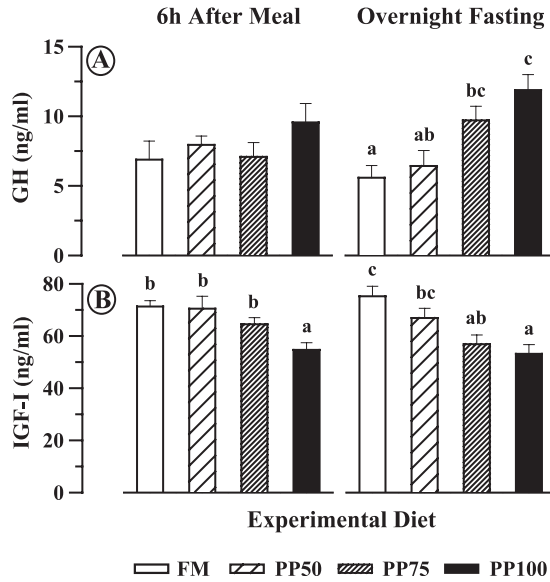


Fig. 2. Plasma GH (A) and plasma IGF-I (B) levels in gilthead sea bream fed the four experimental diets 6 h after the meal and following overnight fasting. Each value is the mean \pm S.E.M. of 12–15 animals. Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

decreased with the increase of fish meal replacement, but this effect appeared more evident in overnight fasted fish. Thus, 6 h after meal, significant differences were only found between FM and PP100 groups while a significant decrease of circulating IGF-I was also found following overnight fasting in fish fed the PP75 diet.

Following overnight fasting, hepatic GH-binding did not differ significantly (250–300 fmol/mg protein) among experimental groups (Fig. 3). However, when measurements on

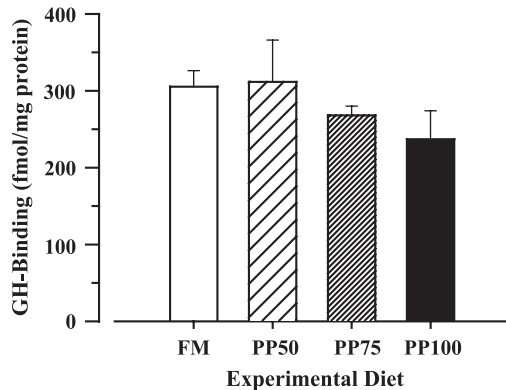


Fig. 3. Hepatic GH-binding following overnight fasting in gilthead sea bream fed the four experimental diets. Each value is the mean \pm S.E.M. of 12–15 animals. Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

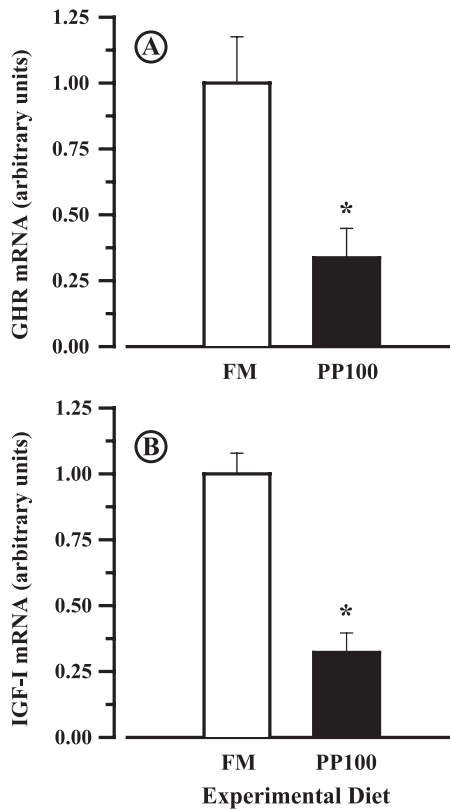


Fig. 4. Measurements of GHR (A) and IGF-I (B) mRNA transcripts (following overnight fasting) in gilthead sea bream fed diets FM and PP100. Each value is the mean \pm S.E.M. of five animals. Values with different levels are significantly different ($P < 0.05$).

hepatic GHR expression were made for the two extreme fish groups (FM and PP100), a marked down-regulation was found in fish fed the diet PP100 (Fig. 4A). A similar response was observed for IGF-I mRNA, and a concurrent decrease of GHR and IGF-I gene expression was found in fish fed the PP100 diet (Fig. 4B).

4. Discussion

The feasibility of fish meal replacement by plant protein sources is highly variable among fish species. In rainbow trout, a total replacement by means of soy protein concentrates (Kaushik et al., 1995) or combinations of different protein sources (Watanabe et al., 1998) did not have adverse effects in growth and feed utilisation. In contrast, earlier studies in Mediterranean fish species such as European sea bass (Gouveia and Davies, 2000) and gilthead sea bream (Robaina et al., 1995, 1998; Kissil et al., 2000; Pereira and Oliva-Teles, 2002) showed that only a 20–30% of fish meal

replacement was feasible. However, very recently, an almost total replacement of fish meal by plant proteins was demonstrated in European sea bass (Kaushik et al., in press).

One reason for the poor result with plant protein-based diets is a deficient feeding activity, and data of the present study indicate that incorporation of plant proteins led to a progressive reduction in voluntary feed intake of juvenile gilthead sea bream. Growth retardation at the 50% and 75% replacement levels was much lower than in previous studies, and final weight gain was only decreased in 10% and 15% in PP50 and PP75 groups, respectively. However, at the 100% of fish meal replacement, weight gain was lowered about 30%, and ongoing growth trials indicate that this detrimental effect is even exacerbated over time.

Low palatability, poor IAA profiles and complex synergistic interactions among anti-nutritional factors are perhaps the most plausible responsible factors for an altered feeding activity. The reduction of voluntary feed intake with plant protein-based diets has been reported in rainbow trout (Gomes and Kaushik, 1992) as well as in European sea bass (Dias et al., 1997). The latter authors also found that amino acid supplementation had a beneficial effect on feed intake, but in our case, IAA supplementation did not avoid this adverse effect. Thus, protein growth in terms of whole body N gain was decreased in fish fed plant protein diets (Table 3). However, N retention (expressed per unit N intake) was improved in fish fed PP75 and PP100 diets. A possible explanation of this result is that in most fish, the best feed efficiency is generally achieved under restricted feeding, as previously shown in gilthead sea bream (Company et al., 1999). Besides, the protein sparing effect of dietary lipids could be primed by a slight decrease of dietary protein/lipid ratio in fish fed higher levels of plant protein. Nevertheless, regardless of protein source, N retention of 31–39% was clearly in the upper range of available data for the same size class of gilthead sea bream (Martí-Palanca et al., 1996; Company et al., 1999; Santinha et al., 1999). This fish species has, however, high protein requirements and no significant differences in the hepatic activity of key enzymes (ALAT, ASAT, GDH) involved in amino acid catabolism were found (Table 5). This observation is consistent with the idea that the effect of dietary factors on the activity of these enzymes is often relatively contradictory within fish species (Cowey and Walton, 1989).

Efficient protein synthesis occurs if all amino acids are present in the precursor pool at the correct proportion (Fauconneau, 1985; Carter et al., 2000). Thus, a close relation between dietary amino acid supply, their availability and tissue free IAA levels is known to exist (Nose et al., 1978; Kaushik and Luquet, 1979; Kaushik et al., 1994), and such interrelation has been used for estimating amino acid requirements of fish (Kaushik, 1979; NRC, 1993; Wilson, 1994). In the present study, all diets contained similar amounts of arginine and lysine, but levels of these two amino acids in the muscle FAA pool were lowered in fish fed plant protein feedstuffs (Tables 2 and 4). Tissue FAA levels were measured, however, after an overnight fasting which should remove amino acid fluctuations following the meal. So, the concurrent decrease of arginine and lysine would suggest that they were rapidly utilised. Similarly, the increase of the total FAA pool, mainly due to high levels of histidine and glycine which represented more than 50% of the FAA pool in fish fed more plant protein sources (Table 4), suggests that most of muscle amino acids were utilised at a lower rate. This would explain, at least partially, the relative lower

growth rate of fish fed plant protein-based diets. Determination of amino acid availabilities following post-prandial changes in tissue free amino acids would throw more insight on this matter.

Taurine plays an important role in the regulation of cell volume and osmolarity (Takeuchi et al., 2000), and is even considered as essential during early development of some marine finfish (Park et al., 2002), being involved in maintaining retinal function (Lima et al., 1989). Indeed, early studies have shown that inclusion of a plant protein such as the zein of corn in the rainbow trout diet led to an increase in muscle taurine levels (Kaushik and Luquet, 1979). Muscle taurine is in fact linked to dietary sulphur amino acid (SAA) levels (Yokoyama and Nakazoe, 1992). Nevertheless, since dietary levels exceeded those of SAA requirements of gilthead sea bream (Luquet and Sabaut, 1974; Kaushik, 1998), it is difficult to incriminate the decrease in both liver and muscle taurine levels to a dietary imbalance with regard to SAA. Unfortunately, we did not measure amino acid availability and the analytical methods used did not allow to determine free methionine and cysteine content in tissues. Taurine, however, also participates in bile acid conjugation (Chesney, 1985), exerting in mammals a well known hypocholesterolemic action (Park et al., 1999). The hypocholesterolemic effect of plant protein feedstuffs as found here has already been reported in other teleosts (Kaushik et al., 1995; Dias, 1999; Regost et al., 1999; Robaina et al., 1999). If so, given the decrease in tissue taurine levels, it is tempting to suggest that the observed hypocholesterolemia is due at least in part to the utilisation of taurine for bile salt formation.

The GH-liver axis provides an integrated signal for growth and nutrient partitioning (Beckman and Dickhoff, 1998; Mingarro et al., 2002). Liver GH insensitivity in association with the increase in plasma GH levels is a characteristic feature of food shortage and malnutrition, which favours the mobilisation of body fat reserves. IGF-I is involved in the GH negative feedback loop (Pérez-Sánchez et al., 1992; Weil et al., 1999), and consistent changes in plasma GH levels occur in response to a shift in ration size and dietary protein/energy ratio (Pérez-Sánchez et al., 1995; Martí-Palanca et al., 1996; Company et al., 1999). Recently, we have also demonstrated that changes in the dietary IAA profile and DAA content are able to induce some state of liver GH resistance in conjunction with reduced growth rates (Gómez-Requeni et al., 2003). Similarly, the results presented herein indicate that the activity of the GH-liver axis was affected by dietary treatments. In comparison to fish fed the FM diet, no changes in the PP50 group were found, but in fish fed diet PP100 and to a certain extent in those fed diet PP75, the increase in circulating GH levels paralleled the decrease in circulating IGF-I levels. All this revealed a state of GH-liver desensitisation, a characteristic feature of catabolic states (Fig. 2). Furthermore, although we failed to demonstrate significant changes in hepatic GH-binding, a concurrent down-regulation of hepatic GHR and IGF-I gene expression was found when comparisons were made between the two extreme groups (Figs. 3 and 4). This is the first report of simultaneous and nutritionally regulated changes in mRNA transcripts of GHR and IGF-I in fish species. Additionally, it is of interest that the overall value of plasma GH levels was increased after the overnight fasting period, and the different responsiveness among groups for both circulating GH and IGF-I levels was also more evident at this sampling time. This occurred in conjunction with the overall decrease in plasma triacylglycerol and glucose levels, which also decreased with the increase of

dietary plant protein supply (Fig. 1). It appears therefore that fish fed with more plant protein sources showed a transitory energy deficit as the result mainly of a reduced feed intake, which is in agreement with data in rainbow trout (Gomes and Kaushik, 1992; Yamamoto et al., 2000). Besides, this effect appears particularly evident following overnight fasting, when the use of available amino acids for growth purposes would be also slowed down.

In summary, reduced feed intake rather than a defect in nutrient utilisation seems to be the major reason for a depressed growth in fish fed plant protein-based diets. Most of the observed changes in endocrine and metabolite parameters are the consequence rather than the cause of the changes in growth performance. Therefore, from our results, it is difficult to determine whether the lowered feed intake was due to inadequacy of IAA profile and/or other poorly defined factors, and further studies are needed to fully explore feeding regulation and the nutritive value of plant protein feedstuffs in gilthead sea bream diets. Despite this, it appears conclusive that IAA supplementation makes feasible a large fish meal replacement (50–75%) in a marine finfish having high dietary protein requirements.

Acknowledgements

This research was funded by EU (Q5RS-2000-30068; “Perspectives of Plant Protein Use in Aquaculture”, PEPPA), and Spanish (AGL2002-00551) projects. J.A.C.-G. was recipient of a research contract from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología. M.M. was recipient of a research grant from the Diputación Provincial de Castellón.

References

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990. In: Heldrich, K. (Ed.), Official Methods of Analysis. AOAC, Arlington, VA, 684 pp.
- Beckman, B.R., Dickhoff, W.W., 1998. Plasticity of smolting in spring chinook salmon: relation to growth and insulin-like growth factor-I. *J. Fish Biol.* 53, 808–826.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Calduch-Giner, J.A., Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, S., Boujard, D., Pérez-Sánchez, J., 2003. Molecular cloning and characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone receptor (GHR). Assessment of alternate splicing. *Comp. Biochem. Physiol., A*, (in press).
- Carter, C.G., Houlihan, D.F., He, Z.-Y., 2000. Changes in tissue free amino acid concentrations in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., after consumption of a low ration. *Fish Physiol. Biochem.* 23, 295–306.
- Cheng, Z.J., Hardy, R.W., Usry, J.L., 2003. Effects of lysine supplementation in plant protein-based diets on the performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and apparent digestibility coefficients of nutrients. *Aquaculture* 215, 255–265.
- Chesney, R., 1985. Taurine: its biological role and clinical implications. *Adv. Pediatr.* 32, 1–42.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Company, R., Calduch-Giner, J.A., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 1999. Growth performance and adiposity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): risks and benefits of high energy diets. *Aquaculture* 171, 279–292.
- Cowey, C.B., Walton, M.J., 1989. Intermediary metabolism. In: Halver, J.E. (Ed.), *Fish Nutrition*. Academic Press, New York, pp. 259–329.

- Davies, S.J., Morris, P.C., Baker, R.T.M., 1997. Partial substitution of fish meal and full-fat soya bean meal with wheat gluten and influence of lysine supplementation in diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac. Res.* 28, 317–328.
- Dias, J., 1999. Lipid deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): nutritional control of hepatic lipogenesis. PhD Thesis, Univ. Porto (Portugal) and Univ. Bordeaux (France). 190 pp. + annexes.
- Dias, J., Gomes, E.F., Kaushik, S.J., 1997. Improvement of feed intake through supplementation with an attractant mix in European sea bass fed plant-protein rich diets. *Aquat. Living Resour.* 10, 385–389.
- Duguay, S.J., Lai-Zhang, J., Steiner, D.F., Funkenstein, B., Chan, S.J., 1996. Developmental and tissue-regulated expression of IGF-I and IGF-II mRNA in *Sparus aurata*. *J. Mol. Endocrinol.* 16, 123–132.
- Fauconneau, B., 1985. Protein synthesis and protein deposition in fish. In: Cowey, C.B., Mackie, A.M., Bell, J.G. (Eds.), *Nutrition and Feeding in Fish*. Academic Press, London, pp. 17–45.
- Fine, M., Amuly, R., Sandowski, Y., Marchant, T.A., Chan, S.J., Gertler, A., Funkenstein, B., 1997. Recombinant gilthead seabream (*Sparus aurata*) insulin-like growth factor I: subcloning, expression in *Escherichia coli*, purification and characterization. *J. Endocrinol.* 153, 139–150.
- Francis, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2001. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish food ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, 197–227.
- Gomes, E., Kaushik, S., 1992. Effect of the replacement of dietary inorganic zinc by zinc/methionine on vegetable and animal protein utilization by rainbow trout. In: Kaushik, S.J., Luquet, P. (Eds.), *Fish Nutrition in Practice*, Biarritz, France, 24–27 June 1991. INRA Editions, Les Colloques, Paris, pp. 897–902.
- Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Kirchner, S., Caldach-Giner, J.A., Médale, F., Corraze, G., Panserat, S., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S.J., Pérez-Sánchez, J., 2003. Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotropic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 220, 749–767.
- Gouveia, A., Davies, S.J., 2000. Inclusion of an extruded dehulled pea seed meal in diets for juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 182, 183–193.
- Hardy, R.W., 1996. Alternate protein sources for salmon and trout diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 59, 71–80.
- Kaushik, S., 1979. Application of a biochemical method for the estimation of amino acid needs in fish: quantitative arginine requirements of rainbow trout in different salinities. In: Halver, J., Tiews, K. (Eds.), *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology*, vol. I. Heenemann Verlagsgesellschaft, Berlin, pp. 19–207.
- Kaushik, S.J., 1990. Use of alternative protein sources for the intensive rearing of carnivorous fishes. In: Flos, R., Tort, L., Torres, P. (Eds.), *Mediterranean Aquaculture*. Ellis Horwood, UK, pp. 125–138.
- Kaushik, S.J., 1998. Whole body amino acid composition of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), gilthead seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Psetta maxima*) with an estimation of their IAA requirement profiles. *Aquat. Living Resour.* 11, 355–358.
- Kaushik, S.J., Luquet, P., 1979. Influence of dietary amino acid patterns on the free amino acid contents of blood and muscle of rainbow trout (*Salmo gairdnerii* R.). *Comp. Biochem. Physiol.* 64B, 175–180.
- Kaushik, S.J., Breque, J., Blanc, D., 1994. Apparent amino acid availability and plasma free amino acid levels in Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *Comp. Biochem. Physiol.* 107A, 433–438.
- Kaushik, S.J., Cravedi, J.P., Lalles, J.P., Sumpter, J., Fauconneau, B., Laroche, M., 1995. Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 133, 257–274.
- Kaushik, S.J., Coves, D., Dutto, G., Blanc, D., 2003. Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* (in press).
- Kissil, G.W., Lupatsch, I., Higgs, D.A., Hardy, R.W., 2000. Dietary substitution of soy and rapeseed protein concentrates for fish meal, and their effects on growth and nutrient utilization in gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Aquac. Res.* 31, 595–601.
- Lima, L., Matus, P., Drujan, B., 1989. Spacial distribution of glutamate, taurine and GABA in teleosts and mammal retina: in vivo and in vitro study. *Int. J. Dev. Neurosci.* 7, 295–300.
- Lupatsch, I., Kissil, G.W., Sklan, D., Pfeffer, E., 1997. Apparent digestibility coefficients of feed ingredients and their predictability in compound diets for gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Aquac. Nutr.* 3, 81–89.
- Luquet, P., Sabaut, J.J., 1974. Nutrition azotée et croissance chez la daurade et la truite. In: *Colloque sur l'Aquaculture*. Actes de Colloques, Brest 1973, vol. 1. CNEXO, France, pp. 243–253.

- Lyndon, A.R., Davidson, I., Houlihan, D.F., 1993. Changes in tissue and plasma free amino acid concentrations after feeding in Atlantic cod. *Fish Physiol. Biochem.* 10, 365–375.
- Martínez-Barbera, J.P., Pendón, C., Martí-Palanca, H., Calduch-Giner, J.A., Rodríguez, R., Valdivia, M.M., Pérez-Sánchez, J., 1995. The use of recombinant gilthead sea bream growth hormone for radiiodination and standard preparation in radioimmunoassay. *Comp. Biochem. Physiol.* 110A, 335–340.
- Martí-Palanca, H., Martínez-Barberá, J.P., Pendón, C., Valdivia, M.M., Pérez-Sánchez, J., Kaushik, S., 1996. Growth hormone as a function of age and dietary protein: energy ratio in a marine teleost, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Growth Regul.* 6, 253–259.
- Mathieu, M., Aubry, C., Arthur, Y., Bailly, M., Braun, J.P., Bretauiere, F.J., Hohuu, K., Lalegerie, P., Maire, I., Mousson, B., Plomteux, G., Schiele, F., Vassault, A., 1982. Commission enzymologie de la société française de biologie clinique. *Ann. Biol. Clin.* 40, 87–164.
- McGowan, M.W., Artiss, J.D., Strandbergh, D.R., Zak, B., 1983. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin. Chem.* 29, 538–542.
- Mente, E., Coutteau, P., Houlihan, D.F., Davidson, I., Sorgeloos, P., 2002. Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*: effects of dietary protein source. *J. Exp. Biol.* 205, 3107–3122.
- Míngarro, M., Vega-Rubín de Celis, S., Astola, A., Pendón, C., Valdivia, M.M., Pérez-Sánchez, J., 2002. Endocrine mediators of seasonal growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): the growth hormone and somatolactin paradigm. *Gen. Comp. Endocrinol.* 128, 102–111.
- Murai, T., Wang, D., Ogata, H., 1989. Supplementation of methionine to soy flour diets for fingerling carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* 77, 373–385.
- National Research Council (NRC), 1993. *Nutrient Requirements of Fish*. National Academy Press, Washington, DC. 124 pp.
- Nengas, I., Alexis, M.N., Davies, S.J., Petichakis, G., 1995. Investigation to determine digestibility coefficients of various raw materials in diets for gilthead sea bream, *Sparus auratus* L. *Aquac. Res.* 26, 185–194.
- Nose, T., Lee, D.L., Arai, S., 1978. The effects of the withdrawal of single amino acid from an amino acid diet on the free amino acid composition of skeletal muscle in young carp. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab., Tokyo* 28, 255–263.
- Park, T., Oh, J., Lee, K., 1999. Dietary taurine or glycine supplementation reduces plasma and liver cholesterol and triglyceride concentrations in rats fed a cholesterol-free diet. *Nutr. Res.* 19, 1777–1789.
- Park, G., Takeuchi, T., Yokoyama, M., Seikai, T., Park, G.S., 2002. Optimal dietary taurine level for growth of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.* 68, 824–829.
- Pereira, T.G., Oliva-Teles, A., 2002. Preliminary evaluation of pea seed meal in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquac. Res.* 33, 1183–1189.
- Pérez-Sánchez, J., Le Bail, P.-Y., 1999. Growth hormone axis as marker of nutritional status and growth performance in fish. *Aquaculture* 177, 117–128.
- Pérez-Sánchez, J., Weil, C., Le Bail, P.-Y., 1992. Effects of human insulin-like growth factor-I on release of growth hormone by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pituitary cells. *J. Exp. Zool.* 262, 287–290.
- Pérez-Sánchez, J., Martí-Palanca, H., Le Bail, P.-Y., 1994. Homologous growth hormone binding in gilthead sea bream. Effect of fasting and refeeding on hepatic GH-binding and plasma somatomedin-like immunoreactivity. *J. Fish Biol.* 44, 287–301.
- Pérez-Sánchez, J., Martí-Palanca, H., Kaushik, S., 1995. Ration size and protein intake affect circulating growth hormone concentration, hepatic growth hormone binding and plasma insulin-like growth factor-I immunoreactivity in a marine teleost, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Nutr.* 125, 546–552.
- Regost, C.J., Arzel, J., Kaushik, S.J., 1999. Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 180, 99–117.
- Robaina, L., Izquierdo, M.S., Moyano, F.J., Socorro, J., Vergara, J.M., Montero, D., Fernández-Palacios, H., 1995. Soybean and lupin seed meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implications. *Aquaculture* 130, 219–233.
- Robaina, L., Izquierdo, M.S., Moyano, F.J., Socorro, J., Vergara, J.M., Montero, D., 1998. Increase of the dietary $n-3/n-6$ fatty acid ratio and addition of phosphorus improves liver histological alterations induced by feeding diets containing soybean meal to gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 161, 281–293.
- Robaina, L., Corraze, G., Aguirre, P., Blanc, D., Melcion, J.P., Kaushik, S., 1999. Digestibility, postprandial

- ammonia excretion and selected plasma metabolites in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed pelleted or extruded diets with or without wheat gluten. *Aquaculture* 179, 45–56.
- Roeschlau, P., Bernt, E., Gruber, W.A., 1974. Enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Clin. Chem. Clin. Biochem.* 12, 226–227.
- Santinha, P.J.M., Médale, F., Corraze, G., Gomes, E.F.S., 1999. Effects of the dietary protein: lipid ratio on growth and nutrient utilization in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquac. Nutr.* 5, 147–156.
- Santos, C.R.A., Power, D.M., Kille, P., Llewellyn, L., Ramsurn, V., Wigham, T., Sweeny, G., 1997. Cloning and sequencing of a full length seabream (*Sparus aurata*) β -actin cDNA. *Comp. Biochem. Physiol.* 117B, 185–189.
- Sargent, J.R., Tacon, A.G., 1999. Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat. *Proc. Nutr. Soc.* 58, 377–383.
- Tacon, A.G.J., 1994. Feed ingredients for carnivorous fish species alternatives to fishmeal and other fishery resources. *FAO Fish. Circ.*, vol. 881. FAO, Rome. 35 pp.
- Takeuchi, K., Toyohara, H., Sakaguchi, M., 2000. A hyperosmotic stress-induced mRNA of carp cell encodes Na^+ - and Cl^- -dependent high affinity taurine transporter. *Biochim. Biophys. Acta* 1464, 219–230.
- Trinder, P., 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* 6, 24–27.
- Watanabe, T., Verakunpiriya, V., Watanabe, K., Viswanath, K., Satoh, S., 1998. Feeding of rainbow trout with non-fish meal diets. *Fish. Sci.* 63, 258–266.
- Weil, C., Carré, F., Blaise, O., Breton, B., Le Bail, P.-Y., 1999. Differential effect of insulin-like growth factor-I on in vitro gonadotropin (I and II) and growth hormone secretions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at different stages of the reproductive cycle. *Endocrinology* 140, 2054–2062.
- Wilson, R.P., 1994. Amino acid requirements of finfish. In: D'Mello, J.P.F. (Ed.), *Amino Acids in Farm Animal Nutrition*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 377–399.
- Yamamoto, T., Unuma, T., Akiyama, T., 2000. The influence of dietary protein sources on tissue free amino acid levels of fingerling rainbow trout. *Fish. Sci.* 66, 310–320.
- Yokoyama, M.J., Nakazoe, I., 1992. Accumulation and excretion of taurine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets supplemented with methionine, cystine and taurine. *Comp. Biochem. Physiol.* 102A, 565–568.



Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)

A. Sitjà-Bobadilla^{a,*}, S. Peña-Llopis^a, P. Gómez-Requeni^a,
F. Médale^b, S. Kaushik^b, J. Pérez-Sánchez^a

^a*Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Torre de la Sal s/n, 12595 Ribera de Cabaes, Castellón, Spain*

^b*Fish Nutrition Research Laboratory, Unité Mixte INRA-IFREMER, 64310 St.-Pée-sur-Nivelle, France*

Received 3 December 2004; received in revised form 22 March 2005; accepted 23 March 2005

Abstract

Partial or total replacement of fish meal by a mixture of plant protein (PP) sources (corn gluten, wheat gluten, extruded peas, rapeseed meal and sweet white lupin) balanced with indispensable amino acids was examined in juvenile gilthead sea bream over the course of a 6-month growth trial. A diet with fish meal (FM) as the sole protein source was compared to diets with 50%, 75% and 100% of replacement (PP50, PP75, and PP100). The possible influence of diets on growth performance, plasma metabolites, gut integrity, liver structure, anti-oxidant and immune status was evaluated. Final body weight was progressively decreased with PP inclusion, but in PP50 and PP75-fed fish, feed efficiency (FE) was significantly improved and specific growth rates remained unchanged or slightly reduced in comparison to fish fed the FM diet. In fish fed PP100 diet, FE remained unchanged and feed intake and growth decreased dramatically. In this group of fish, liver fat deposition was also largely increased, enterocytes showed an increased number of lipidic vacuoles and/or deposition of protein droplets, and the submucosa of intestine was dilated/hypertrophied and infiltrated with eosinophilic granular cells. Plasma glucose levels did not differ among the four groups, but a significant and progressive decrease of plasma cholesterol and plasma protein levels was found with FM replacement. The glutathione redox status in blood and liver increased with the increase of PP content and this increment was statistically significant in the liver of the three PP-fed groups. Glutathione reductase and γ -glutamyl transferase were also enhanced by PP inclusion. Plasma lysozyme levels were not altered by the dietary treatment, but respiratory burst of head kidney leucocytes and plasma myeloperoxidase values were significantly increased in PP75 and PP100 fish, respectively. Complement (ACH₅₀) was significantly increased in PP50 fed fish and decreased in PP75 and PP100 groups. As a general conclusion, substitution of FM by a mixture of PP sources exerted an

* Corresponding author. Tel.: +34 964319500; fax: +34 964319509.

E-mail address: ariadna@iats.csic.es (A. Sitjà-Bobadilla).

anti-oxidative effect, compromised growth performance only at the 100% level, and decreased one of the immune defence mechanisms at above 75% level.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Fish meal; Plant proteins; Growth; Immune response; Respiratory burst; Lysozyme; Complement; Myeloperoxidase; Histopathology; Glutathione; Cholesterol; Gilthead sea bream

1. Introduction

In the last decade the increasing demand, price and world supply fluctuations of fish meal (FM) has emphasized the need to look for alternative protein sources in aquafeeds. Much attention has been focused on plant proteins (PP), although their use is limited by deficiencies in essential amino acids and minerals, and the presence of antinutritional factors (ANFs) and complex carbohydrates (NRC, 1993; Vielma et al., 2003). Certain constituents of plants (mainly soybean) have also been shown to have immunological activity, to act as antigens, or to produce histopathological damage in the digestive tract (Rumsey et al., 1994; Baevefjord and Krogdahl, 1996; Krogdahl et al., 2003). In addition, several plants contain phenolic compounds with potent antioxidant activities, which have been associated with beneficial health effects in humans (Adom and Liu, 2002), and the glutathione redox status, considered an index of the cellular redox status and a biomarker of oxidative damage, has been used to assess their antioxidant activity.

Previous studies in gilthead sea bream have shown that partial replacement of FM by PP is possible (Robaina et al., 1995; Kissil et al., 2000; Pereira and Oliva-Teles, 2002, 2003). In a short-term trial (3 months), we also explored the possibility of total and graded replacement of FM by a mixture of PP supplemented with indispensable amino acids (Gómez-Requeni et al., 2004). In this first approach, growth performance, amino acid utilisation and somatotrophic axis responsiveness were analysed. In the current study, the effect of feeding with FM-replaced diets was evaluated at a longer term not only on the basis of growth performance but also on terms of gut integrity, liver structure, and anti-oxidant and immune status.

2. Materials and methods

2.1. Diets, experimental design and sampling

Juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) were obtained from a South Atlantic fish farm (CUPIMAR, Cádiz, Spain). Fish were acclimated to laboratory conditions for 20 days before being randomly distributed into fibreglass tanks of 500-l capacity. Fish of 16–17 g initial body weight were distributed into 12 experimental tanks (500-l) in triplicate groups of 90 fish each. Water flow was 20 l/min and oxygen content of outlet water remained higher than 85% saturation. Day length and temperature increased over the course of the trial (April–Sept 2002), following natural changes at our latitude (40°5' N, 0°10' E). Seawater temperature ranged from 17 to 25 °C and water salinity was 37.5‰.

A growth trial was designed using four different diets. They were isonitrogenous and based on FM as the only protein source or a mixture of PP sources (corn gluten, wheat gluten, extruded peas, rapeseed meal and sweet white lupin), which were formulated to replace the 50% (PP50), 75% (PP75) and 100% (PP100) of FM protein. Crystalline amino acids were added to PP-based diets to achieve an equivalent indispensable amino acid profile. A Scandinavian marine fish oil was added as a major dietary lipid source to make all the diets isolipidic (Table 1). Among all of them, the ω 3 PUFA ranged from 28% to 26% of total fatty acids, EPA from 8.8% to 10.2%, and DHA from 10.6% to 12.1%. The supply of ω 6 fatty acids, especially that of 18:2n-6, was higher in PP diets (about 8 in PP100 diet against 2.2 in FM diet); similarly the level of 18:1n-9 was also higher (22% in PP100 diet) than in the FM diet (16.5%). For more details on diet composition, see Gómez-Requeni et al. (2004).

During the growth trial (6 months), each diet was randomly allocated to triplicate tanks of fish. Feed

Table 1
Ingredients and chemical composition of experimental diets

Ingredient (g/kg)	Diet			
	FM	PP50	PP75	PP100
Fish meal, LT (CP 70%)	703.7	352	176	0
Corn gluten meal	0	120	180	250
Wheat gluten	0	120	180	250
Extruded peas (Aquatex)	0	60	90	120
Rapeseed meal (Primor 00)	0	30	67.2	27.3
Sweet white lupin meal	0	0	0	6.9
Extruded whole wheat	142.0	94.9	30.6	15.5
Fish oil	124.3	141.3	149.8	158
Binder (Na alginate)	10	10	10	10
Mineral premix ^a	10	10	10	10
Vitamin premix ^a	10	10	10	10
CaHPO ₄ · 2H ₂ O (18% P)	0	6.5	30	51.1
IAA mix ^b	0	44.3	65.7	91.4
<i>Analysed composition</i>				
Dry matter (DM, %)	93.7	94.3	91.9	90.1
Crude protein (% DM)	46.1	47.5	44.8	42.8
Crude fat (% DM)	16.5	16.6	17.2	16.8
Gross energy (kJ/g DM)	20.4	21.3	21.4	21.7
IAA (% DM) ^b	24.6	25.5	25.7	24.8
DAA (% DM) ^c	23.2	21.9	22.6	23.2
IAA/DAA	1.06	1.16	1.14	1.07

^a Mineral premix and vitamin premix according to NRC recommendations.

^b Indispensable amino acids.

^c Dispensable amino acids.

was offered by hand to apparent visual satiety in two meals per day (0900 hours and 1400 hours) and feed consumption was recorded daily. Initial and final data for growth performance was obtained by sampling all the experimental fish. At the end of the growth trial, blood and tissue sampling was done from randomly selected fish. Following overnight fasting, animals were anaesthetised (3-aminobenzoic acid ethyl ester, MS 222; 100 µg/ml, Sigma) to obtain blood from caudal vessels. Some blood samples ($n=7$ /diet) were used directly for the measurement of oxidative stress metabolites and others ($n=10$ /diet) to obtain plasma after centrifugation at 3000 ×g for 20 min at 4 °C. They were stored at –30 and –80 °C until metabolite and immunological analyses were performed, respectively. After killing the fish by a blow to the head, samples of liver and dorsal portions of muscle ($n=7$ /diet) were excised and frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C prior to analyses. Liver and distal intestine ($n=7$ /diet) were also taken for histological

processing. Finally, four fish from each group were sampled for the assessment of respiratory burst activity and the myeloperoxidase (MPO) content in head kidney leucocytes. The experimental procedure complied with the current laws of Spain.

2.2. Oxidative stress and metabolite assays

2.2.1. Glutathione determinations

Blood samples were immediately deproteinised by adding 5 volumes of ice-cold 5% 5-sulfosalicylic acid to avoid auto-oxidation of reduced glutathione (GSH) and/or cleavage of glutathione by γ-glutamyl transferase (γGT) (Anderson, 1985). After centrifugation for 10 min at 20,000 ×g and 4 °C, glutathione levels were determined in the clear supernatants. Frozen liver and muscle samples were homogenised with 5 volumes of ice-cold 5-sulfosalicylic acid and further processed by sonication (Vibra-Cell, Sonics and Materials Inc., Danbury, CT, USA). Homogenates were then centrifuged as above.

For both types of samples, total glutathione content (tGSx) and oxidised glutathione (GSSG) were determined with a sensitive assay based on the recycling reaction of GSH with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) in the presence of an excess of glutathione reductase (GR) according to Baker et al. (1990). Measurements were made in a microplate reader as previously described (Peña-Llopis et al., 2001). Reduced and oxidised glutathione ratios were calculated as follows: $GSH/GSSG = (tGSx - GSSG) / (GSSG/2)$.

Glutathione-protein mixed disulfides (GSSP) in muscle and liver were measured according to the method of Rossi et al. (1995). GSSP levels were expressed as nanomole of GSx per milligram of protein.

2.2.2. Enzyme kinetic assays

Liver and muscle tissues were homogenised with 5 or 4 volumes of Henriksson stabilising medium as described elsewhere (Peña-Llopis et al., 2003a). Homogenates were centrifuged at 20,000 ×g for 20 min at 4 °C. The resulting supernatants were diluted with buffer and assayed rapidly for enzyme activities.

Glutathione reductase (EC 1.6.4.2) activity was monitored by measuring the increase of absorbance values (415 nm) with a reference wavelength of 595 nm

(Cribb et al., 1989). The final concentrations of 0.075 mM DTNB, 0.1 mM NADPH, and 1 mM GSSG were used according to Smith et al. (1988). γ GT (EC 2.3.2.2) activity was determined by the method of Silber et al. (1986). The rate of the substrate analogue γ -glutamyl-*p*-nitroanilide cleavage to form *p*-nitroaniline (pNA) by transfer of a glutamyl moiety to glycylglycine was monitored at 405 nm for at least 10 min.

A calibration curve of known activities of purified enzymes was used on every 96-well plate. Glutathione reductase (type III) from baker's yeast and γ GT (type I) from bovine kidney were used as standards, whose activities were determined in quartz cuvettes using a Hitachi U-2001 UV/Vis spectrophotometer (Hitachi Instruments Inc., San Jose, CA, USA). A molar absorption coefficient at 412 nm of 14.150 was used for the dianion of DTNB (TNB²⁻) as per Riddles et al. (1979). Specific enzyme activities were expressed as nanomoles of substrate hydrolysed per minute and per milligram of protein (mU/mg prot).

2.2.3. Protein determination and plasma metabolite assays

Protein content of plasma and tissue homogenates was determined by the Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany) based on the Bradford dye-binding procedure, using bovine serum albumin as standard.

Plasma glucose, triglycerides and cholesterol were determined spectrophotometrically using commercial kits Sigma 315-100, Sigma 337-B and Sigma 401-25P, respectively (Sigma, Madrid, Spain).

2.3. Histology

The occurrence of possible histopathological damages was studied in liver and posterior gut. Tissue biopsies taken from a given part of the organ were fixed in 10% buffered formalin, embedded in Technovit-7100 resin (Kulzer, Heraeus, Germany), and stained with toluidine blue (TB) or hematoxylin and eosin (H and E) after thin sectioning (1–3 μ m).

2.4. Immunological assays

2.4.1. Plasma lysozyme

Plasma lysozyme activity was measured by a turbidimetric assay (Ellis, 1990) adapted to 96-well

microplates. Briefly, lyophilized *Micrococcus lysodeikticus* (0.3 mg/ml) (Sigma) in 0.05 M sodium phosphate buffer at pH 6.2 was used as a substrate for the plasma lysozyme. Triplicates of test plasma (diluted 1:2, 10 μ l) were added to 200 μ l of the bacterial suspension and the reduction in absorbance at 450 nm was measured after 0.5 and 4.5 min. A unit of lysozyme activity was defined as the amount of enzyme that caused a decrease in absorbance of 0.001 per min.

2.4.2. Plasma complement

The lysis by the alternative complement pathway (ACP) was determined as in Sitjà-Bobadilla et al. (2003), with some modifications. Briefly, sheep red blood cells (SRBC) obtained from sheep defibrinated blood (Biomedics, Madrid, Spain) were used as targets at a final concentration of 2.5×10^8 cells/ml. Triplicates of tested plasma (100 μ l) diluted in HBSS–EGTA (Hank's Balanced Salt Solution plus 10 mM Mg²⁺ and 10 mM ethylene glycolbistetra-acetate (EGTA), pH 7.6) were mixed with 25 μ l of SRBC in 96-well plates. Plates were incubated for 100 min at 20 °C with constant shaking and then centrifuged to spin down the remaining SRBC. The absorbance of the supernatant was read at 415 nm. The value *Y* (percentage of SRBC lysed at each dilution) was defined as in Sunyer and Tort (1995). The plasma dilution factor, *X*, was plotted in logarithmic form against *Y*, using the Von Krogh equation as $\log X$ versus $\log Y/(1 - Y)$. The dilution corresponding to 50% haemolysis/ml was expressed as ACH₅₀.

2.4.3. Myeloperoxidase (MPO) content

Total MPO content in plasma and head kidney leucocytes was measured following the procedure described by Quade and Roth (1997) adapted to gilthead sea bream by Cuesta et al. (2002), with some modifications. Fifteen microliters of plasma were mixed with 135 μ l of HBSS-plus (pH 7.2, HBSS without Ca²⁺ and Mg²⁺ with 0.1% NaCl) and an antimycotic/antibiotic mixture (100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 0.25 μ g/ml amphotericin B) in flat-bottomed 96-well plates (Nunc) and 50 μ l of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine hydrochloride (TMB, BioRad) were added. After 2 min of incubation, the reaction was stopped with 25 μ l of 1 N H₂SO₄ and the optical density was read at 450 nm. Wells in which no

plasma was added were run as blanks. Three replicate wells were run for each fish.

Head kidney leucocyte suspensions were initially obtained as in [Calduch-Giner et al. \(1997\)](#) with some modifications. Briefly, after the second sedimentation, the pellet which was enriched in granulocytes (mainly eosinophiles) was adjusted to 20×10^6 cells/ml in HBSS-plus. The MPO content was determined after incubation of the leucocyte suspension (25 μ l) with 125 μ l of the detergent cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (0.02% in water). After 15 min of incubation at 22 °C with constant shaking, TMB (diluted 1:4) and 1 N H₂SO₄ were added as above. After centrifugation of the plates (400 g for 10 min), 150 μ l of supernatants were transferred to new 96-well plates and read as above. The blank was obtained from wells to which no cells were added. Appropriate controls were included to monitor the degree of spontaneous degranulation of leucocytes. Three replicate wells were run for each fish.

2.4.4. Respiratory burst activity

Enriched leucocyte preparations from head kidney were obtained using the procedure described by [Muñoz et al. \(1998\)](#). Cells were adjusted to 20×10^6 cells/ml in L-15 medium (Leibovitz medium, supplemented with 0.1% NaCl; BioWhittaker) and plated in 96-well plates at 50 μ l per well. The production of superoxide anion by leucocytes was measured by the nitroblue tetrazolium (NBT) method, as adapted by [Muñoz et al. \(2000\)](#). Briefly, cells were incubated with 50 μ l of NBT solution (2 mg/ml, Sigma) or with 50 μ l of NBT solution plus phorbol myristate acetate (PMA, 2 μ g/ml, Sigma) for 1 h at 22–24 °C in a humid chamber. Three replicate wells per fish were run and the reaction was stopped by fixing the cells in methanol. After washing twice with 70% methanol, the wells were air-dried and the resulting insoluble formazan was dissolved by adding 120 μ l 2 M KOH and 140 μ l dimethyl sulphoxide (Sigma). The absorbance was determined at 620 nm.

2.5. Statistics

One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls test or by Dunn's method was used to compare means of the four different groups. The significance level was set at $P < 0.05$.

Pearson correlation coefficients between the different variables and the percentage of plant content in diets were calculated in order to measure the strength of a linear association. All the statistical analyses were performed using Sigma Stat software (SPSS Inc., Chicago, IL).

3. Results

3.1. Growth performance

Data on growth performance and liver parameters of fish fed with the four different diets are shown in [Table 2](#). Final body weight was progressively decreased with PP inclusion. However, at the end of the trial, specific growth rates (SGR) were reduced only by 2.4% and 4.2% in PP50 and PP75 groups and their feed efficiency (FE) was significantly improved in comparison to fish fed the FM diet. At the highest replacement level (100%), SGR was highly reduced (21.6%) and FE was not changed with respect to FM-fed fish. In all experimental groups, liver weight decreased with the decrease of weight gain and no significant changes in the hepatosomatic index (HSI) were found. However, a progressive and significant increase of liver-lipid deposition was found with PP supply.

3.2. Oxidative stress and plasma metabolites

Plasma glucose, cholesterol and protein values are also shown in [Table 2](#). Plasma glucose concentrations did not differ among fish fed the four diets. Cholesterol levels were significantly lower in fish fed the three plant-protein diets, with a strong linear negative correlation between both variables ($r = -0.988$, $P < 0.05$). Plasma protein content was significantly reduced in fish fed PP75 and PP100 diets and a linear negative correlation was also detected between protein concentration and PP supply ($r = -0.976$, $P < 0.05$).

Blood GSSG content decreased with the increase of dietary PP content ($r = -0.53$, $P < 0.01$) and it was significantly lower in fish fed PP100 diet ([Table 3](#)). Although the blood GSH/GSSG ratio was also correlated with the amount of PP in diets ($r = 0.47$, $P < 0.05$), there were no significant differences among

Table 2

Growth performance, liver fat content and plasma levels of glucose, cholesterol and proteins in fish fed the experimental diets

	Diet			
	FM	PP50	PP75	PP100
Initial body weight (g)	16.4 ± 0.07	16.7 ± 0.11	16.5 ± 0.19	16.4 ± 0.24
Final body weight (g)	200.5 ± 2.3 ^d	190.9 ± 1.4 ^c	181.4 ± 1.3 ^b	123.7 ± 1.5 ^a
Feed intake (g DM/fish)	238.8 ± 5.4 ^d	184.5 ± 1.8 ^c	168.7 ± 1.9 ^b	127.9 ± 1.1 ^a
SGR (%)*	1.66 ± 0.02 ^c	1.62 ± 0.01 ^{b,c}	1.59 ± 0.01 ^b	1.30 ± 0.03 ^a
FE**	0.85 ± 0.01 ^a	0.95 ± 0.03 ^b	0.98 ± 0.01 ^b	0.84 ± 0.04 ^a
Liver weight (g)	3.08 ± 0.23 ^b	2.89 ± 0.21 ^b	2.16 ± 0.16 ^{a,b}	2.01 ± 0.20 ^a
HSI (%)***	1.61 ± 0.08	1.53 ± 0.07	1.35 ± 0.07	1.56 ± 0.11
Liver fat (% wet matter)	7.09 ± 0.65 ^a	7.46 ± 0.13 ^a	9.85 ± 1.25 ^a	14.3 ± 1.50 ^b
<i>Plasma metabolites</i>				
Glucose (mg/dl)	59.6 ± 2.8	64.8 ± 3.9	63.1 ± 5.1	62.9 ± 3.7
Cholesterol (mg/dl)	328.4 ± 20.1 ^d	243.8 ± 11.4 ^c	170.2 ± 9.6 ^b	94.9 ± 6.2 ^a
Protein (mg/ml)	53.7 ± 1.4 ^b	48.1 ± 2.7 ^b	39.9 ± 1.4 ^a	36.9 ± 1.1 ^a

Tank average values of fish weight and feed intake (means ± S.E.M.) were used as experimental units for the statistical analysis of growth performance. Liver weight and liver lipid content (means ± S.E.M.) were calculated from 10–12 fish.

Means in the same line not sharing a common superscript letter are significantly different ($P < 0.05$).

* Specific growth rate = $[100 \times (\ln \text{ final fish wt.} - \ln \text{ initial fish wt.})] / \text{days}$.

** Feed efficiency = wet wt. gain / dry feed intake.

*** Hepatosomatic index = $(100 \times \text{liver wt.}) / \text{fish wt.}$

Table 3

Glutathione levels in blood, liver and white muscle and activities of glutathione reductase and γ -glutamyl transferase in liver and white muscle of fish fed the four experimental diets

		Diet			
		FM	PP50	PP75	PP100
<i>Glutathione</i>					
Blood	GSH ($\mu\text{mol/L}$)*	537 ± 28	466 ± 31	485 ± 34	449 ± 31
	GSSG ($\mu\text{mol/L}$)**	67 ± 7 ^b	49 ± 6 ^{a,b}	48 ± 4 ^{a,b}	44 ± 5 ^a
	GSH/GSSG	16 ± 1.1	19 ± 1.1	20 ± 1.0	21 ± 1.8
Liver	GSH (nmol/g wet wt.)	2994 ± 247	3315 ± 222	3189 ± 227	2676 ± 240
	GSSG (nmol/g wet wt.)	40 ± 5.4 ^b	27 ± 2.9 ^a	25 ± 1.1 ^a	22 ± 3.2 ^a
	GSH/GSSG	163 ± 22 ^a	254 ± 21 ^b	254 ± 19 ^b	256 ± 27 ^b
	GSSP (nmol/mg prot)***	8.3 ± 1.6	6.2 ± 0.3	7.7 ± 0.8	5.3 ± 0.8
Muscle	GSH (nmol/g wet wt.)	126 ± 6 ^a	154 ± 15 ^{a,b}	172 ± 13 ^b	145 ± 9 ^{a,b}
	GSSG (nmol/g wet wt.)	5.7 ± 0.4	7.1 ± 1.3	7.0 ± 1.1	7.1 ± 1.2
	GSH/GSSG	46 ± 4	47 ± 5	58 ± 11	50 ± 9
<i>Glutathione reductase (GR)</i>					
Liver	(mU/mg protein)	7.8 ± 0.4 ^a	8.2 ± 0.3 ^a	9.0 ± 0.5 ^a	10.2 ± 0.5 ^b
Muscle	(mU/mg protein)	2.68 ± 0.13 ^a	2.86 ± 0.08 ^a	3.26 ± 0.12 ^b	3.54 ± 0.17 ^b
<i>γ-Glutamyl transferase (γGT)</i>					
Liver	(mU/mg protein)	0.69 ± 0.09 ^{a,b}	0.51 ± 0.06 ^a	0.89 ± 0.10 ^{b,c}	1.15 ± 0.15 ^c
Muscle	(mU/mg protein)	0.055 ± 0.002 ^a	0.063 ± 0.004 ^{a,b}	0.072 ± 0.004 ^b	0.060 ± 0.007 ^{a,b}

Values (means ± S.E.M.) in the same line not sharing a common superscript letter are significantly different ($P < 0.05$).

* Glutathione reduced form.

** Glutathione disulphide (oxidised form).

*** Glutathione-protein mixed disulphide.

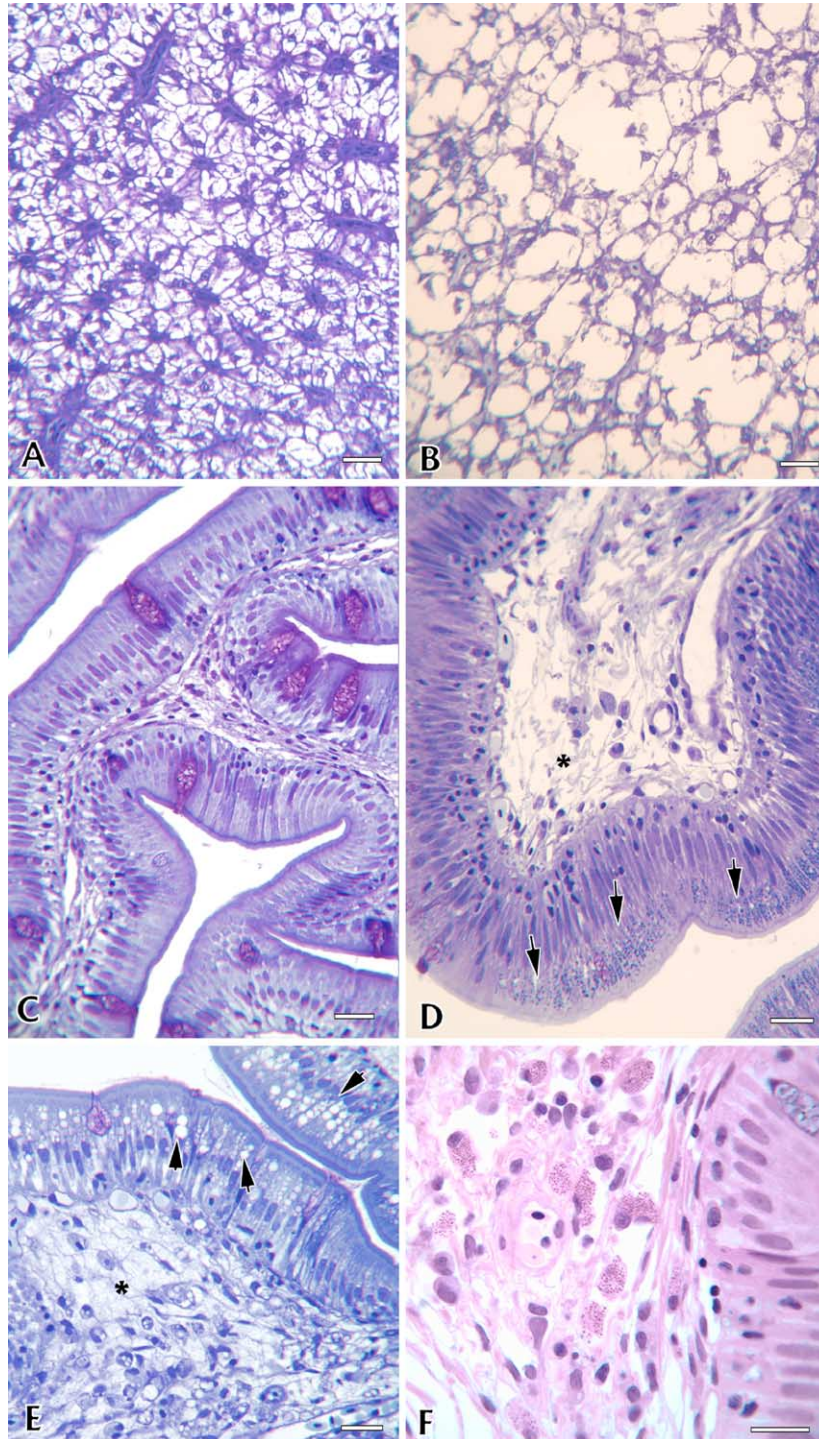


Fig. 1. Histological sections of gilthead sea bream fed with FM (A, C) or PP100 (B, D, and E) diets. Notice the difference between normal (A) and steatotic (B) liver. Normal distal intestine (C) differs from intestines with supranuclear deposition of protein droplets (arrow, D), lipidic vacuolisation (arrow, E), and dilated/hypertrophied submucosa (*D, E), with eosinophilic infiltration (F). Stainings: toluidine blue (A–E), H and E (F). Bars=20 μ m.

groups. Fish fed the four diets showed no differences in hepatic GSH levels, whereas muscular GSH content was significantly higher in PP75-fed fish than in the other groups. The content of GSSG in liver was significantly lower in fish fed the three PP diets than in those fed the FM diet and it was negatively correlated with the percentage of plant substitution ($r = -0.59$, $P < 0.001$). This decrease in the hepatic GSSG content significantly increased the GSH/GSSG ratio in fish fed plant-containing diets and the resulting hepatic glutathione redox status was positively correlated with FM replacement ($r = 0.52$, $P < 0.01$). There were no significant changes neither in glutathione redox status in muscle nor in hepatic GSSP levels among groups (Table 3).

Hepatic GR activity was significantly increased in PP100-fed fish (Table 3), whereas GR activity in muscle was significantly higher in fish fed PP100 and PP75 diets. In both tissues, GR activity was strongly associated with the percentage of plant content in diets ($r = 0.62$ and 0.69 , respectively, $P < 0.001$). In addition, γ GT activity in the liver was significantly higher in PP100-fed fish and a correlation between hepatic γ GT activity and the percentage of plant content was found ($r = 0.48$, $P < 0.05$). γ -Glutamyl transferase activity in the muscle was significantly higher in fish fed PP75 diet and the lowest value was found in FM-fed fish, showing a similar pattern to muscular GSH levels.

3.3. Histological study

The liver structure was very similar in FM, PP50 and PP75 fish (Fig. 1A), but it showed a marked lipid accumulation in PP100-fed fish, which in some cases led to steatosis (Fig. 1B), with some aggregates of macrophages surrounding pancreatic acini. In all the fish, the villous tips and the brush border appear normal and intact, without sloughing of the mucosa into the gut lumen (Fig. 1C). Nevertheless, in fish fed the three PP diets there was an increase in the number of fat vacuoles within the enterocytes and supra-nuclear deposition of protein droplets, which was most obvious in PP100-fed fish (Fig. 1D and E, respectively). However, such accumulation did not produce damage to the architecture of the gut epithelium, with no apparent signs of necrosis or cellular degeneration. In all the PP-fed fish, the

architecture of the submucosa was dilated and/or hypertrophied, with connective tissue forming loose layers (Fig. 1D and E), frequently with cell infiltration (eosinophilic granular cells, mainly) (Fig. 1F), which was more obvious in PP100-fed fish.

3.4. Immunological indicators

Data on plasma lysozyme and complement activity are shown in Fig. 2. Lysozyme levels were not altered by dietary treatment. By contrast, ACH_{50} was increased in PP50 fed fish and significantly decreased in PP75- and PP100-fed fish. MPO content in head kidney leucocytes remained almost unaltered in the four groups (Fig. 3A). However, MPO values in plasma increased progressively with the degree of FM

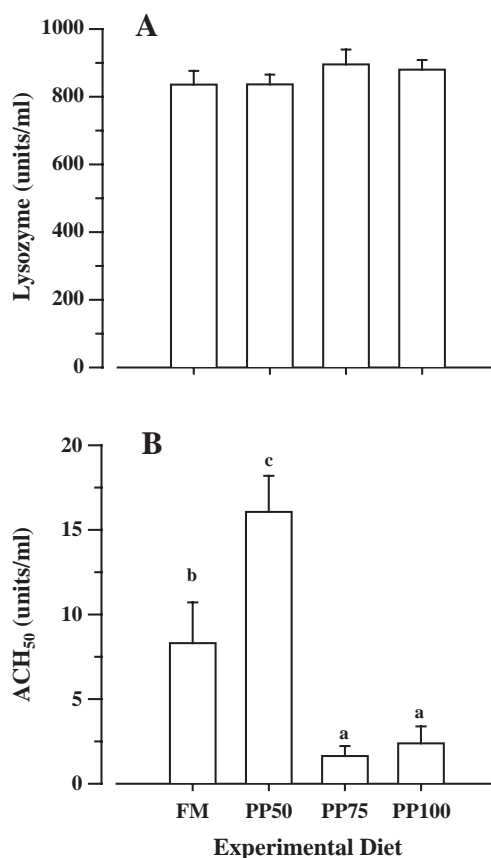


Fig. 2. Plasma lysozyme (A) and complement alternative pathway activity (ACH_{50}) (B) in the four experimental groups. Each bar represents mean \pm S.E.M. Different letters stand for statistically significant differences at $P < 0.05$.

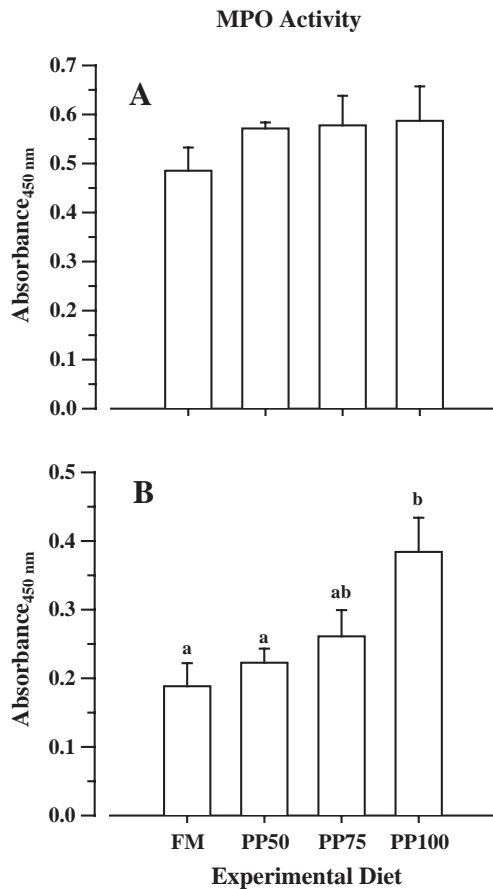


Fig. 3. Myeloperoxidase activity in head kidney leucocytes (A) and plasma (B) in gilthead sea bream fed with the four experimental diets. Each bar represents mean \pm S.E.M. Different letters stand for statistically significant differences at $P < 0.05$.

replacement, being significantly higher in PP100-fed fish (Fig. 3B). Concerning the cellular immune effectors, the respiratory burst activity of head kidney leucocytes after PMA stimulation was significantly higher in PP75-fed fish than in FM-fed fish and no significant changes were found among the other experimental groups (Fig. 4).

4. Discussion

In recent years, a significant amount of research has been conducted on the replacement of FM by different PP. The suitability of this replacement in terms of growth performance has resulted to be highly

variable among fish species and experimental conditions. Thus, specific trials have to be performed for each species. In European sea bass (Kaushik et al., 2004) and gilthead sea bream (Pereira and Oliva-Teles, 2003; Gómez-Requeni et al., 2004), recent short-term studies have shown that at least 60–75% of FM can be replaced by mixtures of PP without compromising growth performance. In the present study, the effects of FM replacement were studied not only on growth performance but also on the antioxidant and non-specific immune status. In this scenario, a high level of FM replacement (50–75%) produced a slight reduction in growth, but a marked decrease of feed intake and weight gain was registered with the total replacement. Moreover, when PP75 and PP100 diets were used through the entire productive cycle (12 months up to market size), some kind of compensatory growth was found in finishing fish when they were fed the PP75 diet and their final body weight was undistinguishable from that of FM fed fish. However, this condition was not found in fish fed the PP100 diet and their reduced growth performance was even exacerbated over the course of time (unpublished results).

In the present work, histological evaluation of tissues also revealed a marked dilation of the gut submucosa and liver steatosis only in PP100-fed fish.

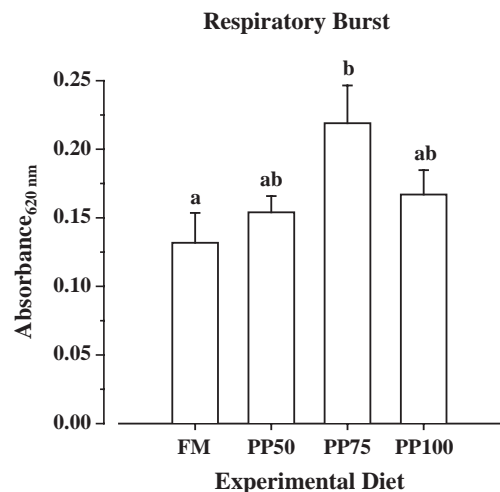


Fig. 4. Respiratory burst activity of head kidney leucocytes of gilthead sea bream fed with the four experimental diets. Each bar represents mean \pm S.E.M. Different letters stand for statistically significant differences at $P < 0.05$.

The lipid accumulation in enterocytes did not lead to desquamation and degeneration of the epithelium, as in previous studies in gilthead sea bream fed different lipid sources (Caballero et al., 2003) or a commercial diet to visual satiety (Sitjà-Bobadilla et al., 2003). The infiltration of granular eosinophilic cells in the gut submucosa found in the current study is similar to that induced by soybean in Atlantic salmon, but other features of the typical enteritis (Baeverfjord and Krogdahl, 1996) were not observed. In Atlantic salmon also, soybean meal produced a decrease in mucosal enzymes, which were coincidental with an impaired feed conversion (Krogdahl et al., 2003). In our case, however, FE was enhanced or remained unaltered in fish fed PP diets, which would reflect the use of different mixtures of PP and/or changes in fish species susceptibility to PP supply.

The possible adverse effects of dietary manipulations on the immune response of fish have also been studied (Waagbø, 1994; Fletcher, 1997; Kiron et al., 2004), but most of the research has focused on salmonids. The suppression of the non-specific immune capacity by high concentrations of dietary soybean proteins has been reported in rainbow trout (Burrells et al., 1999). However, other reports using soybean in rainbow trout (Rumsey et al., 1994) and Atlantic salmon (Krogdahl et al., 2000) or alginate in Atlantic salmon (Gabrielsen and Austreng, 1998) have shown increased values of different non-specific immune mechanisms, which have been interpreted as inflammatory/hypersensitivity or immunostimulating effects. In gilthead sea bream, several authors have also studied the effect of different dietary and feeding regime manipulations on the immune or the antioxidant status, but none has addressed the possible effects of FM replacement by PP on both types of variables.

In the current work, we have focused on several indicators of the cellular and humoral innate immunity, which has been shown to be the first line of defence of fish before a specific immune response is mounted (Fletcher, 1982; Dalmo et al., 1997). In this regard, it must be noted that leucocyte intracellular killing activity was increased, as indicated by both the higher oxidative radical production (with a peak at PP75 diet) and the higher MPO content in plasma (with a peak at PP100). These two indicators were also enhanced in rainbow trout fed soybean protein

(Rumsey et al., 1994). In previous gilthead sea bream studies, the respiratory burst activity was significantly enhanced by different dietary surpluses (Mulero et al., 1998; Castro et al., 1999; Ortuño et al., 1999, 2001, 2002; Cuesta et al., 2002; Rodríguez et al., 2003). On the contrary, leucocyte and serum MPO followed variable changes depending on the dietary manipulation, the dose and the timing (Cuesta et al., 2002; Ortuño et al., 2002; Rodríguez et al., 2003). In our work, MPO values were significantly enhanced in plasma of fish fed PP100 diet, but not in head kidney leucocytes. These higher plasma MPO levels could be due to a higher number of circulating leucocytes (granulocytes, mainly), which agrees with the infiltration of the intestinal submucosa with eosinophilic granular cells. However, this increase could have been masked in the head kidney leucocyte MPO assay, as the number of cells per well was equally adjusted for all the groups.

Other health indicators had different variations: plasma lysozyme did not vary significantly among groups, but plasma complement was markedly enhanced in PP50 fish and reduced in fish fed PP75 and PP100 diets. In trout, equivalent diets also produced a significant decrease in ACH₅₀ in PP100 fish (unpublished data). The increase in PP50 fish could be explained by a stimulation of complement production, which seems to be completely overwhelmed with higher PP inclusion levels. In mammals, it is well established that hepatocytes are the main source of the C3 component and it has recently been shown that this is also the case for some fish (Abelseth et al., 2003). Thus, the progressive fat degeneration of liver (steatosis) with the PP inclusion could have produced a decrease in complement production, which is in agreement with the observed decrease of total plasma protein levels. In addition, some of the plant components (hydroxyl or amine groups of carbohydrates or proteins) could have produced a massive consumption of complement through the activation of the alternative pathway. Some authors have found no effect in haemolytic activities after FM replacement by alginates (Gabrielsen and Austreng, 1998), but complement levels have been reported to be increased in gilthead sea bream after different dietary treatments (Mulero et al., 1998; Montero et al., 1999; Ortuño et al., 1999, 2000, 2001). On the contrary, feeding a diet containing 60%

soybean oil for 204 days (Montero et al., 2003) produced a significant decrease in the haemolytic activity.

PP inclusion in gilthead sea bream diet also had effects on several of the studied metabolic and antioxidant factors, which could be considered beneficial. Most of these effects have also been found in mammals and have been associated to the presence of various classes of phenolic compounds, composed principally by ferulic acid and flavonoids, which have potent antioxidant activities associated with beneficial health effects (Adom and Liu, 2002; Bub et al., 2003). In addition, flavonoids include antiinflammatory, antiallergic, antiviral, and anticarcinogenic properties (Nijveldt et al., 2001).

The observed marked hypocholesterolemic effect agrees with the results obtained in a shorter trial in gilthead sea bream using the same diets (Gómez-Requeni et al., 2004) and also with data from other teleosts using different PP (Kaushik et al., 1995, 2004; Regost et al., 1999). Both in mammals and humans, different plant constituents have been reported to lower plasma cholesterol levels (Wester, 2000). Although cholesterol metabolism in mammals and fish could differ, the fish hypocholesterolemia in response to dietary PP supply could be due either to an increased excretion of bile salts, to an inhibition of cholesterol intestinal absorption, or just to the withdrawal of FM rather than to the direct effects of PP (Kaushik et al., 2004). The decrease of liver and muscle taurine levels found by Gómez-Requeni et al. (2004) would reinforce the first possibility. In any case, the significance of hypocholesterolemia in fish should be studied in depth.

From our results it appears conclusive that PP replacement enhances the glutathione metabolism and therefore the antioxidant defences. In liver and blood, this was evident by the increase of the GSH/GSSG ratio in a dose-dependent manner with PP increment. This ratio is considered an index of the cellular redox status and a biomarker of oxidative damage. This enhanced ratio could be due to the different enzymatic reactions involved in the glutathione balance: GSH synthesis, GSH oxidation, GSH conjugation, cleavage of GSH-conjugates and GSSG reduction by GR (Meister and Anderson, 1983). The obtained data seem to indicate that the increased activity of GR could be responsible for the decrease of blood and

liver GSSG levels. In addition, as glutathione levels in muscle depend largely on GSH capture from plasma by γ GT (Griffith and Meister, 1979), PP75-fed fish presented the highest GSH levels in muscle because they had the highest muscular γ GT levels.

This higher antioxidant activity could be due to some of the plant constituents. Appelt and Reicks (1999) found higher antioxidant activities in rats fed the high isoflavone diet compared to those fed the casein diet and Guo et al. (2002) demonstrated in vitro a higher antioxidant activity for the main flavonoids present in soy. However, the content of flavonoids in the plant mixture used in the current work is most probably low as no soybean meal was used in its formulation. Thus, other plant constituents, such as phenolic compounds (Dragsted, 2003), could have been involved, or just the lack of FM could have invoked the achieved results. In fish, the information regarding the relationship between fish nutrition and the antioxidant status is limited. Mourente et al. (2002) showed that in gilthead sea bream, dietary oxidised oils affected the activities of liver antioxidant defence enzymes, but these effects were partially restored by vitamin E. Pascual et al. (2003) also found significant increases in SOD, GR, and glutathione peroxidase activity in gilthead sea bream in parallel to food restriction. In rainbow trout, the total hepatic glutathione, when calculated based on the total body weight, was appreciably higher in fish fed a high-protein diet in comparison to those fed a low-protein diet (Yokoyama and Nakazoe, 1991).

Thus, the effects are complex. On the one hand, plant-containing diets increased muscular GSH, the hepatic glutathione redox status, and antioxidant enzyme activities as well as plasma MPO content and respiratory burst activity. This enhanced status could be useful to combat the oxidation of PUFA (Bell and Cowey, 1985), the nitrosative stress (Saeij et al., 2003), the oxidative stress generated by food deprivation (Pascual et al., 2003), infections (Belló et al., 2000), solar UV radiation in cage farms (Zagarese and Williamson, 2001) and chemical contaminants (Peña-Llopis et al., 2003b), as well as to increase resistance to infections. In fact, other authors have found increased resistance to bacterial infections in association to increased phagocyte activity in gilthead sea bream (Mulero et al., 1998) and this increment is generally considered as an

indicator of immunostimulation (Secombes, 1994). Nevertheless, this overactivation of leucocytes could invoke a subsequent peroxidative damage produced by the release of excessive reactive oxygen species, as shown by some authors (Ahmad et al., 2004) but, in our case, this production seems to have been counteracted by the increased activity of antioxidant enzymes. On the other hand, the lower complement levels found in our study are most probably negative for the fish. In gilthead sea bream, low complement levels, together with the depletion of other non-specific factors, have been associated with winter disease syndrome and higher susceptibility to diseases (Tort et al., 1998).

The interpretation of the current results is complex since the inclusion of PP in the diets implies indefectibly the addition of a certain amount of vegetable oils and, therefore, the PP diets used in the current work had a higher amount of $\omega 6$ and $\omega 9$ fatty acids than FM diet. Besides, the substitution of FM from the diets also implied the retrieval of the accompanying fish oils and, therefore, fish oils had to be added to PP diets in order to keep them isolipidic. Thus, we cannot discard the possibility that some of the results obtained in the current study could be due to this fact, besides the blend of plant proteins used. Nevertheless, the essential fatty acid (EPA/DHA) levels were far higher than those required for marine teleosts in all the diets and none of them were deficient. Only studies using semi-purified diets with different $\omega 3$ and $\omega 6$ levels can throw light on this matter.

In any case, total FM replacement is clearly not feasible due to the marked impairment of growth performance, but lower PP inclusion levels could be considered viable. The lower reduction of the final weight registered in PP50 and PP75 groups could be solved when the diets are applied along an entire production cycle. In addition, the values obtained for SGR, FE, immune and anti-oxidant status suggest that PP inclusion could be considered viable for gilthead sea bream at least at 50%. Further studies (including the study of specific immune indicators and challenges with pathogens) are needed in order to assess whether this overall immunostimulated status of PP50 fish can improve resistance to diseases and whether PP75 fish are in fact immunosuppressed due to the lower complement activity.

Acknowledgements

This study was funded by the European Union through the research project Q5RS-2000-30068: "Perspectives of Plant Protein Use in Aquaculture" (PEPPA). We are grateful to J. Monfort for the histological processing and to M.C. Fabregat for the care and maintenance of fish.

References

- Abelseth, T.K., Stensvag, K., Espelid, S., Nygaard, R., Ellingsen, T., Bogwald, J., Dalmo, R.A., 2003. The spotted wolf fish (*Anarhichas minor* Olafsen) complement component C3: isolation, characterisation and tissue distribution. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 13–27.
- Adom, K.K., Liu, R.H., 2002. Antioxidant activity of grains. *J. Agric. Food. Chem.* 50, 6182–6187.
- Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A., 2004. Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 290–302.
- Anderson, M.E., 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. In: Meister, A. (Ed.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, London, pp. 548–555.
- Appelt, L.C., Reicks, M.M., 1999. Soy induces phase II enzymes but does not inhibit dimethylbenz[*a*]anthracene-induced carcinogenesis in female rats. *J. Nutr.* 129, 1820–1826.
- Baeverfjord, G., Krogdahl, A., 1996. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *J. Fish Dis.* 19, 375–387.
- Baker, M.A., Cerniglia, G.J., Zaman, A., 1990. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal. Biochem.* 190, 360–365.
- Bell, J.G., Cowey, C.B., 1985. Roles of vitamin E and selenium in the prevention of pathologies related to fatty acid oxidation in salmonids. In: Cowey, C.B., Mackie, A.M., Bell, J.G. (Eds.), *Nutrition and Feeding in Fish*. Academic Press, London, pp. 333–347.
- Belló, A.R., Fortes, E., Belló-Klein, A., Belló, A.A., Llesuy, S.F., Robaldo, R.B., Bianchini, A., 2000. Lipid peroxidation induced by *Clinostomum detrunctum* in muscle of the freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Dis. Aquat. Org.* 42, 233–236.
- Bub, A., Watzl, B., Blockhaus, M., Briviba, K., Liegibel, U., Müller, H., Pool-Zobel, B.L., Rechkemmer, G., 2003. Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage. *J. Nutr. Biochem.* 14, 90–98.
- Burrells, C., Williams, P.D., Southgate, P.J., Crampton, V.O., 1999. Immunological, physiological and pathological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary concentrations of soybean proteins. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 72, 277–288.

- Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., Kjorsvik, E., Montero, D., Socorro, J., Fernández, J.A., Rosenlund, G., 2003. Morphological aspects of intestinal cells from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture* 225, 325–340.
- Calduch-Giner, J.A., Sitjà-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P., Pérez-Sánchez, J., 1997. Growth hormone as an in vitro phagocyte-activating factor in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Cell Tissue Res.* 287, 535–540.
- Castro, R., Couso, N., Obach, A., Lamas, J., 1999. Effect of different β -glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 529–541.
- Cribb, A.E., Leeder, J.S., Spielberg, S.P., 1989. Use of a microplate reader in an assay of glutathione reductase using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.* 183, 195–196.
- Cuesta, A., Ortuño, J., Esteban, M.A., Rodríguez, M.A., Meseguer, J., 2002. Changes in some innate defence parameters of seabream (*Sparus aurata* L.) induced by retinol acetate. *Fish Shellfish Immunol.* 13, 279–291.
- Dalmo, R.A., Ingebrihtsen, K., Bogwald, J., 1997. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *J. Fish Dis.* 20, 241–273.
- Dragsted, L.O., 2003. Antioxidant actions of polyphenols in humans. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 73, 112–119.
- Ellis, A.E., 1990. Lysozyme assays. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., Van Muiswinkel, W.B. (Eds.), *Techniques in Fish Immunology*. SOS Publications, Fair Haven, NJ, pp. 101–103.
- Fletcher, T.C., 1982. Non-specific defence mechanisms of fish. *Dev. Comp. Immunol.* S2, 123–132.
- Fletcher, T.C., 1997. Dietary effects on stress and health. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Schreck, C.B. (Eds.), *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 223–244.
- Gabrielsen, B.O., Austreng, E., 1998. Growth, product quality and immune status of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed wet feed with alginat. *Aquac. Res.* 29, 397–401.
- Gómez-Requeni, P., Mingarro, M., Calduch-Giner, J.A., Médale, F., Martin, S.A.M., Houlihan, D.F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J., 2004. Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotrophic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 232, 493–510.
- Griffith, O.W., Meister, A., 1979. Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 5606–5610.
- Guo, Q., Rimbach, G., Moini, H., Weber, S., Packer, L., 2002. ESR and cell culture studies on free radical-scavenging and antioxidant activities of isoflavonoids. *Toxicology* 179, 171–180.
- Kaushik, S.J., Cravedi, J.P., Lalles, J.P., Sumpter, J., Fauconneau, B., Laroche, M., 1995. Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 133, 257–274.
- Kaushik, S.J., Covès, D., Dutto, G., Blanc, D., 2004. Almost total replacement of fish meal by plant protein sources in the diet of a marine teleost, the European seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 230, 391–404.
- Kiron, V., Puangkaew, J., Ishizaka, K., Satoh, S., Watanabe, T., 2004. Antioxidant status and nonspecific immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two levels of vitamin E along with three lipid sources. *Aquaculture* 234, 361–379.
- Kissil, G.W., Lupatsch, I., Higgs, D.A., Hardy, R.W., 2000. Dietary substitution of soy and rapeseed protein concentrates for fish meal, and their effects on growth and nutrient utilization in gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Aquac. Res.* 31, 595–601.
- Krogdahl, A., Bakke-Mckellep, A.M., Baeverfjord, G., 2000. Feeding Atlantic salmon *Salmo salar* L. soybean products: effects on disease resistance (furunculosis), and lysozyme and IgM levels in the intestinal mucosa. *Aquac. Nutr.* 6, 77–84.
- Krogdahl, A., Bakke-Mckellep, A.M., Baeverfjord, G., 2003. Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquac. Nutr.* 9, 361–371.
- Meister, A., Anderson, M.E., 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem. Allied Res. India* 52, 711–760.
- Montero, D., Marrero, M., Izquierdo, M.S., Vergara, J.M., Tort, L., 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture* 171, 269–278.
- Montero, D., Kalinowski, T., Obach, A., Robaina, L., Tort, L., Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., 2003. Vegetable lipid sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health. *Aquaculture* 225, 353–370.
- Mourente, G., Díaz-Salvago, E., Bell, J.G., Tocher, D.R., 2002. Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidised oil: attenuation by dietary vitamin E. *Aquaculture* 214, 343–361.
- Mulero, V., Esteban, M.A., Muñoz, J., Meseguer, J., 1998. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 8, 49–62.
- Muñoz, P., Calduch-Giner, J.A., Sitjà-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P., Pérez-Sánchez, J., 1998. Modulation of the respiratory burst activity of Mediterranean sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) phagocytes by growth hormone and parasitic status. *Fish Shellfish Immunol.* 8, 25–36.
- Muñoz, P., Sitjà-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P., 2000. Cellular and humoral immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) (Teleostei: Serranidae) immunized with *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporea: Bivalvulida). *Parasitology* 120, 465–477.
- National Research Council (NRC), 1993. *Nutrient Requirements of Fish*. National Academy Press, Washington, DC. (124 pp.).
- Nijveldt, R.J., Van Nood, E., Van Hoorn, D.E., Boelens, P.G., Van Norren, K., Van Leeuwen, P.A., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 418–425.

- Ortuño, J., Esteban, M.A., Meseguer, J., 1999. Effect of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune response of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 9, 429–443.
- Ortuño, J., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2000. High dietary intake of alpha-tocopherol acetate enhances the non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 10, 293–307.
- Ortuño, J., Cuesta, A., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2001. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79, 167–180.
- Ortuño, J., Cuesta, A., Rodríguez, A., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2002. Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 85, 41–50.
- Pascual, P., Pedrajas, J.R., Toribio, F., López-Barea, J., Peinado, J., 2003. Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chem.-Biol. Interact.* 145, 191–199.
- Peña-Llopis, S., Peña, J.B., Sancho, E., Fernandez-Vega, C., Ferrando, M.D., 2001. Glutathione-dependent resistance of the European eel *Anguilla anguilla* to the herbicide molinate. *Chemosphere* 45, 671–681.
- Peña-Llopis, S., Ferrando, M.D., Peña, J.B., 2003a. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by *N*-acetylcysteine. *Aquat. Toxicol.* 65, 337–360.
- Peña-Llopis, S., Ferrando, M.D., Peña, J.B., 2003b. Increased recovery of brain acetylcholinesterase activity in dichlorvos-intoxicated European eels (*Anguilla anguilla*) by bath treatment with *N*-acetylcysteine. *Dis. Aquat. Org.* 55, 237–245.
- Pereira, T.G., Oliva-Teles, A., 2002. Preliminary evaluation of pea seed meal in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquac. Res.* 33, 1183–1189.
- Pereira, T.G., Oliva-Teles, A., 2003. Evaluation of corn gluten meal as a protein source in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juveniles. *Aquac. Res.* 34, 1111–1117.
- Quade, M.J., Roth, J.A., 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58, 239–248.
- Regost, C.J., Arzel, J., Kaushik, S.J., 1999. Partial or total replacement of fish meal by corn gluten meal in diet for turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 180, 99–117.
- Riddles, P.W., Blakeley, R.L., Zerner, B., 1979. Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)—a reexamination. *Anal. Biochem.* 94, 75–81.
- Robaina, L., Izquierdo, M.S., Moyano, F.J., Socorro, J., Vergara, J.M., Montero, D., Fernández-Palacios, H., 1995. Soybean and lupin seed meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): nutritional and histological implications. *Aquaculture* 130, 219–233.
- Rodríguez, A., Cuesta, A., Ortuño, J., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2003. Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata* L.). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 96, 183–192.
- Rossi, R., Cardaioli, E., Scaloni, A., Amiconi, G., Di Simplicio, P., 1995. Thiol groups in proteins as endogenous reductants to determine glutathione-protein mixed disulphides in biological systems. *Biochim. Biophys. Acta.* 1243, 230–238.
- Rumsey, G.L., Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Bowser, P.R., 1994. Effect of soybean protein on serological response, nonspecific defense-mechanisms, growth, and protein-utilization in rainbow-trout. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 41, 323–339.
- Saeij, J.P.J., Van Muiswinkel, W.B., Van de Meent, M., Anaral, C., Wiegertjes, G.F., 2003. Different capacities of carp leucocytes to encounter nitric oxide-mediated stress: a role for the intracellular reduced glutathione pool. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 555–568.
- Secombes, C.J., 1994. Enhancement of fish phagocyte activity. *Fish Shellfish Immunol.* 4, 421–436.
- Silber, P.M., Gandolfi, A.J., Brendel, K., 1986. Adaptation of a gamma-glutamyl transpeptidase assay to microtiter plates. *Anal. Biochem.* 158, 68–71.
- Sitjà-Bobadilla, A., Mingarro, M., Pujalte, M.J., Garay, E., Alvarez-Pellitero, P., Pérez-Sánchez, J., 2003. Immunological and pathological status of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) under different long-term feeding regimes. *Aquaculture* 220, 707–724.
- Smith, I.K., Vierheller, T.L., Thorne, C.A., 1988. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.* 175, 408–413.
- Sunyer, J.O., Tort, L., 1995. Natural hemolytic and bacterial activities of seabream *Sparus aurata* serum are affected by the alternative complement pathway. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 45, 333–345.
- Tort, L., Padrós, F., Rotllant, J., Crespo, S., 1998. Winter syndrome in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Immunological and histopathological features. *Fish Shellfish Immunol.* 8, 37–47.
- Vielma, J., Koskela, J., Ruohonen, K., Jokinen, I., Kettunen, J., 2003. Optimal diet composition for European whitefish (*Coregonus lavaretus*): carbohydrate stress and immune parameter responses. *Aquaculture* 225, 3–16.
- Waagbø, R., 1994. The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a review. *Aquac. Fish. Manage.* 25, 175–197.
- Wester, I., 2000. Cholesterol-lowering effect of plant sterols. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 102, 37–44.
- Yokoyama, M., Nakazoe, J., 1991. Effects of dietary-protein levels on free amino-acid and glutathione contents in the tissues of rainbow-trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 99A, 203–206.
- Zagarese, H.E., Williamson, C.E., 2001. The implications of solar UV radiation exposure for fish and fisheries. *Fish Fish.* 2, 250–260.

Regulation of the somatotrophic axis by dietary factors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Pedro Gómez-Requeni¹, Josep Calduch-Giner¹, Silvia Vega-Rubín de Celis¹, Françoise Médale², Sadasivam J. Kaushik² and Jaume Pérez-Sánchez^{2*}

¹Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC), 12 595 Ribera de Cabanes, Castellón, Spain

²Laboratoire de Nutrition des Poissons, Unité Mixte INRA-IFREMER, 64 310 Saint-Pée-sur-Nivelle, France

(Received 3 May 2004 – Revised 7 October 2004 – Accepted 11 October 2004)

The activity of the somatotrophic axis was analysed in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed either a fishmeal-based diet (FM) or graded levels of plant proteins to replace 50 % (PP50 diet), 75 % (PP75 diet) or 100 % (PP100 diet) of the fishmeal protein. For this purpose, partial cloning and sequencing of the gene encoding rainbow trout growth hormone receptor (GHR) was first accomplished by RT-PCR, using degenerate primers based on the sequences of non-salmonid fish *GHR*. Growth rates and energy retention were lowered by the PP75 and PP100 diets and a concurrent and progressive increase in plasma levels of growth hormone (GH) was found. However, no changes in hepatic GH binding and total plasma insulin-like growth factor (IGF)-I levels were observed among the four experimental groups. This fact agrees with the lack of changes in hepatic measurements of GHR and IGF-I transcripts. No consistent changes in IGF transcripts were found in peri-visceral adipose tissue and skeletal muscle, but GHR mRNA was up-regulated in the peri-visceral adipose tissue of fish fed the PP75 and PP100 diets, which would favour the lipolytic action of GH. Two specific bands (47 and 33 kDa) of IGF-binding proteins were found in the plasma of all analysed fish, but the sum of the two integrated areas increased progressively with plant protein supply, which might reflect a reduced free IGF availability. Therefore, in our experimental model, the growth impairment could be due, at least in part, to a lowered availability of biologically active IGF (free IGF fraction) rather than to liver GH desensitization or defect in IGF synthesis and release at the systemic and/or paracrine–autocrine level.

Rainbow trout: Plant proteins: Growth hormone: Growth hormone receptor: Insulin-like growth factor

Growth hormone (GH) plays a central role as a pluripotent endocrine regulator of physiological functions in fish and higher vertebrates (Björnsson, 1997; Pérez-Sánchez, 2000). In mammals, it is now recognized that this pituitary hormone exerts its action by direct interaction with a GH receptor (GHR) on the cell membrane of target tissues, triggering a phosphorylation cascade for signalling and gene expression (Behncken & Waters, 1999; Zhu *et al.* 2001). Transmission of the intracellular GHR signal remains unexplored in fish, although this receptor has been cloned and sequenced from several fish species including the goldfish (*Carassius auratus*; Lee *et al.* 2001), turbot (*Scophthalmus maximus*; Calduch-Giner *et al.* 2001), black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*; Tse *et al.* 2003), gilthead sea bream (*Sparus aurata*; Calduch-Giner *et al.* 2003), catfish (*Silurus meridionalis*; GenBank accession no. AY336104), Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*; GenBank accession no. AB058418), grass carp (*Ctenopharyngodon idella*; GenBank accession no. AY283778), masu salmon (*Oncorhynchus masou*; Fukada *et al.* 2004) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*; GenBank accession no. AF403539 and AF403540). Furthermore, the organization of the *GHR* gene has been elucidated in turbot and gilthead sea bream (Pérez-Sánchez

et al. 2002), and a high conservation of exon–intron boundaries through the evolution of vertebrate species has been reported despite the occurrence of an exclusive fish intron (10/10A) at the C-terminus.

The first observation in fish that shifts in GHR mRNA levels are associated with changes in growth rates has been made in gilthead sea bream, in which the hepatic expression of GHR is up-regulated during the summer growth spurt (Calduch-Giner *et al.* 2003). In this fish species, we have also found that hepatic GHR are down-regulated by the replacement of fishmeal by plant proteins, which in turn results in decreased growth and expression of hepatic insulin-like growth factor (IGF)-I (Gómez-Requeni *et al.* 2004). Currently, there are no data in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) about the effect of dietary N source on the activity and regulation of the somatotrophic axis. To address this issue, in the present work trout *GHR* was partially cloned and sequenced in order to establish the tissue-specific regulation of GHR transcripts in fish fed diets containing fishmeal or plant proteins. Further, hepatic GH binding, tissue-specific expression of IGF, and plasma levels of GH, IGF-I and IGF carriers (IGF-binding proteins, IGFBP) were analysed.

Abbreviations: GH, growth hormone; GHR, growth hormone receptor; IGF, insulin-like growth factor; IGFBP, insulin-like growth factor-binding protein; TBS, Tris-buffered saline.

* **Corresponding author:** Dr Jaume Pérez-Sánchez, fax +34 964319509, email jperez@iats.csic.es

Materials and methods

Experimental diets and feeding trial

As shown in Table 1, four diets were formulated to contain either fishmeal as the sole protein source (FM diet) or graded levels of plant proteins to replace 50% (PP50 diet), 75% (PP75 diet) or 100% (PP100 diet) of the fishmeal protein. Crystalline amino acids were added to plant protein-based diets to meet the indispensable amino acid profile. Fish oil was added to maintain the dietary crude fat content constant in all diets. To measure digestibility, 1% chromic oxide was added as an inert marker and it was determined after perchloric acid digestion (Bolin *et al.* 1952). Faeces were collected twice daily using a faecal collection apparatus (Choubert *et al.* 1982), and apparent digestibility coefficients were calculated as described elsewhere (Maynard & Loosli, 1969).

The feeding trial was performed in the experimental fish farm of INRA (Donzacq, Landes, France) under natural photoperiod. Rainbow trout of 19 g initial body weight were reared in sixteen circular 1000-litre glass-fibre tanks in groups of seventy-five fish each. Water was supplied from natural springs and its temperature ranged from 16 to 18°C over the course of the trial (21 March to 7 June).

Each experimental diet was randomly distributed by hand to quadruplicate groups of fish for 11 weeks. Feed was offered twice daily near to visual satiety and feed consumption was

recorded daily. Every 3 weeks fish were counted and group-weighted.

Whole-body composition for the calculation of retention efficiencies was determined in an initial pooled sample of fifteen fish and in pools of six fish per tank (twenty-four fish per diet) at the end of the growth trial. Specimens for body analysis were ground, and small aliquots were dried (110°C) to estimate water content. The remaining samples were freeze-dried and chemical analyses for protein, fat and ash were made following published methods (Association of Official Analytical Chemists, 1990).

Blood and tissue sampling

At the end of the growth trial and following overnight fasting, blood samples were taken from caudal vessels with heparinized syringes (twenty animals per diet). Plasma was drawn after centrifugation at 3000g for 20 min at 4°C and stored at -30°C until hormone analysis. Liver, white muscle and peri-visceral adipose tissue of twelve animals per diet were rapidly excised, frozen in liquid N₂, and stored at -80°C until use for GH-binding and real-time PCR assays.

Plasma hormone assays

Plasma GH levels were determined by a double antibody RIA using recombinant trout GH (Eurogentec, Liège, Belgium) as tracer and standard. Anti-salmon GH serum (GroPep, Adelaide, Australia) was used as a first antibody (1:25 000). A goat anti-rabbit IgG (1:20) (Biogenesis, Poole, UK) was used as precipitating antibody, and the sensitivity and mid range of the assay were 0.05 and 0.6 µg/l, respectively.

After acid-ethanol precipitation to avoid IGFBP interference, total plasma levels of IGF-I were measured by a homologous RIA based on the use of recombinant trout IGF-I (GroPep) as tracer and standard, and anti-trout IGF-I serum (GroPep; 1:16 000) as a first antibody. A goat anti-rabbit IgG (1:20; Biogenesis) was used as a precipitating antibody. The sensitivity and mid range of the assay were 0.05 and 0.8 µg/l, respectively.

Insulin-like growth factor-binding protein activity

Plasma samples were diluted 1:4 in sample buffer (10% glycerol, 12.5% Tris-OH, 2% SDS and 0.05% bromophenol blue), heated at 60°C for 15 min and immediately put in ice for 1 min. Then, 15 µl samples were electrophoresed under non-reducing conditions in a 12% separating polyacrylamide gel (SDS-PAGE) for 1 h at 200 W using a Mini-Protean II (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Gels were placed in transfer buffer (25 mM-Tris-OH, 192 mM-glycine, 20% CH₃OH; pH 8.1-8.5) for 15 min and electroblotted to Immuno-Blot PVDF membranes (Bio-Rad) at 100 W for 90 min at room temperature. Membranes were then placed in a blocking solution (5% dry non-fat milk in Tris-buffered saline (TBS): 20 mM-Tris-OH, 500 mM-NaCl, 0.05% NaN₃; pH 7.5) for 1 h at room temperature, and washed for 10 min with 0.1% Tween-20 in TBS. After this, membranes were incubated for 15 h at 4°C in the probe buffer (1% bovine serum albumin, 0.1% Tween-20 in TBS) containing [¹²⁵I]-labelled recombinant trout IGF-I (200 000 cpm/ml). The binding specificity was established by adding an excess of human IGF-I (2 µg/ml). Membranes were exposed for 6 days at -80°C to Biomax MS films (Kodak, Rochester, NY, USA). Autoradiographs were scanned with a GS-710 Cali-

Table 1. Ingredients, chemical composition and apparent digestibility coefficients (ADC) of the four experimental diets

	FM	PP50	PP75	PP100
Ingredient (g/kg)				
Fishmeal	637.9	319.0	159.5	0
Corn gluten meal	0	116.0	177.1	232.4
Wheat gluten	0	100	150	200
Extruded peas (Aquatex)	0	80.0	120.0	163.3
Rapeseed meal (Primor 00)	0	46.9	75.0	100.0
Extruded whole wheat	203.4	110.2	42.5	0
Fish oil	128.6	143.6	151.1	158.7
Binder (Na alginate)	10	10	10	10
Mineral premix*	10	10	10	10
Vitamin premix*	10	10	10	10
CaHPO ₄ ·2H ₂ O (18% P)	0	16.1	37.8	40
L-Arg	0	6.2	9.5	12.5
L-His	0	1.9	2.9	3.9
L-Lys	0	13.8	20.8	27.6
DL-Met	0	2.0	3.1	4.1
L-Trp	0	1.3	2.1	2.7
L-Thr	0	4.1	6.2	8.3
L-Ile	0	3.5	5.3	7.1
L-Val	0	4.7	7.0	9.4
Analytical composition				
DM (%)	94.4	92.2	91.5	91.6
Crude protein (% DM)	51.5	50.3	49.1	48.6
Crude fat (% DM)	19.7	19.6	19.6	19.2
Gross energy (kJ/g DM)	22.7	23.5	23.9	23.6
IAA (% DM)	22.2	22.9	22.1	23.9
DAA (% DM)	21.8	23.3	22.1	23.7
IAA:DAA	1.0	0.9	1.0	1.0
ADC values (%)				
DM	83.4	79.2	76.8	72.0
Crude protein	93.4	93.7	93.9	93.6
Crude fat	95.6	92.8	91.6	90.3
Starch	99.2	80.7	75.5	56.2
Energy	92.0	87.8	86.4	82.7

IAA, indispensable amino acids; DAA, dispensable amino acids.

* As per National Research Council (1993).

brated Imaging Densitometer (Bio-Rad), and bands quantified using Quantity-One 4.2.3 software (Bio-Rad).

Growth hormone binding

Hepatic GH binding was assayed by a radioreceptor assay (Yao *et al.* 1991), based on the use of recombinant trout GH (Eurogentec) as iodinated tracer and cold hormone to measure total and non-specific GH binding.

Partial cloning and sequencing of trout growth hormone receptor

Total liver RNA was extracted by the acid guanidium thiocyanate–phenol–chloroform method (Chomczynski & Sacchi, 1987). The purified RNA was treated with DNase I, and 2 µg were reverse-transcribed with 200 U Superscript II (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) using oligo(dT)₁₇ as anchor primer. Degenerate forward (GHR1: 5'-GGA GAC NTT YCG NTG YTG GTG GA) and reverse (GHR2: 5'-TGT CGG ACA CCT GGG CRT ARA ART C) primers for *GHR* cloning and sequencing were designed on the basis of their previous success in turbot and gilthead sea bream (Calduch-Giner *et al.* 2001, 2003). For PCR, 2 µl RT reaction were amplified with 0.2 mM each dNTP, 1 µM forward and reverse primers and 2.5 U Platinum Taq DNA Polymerase (Life Technologies) in a final volume of 50 µl of reaction buffer. After 35 cycles (94°C for 1 min, 54°C for 2 min, 72°C for 3 min), amplified fragments were run in agarose gels, and bands of interest were purified (Wizard PCR Preps; Promega, Madison, WI, USA) and sequenced by the dideoxy chain termination method (ABI PRISM dRhodamine terminator cycle sequencing kit; Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA). The resulting sequence has been submitted to the GenBank database under accession no. AF438178.

Structure and phylogenetic analysis of growth hormone receptors

Putative transmembrane regions were predicted with HMMTOP version 2.0 (<http://www.enzim.hu/hmmtop>; Tusnády & Simon, 2001). Potential N-linked glycosylation sites were determined with Gene Runner version 3.02 software (Hastings Software, Hastings, NY, USA). Protein sequence alignments were made by means of ClustalX software (Thompson *et al.* 1994). Phylogenetic comparison of protein sequences was carried out with MEGA2 version 2.1 software (Kumar *et al.* 2001).

Northern Blot

A cDNA probe comprising 552 nt of the extracellular domain of trout *GHR* was PCR-amplified with 5'-GAA TTC ACG GAA CCC GGA GCA CTG and 5'-GAA TTC CGT TGA CTC TTT ATT GGG A as forward and reverse primers, respectively. Amplified PCR fragments were ligated into pGEM-T vector according to the manufacturer's instructions (Promega) and used to transform competent *Escherichia coli* (JM109 strain). Recombinant plasmids were purified (SV Minipreps; Promega), and the probe was excised with appropriate restriction enzymes, gel-purified and labelled with 0.74 Mbq [³²P]dCTP by decanucleotide random priming (Decalabel DNA Labeling Kit; Fermentas, Hanover, MD, USA). Liver total RNA (30 µg) from fish fed FM and PP100 diets was separated in a 1% denaturing agarose/formaldehyde gel, transferred into positively charged nylon membranes by vacuum transfer (Bio-Rad) in standard saline citrate (10 ×), and UV cross-linked. Prehybridization (3 h) and

hybridization (overnight) were performed at 65°C in 0.5 mM-Na₂HPO₄ (pH 7.2), 1 mM-EDTA, 7% SDS and 1% bovine serum albumin. After washing at room temperature, dried membranes were exposed to Biomax MS films (Kodak) with intensifying screens for 7 days at –80°C.

Real-time PCR assays

Tissue expression of *GHR* and *IGF* genes was assessed in liver, skeletal muscle and adipose tissue by means of SYBR Green I real-time PCR assays as described elsewhere in gilthead sea bream (Calduch-Giner *et al.* 2003). *β-Actin* was chosen as a housekeeping gene, and specific primers for each gene of interest were designed with the Primer Express software of Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Primers for *GHR* (forward: 5'-CGA TAC CTT GTG CTT CGA ATT G; reverse: 5'-TGA TGT TCA GCA GCG TCC AA) amplified a 80 bp amplicon between 203 and 282 nt positions of trout *GHR*. *IGF-I* primers (forward: 5'-GCG ATG TGC TGT GTC TCC TG; reverse: 5'-AGC CTC TCT CTC CAC ACA CAA AC) amplified a 148 bp amplicon between the signal peptide and the B domain, with no alternative splicing in this region (Chen *et al.* 1994). Primers for trout *IGF-II* (forward: 5'-TAC CAC TCA GTT TGT CAC ACC T; reverse: 5'-CCG AAG CCA CTT CAA CAA TGT A) amplified a 130 bp amplicon between the signal peptide and the B domain. Primers for *β-actin* (forward: 5'-GAT GGG CCA GAA AGA CAG CTA; reverse: 5'-TCG TCC CAG TTG GTG ACG AT) amplified a 105 bp amplicon.

Total RNA (1 µg) from tissues was extracted, treated with DNase I and reverse-transcribed with oligo-dT as described earlier (cloning and sequencing). PCR amplification and analysis was performed on an ABI PRISM 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The final volume of PCR reactions was 25 µl, using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and specific primers (0.9 µM). The real-time PCR protocol was 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Standard curves were generated by amplifying serial dilutions of known quantities of recombinant plasmids for each gene of interest. The dynamic range of standard curves spanned at least five orders of magnitude, and the amount of product in a particular sample was determined by interpolation of the cycle threshold value (Ct). For each particular gene, the efficiency of the PCR reaction (91–98%) was the same for serial dilutions of standards and RT reactions. Specificity of amplified PCR products was determined by DNA sequencing and analysis of melting curves on real-time PCR assays. Data were normalized by the delta–delta method (Livak & Schmittgen, 2001), after the verification that Ct values for *β-actin* amplification did not change significantly among tissues and experimental conditions (Ct = 19.9–20.3).

Statistical analysis

Data were analysed by one-way ANOVA, followed by the Student–Newman–Keuls test at a significance level of $P < 0.05$. Tank average values were used as experimental units for statistical analysis of growth performance.

Results

Molecular characterization of trout growth hormone receptor

The partial nucleotide sequence of trout *GHR* was determined by RT-PCR, using degenerated primers based on available sequences

of *GHR* of non-salmonid fish. PCR amplification yielded a single cDNA fragment with six potential N-linked glycosylation sites, four of which are conserved in all the available sequences of non-salmonid *GHR* (Fig. 1(A)). A strict conservation of extracellular cysteine residues, the characteristic *GHR* ligand-binding motif (Y/F)GEFS, box 1 and box 2 cytoplasmatic domains and intracellular tyrosine residues were also found (Fig. 1(B)).

Northern blot of liver RNA with a specific cDNA probe for the trout *GHR* outlined the expression of a single transcript around 8 kb (Fig. 2). The overall identity of the deduced amino acid sequence of trout *GHR* remained high compared with *GHR* of non-salmonid fish (turbot: 58%; black sea bream: 57%; gilthead sea bream and Japanese flounder: 56%; grass carp and goldfish: 55%; catfish: 47%), but decreased by up to 45% when comparisons

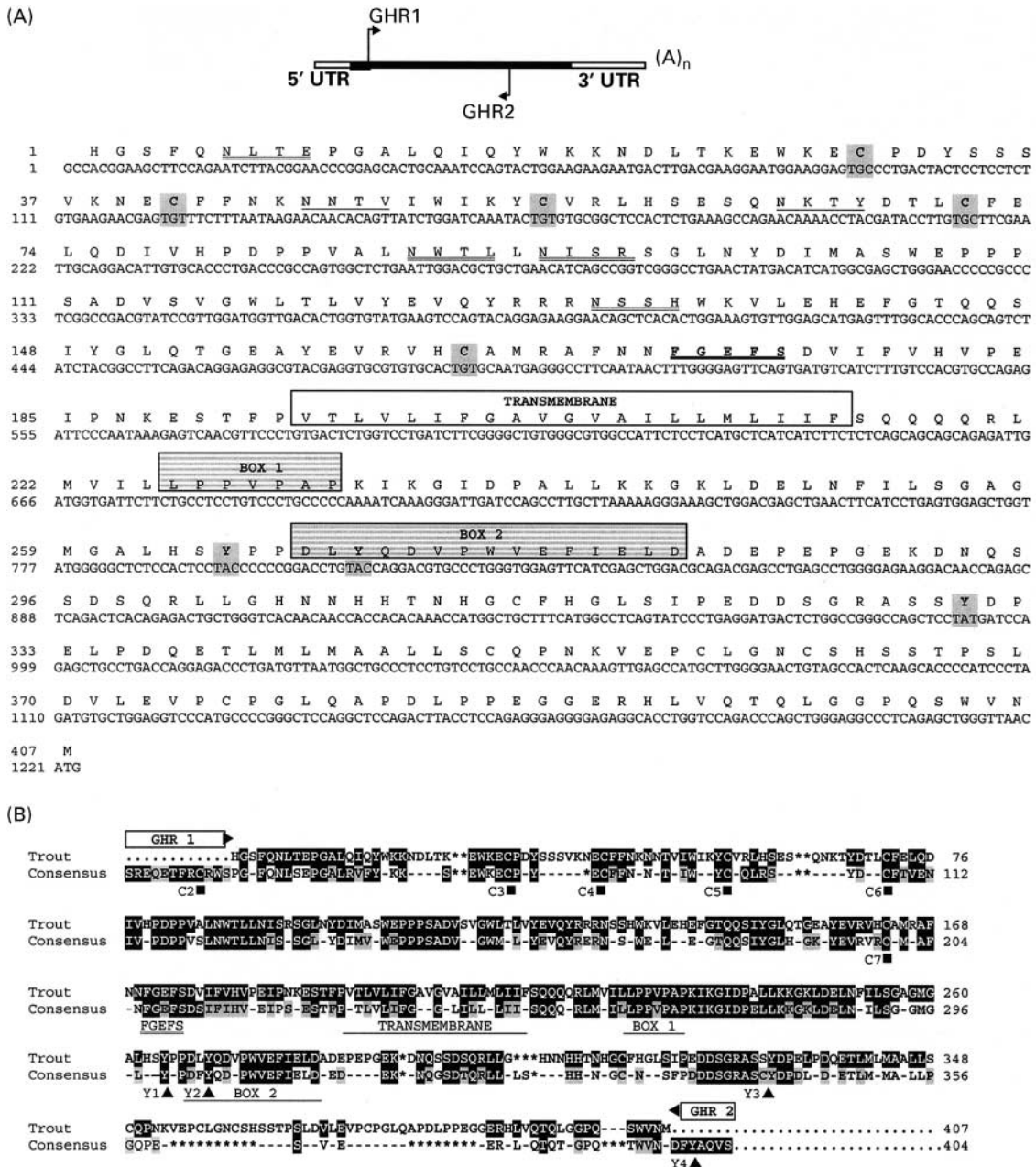


Fig. 1. (A) Schematic representation of PCR strategy for cloning and sequencing of the trout growth hormone receptor (*GHR*) using degenerate forward and reverse primers (*GHR1* and *GHR2*, respectively; UTR, untranslated region). Potential N-linked glycosylation sites are single or double underlined. Double underline indicates glycosylation sites strictly conserved in all the available *GHR* of non-salmonid fish. FGEFS motif is in bold and underlined. Extracellular cysteines and cytoplasmic tyrosines are in bold and boxed in grey. Transmembrane, box 1 and box 2 domains are boxed. (B) Amino acid alignment of rainbow trout *GHR* and consensus sequence of non-salmonid *GHR* (catfish (AY336104), goldfish (AF293417), grass carp (AY283778), gilthead sea bream (AF438176), black sea bream (AF502071), turbot (AF352396), Japanese flounder (AB058418) and masu salmon (AB071216)). Identical and homologous amino acids are in black in trout and consensus sequences. Hyphens in the consensus sequence indicate a lack of conservation. Letters with a white background in the consensus sequence indicate amino acid conservation higher than 50%, grey background indicates conservation higher than 65%, and black background indicates conservation from 85% to 100%. Asterisks indicate positions where gaps are introduced for a better alignment. Transmembrane domain, FGEFS motif, box 1 and box 2 domains are indicated. Extracellular cysteine and intracellular tyrosine residues are labelled by squares and triangles.

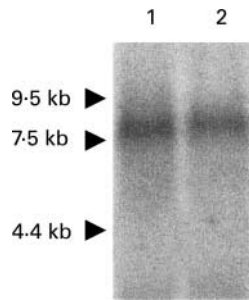


Fig. 2. Northern blot analysis of total liver RNA with an extracellular cDNA probe encoding for the trout growth hormone receptor: lane 1, fish fed diet FM; lane 2, fish fed diet PP100 (for details of the experimental diets, see Table 1, p. 354). Migration of RNA size markers is indicated.

were made with coho and masu salmon GHR. Thus, in the phylogenetic analysis, trout GHR and GHR of non-salmonid fish were put in the same node according to the present hierarchy of fish. A second node was found for the available sequences of coho salmon and masu salmon, although all fish GHR were put in the same cluster when GHR of tetrapods were included as an outgroup (Fig. 3).

Growth performance and nutritional regulation of the somatotrophic axis

Juvenile rainbow trout grew from 19 g to 111–147 g over the course of trial. Feed intake in fish fed PP75 and PP100 diets

was significantly higher than in the other two experimental groups. However, final body weight, specific growth rates, feed efficiency, N retention and energy retention were progressively and significantly reduced with the 75 and 100% replacement diets (Table 2).

Plasma levels of GH increased progressively with poorer growth, and significant differences between FM and PP100 groups were found at the end of the trial in overnight fasted fish (Fig. 4(A)). No significant changes in hepatic GH binding and total plasma IGF-I levels were found among groups (Fig. 4(B) and (C)).

As shown in Table 3, measurements of GHR and IGF transcripts of the liver tissue of the two extreme groups (FM and PP100 fish) did not reveal any significant effect of dietary treatment. In muscle and peri-visceral adipose tissue, no consistent changes in IGF-I and IGF-II expression were found among all the experimental groups. However, in the peri-visceral adipose tissue, GHR transcripts were up-regulated by the 75 and 100% replacement diets. The same was found in the muscle of fish fed diet PP100, although this increase was not statistically significant.

Western ligand blotting showed the existence of two specific IGFBP bands (47 and 33 kDa) regardless of dietary treatment. The sum of the integrated area for these two bands increased with poorer growth, and this increase was parallel to the increase of the ratio 47:33 kDa IGFBP (Fig. 5).

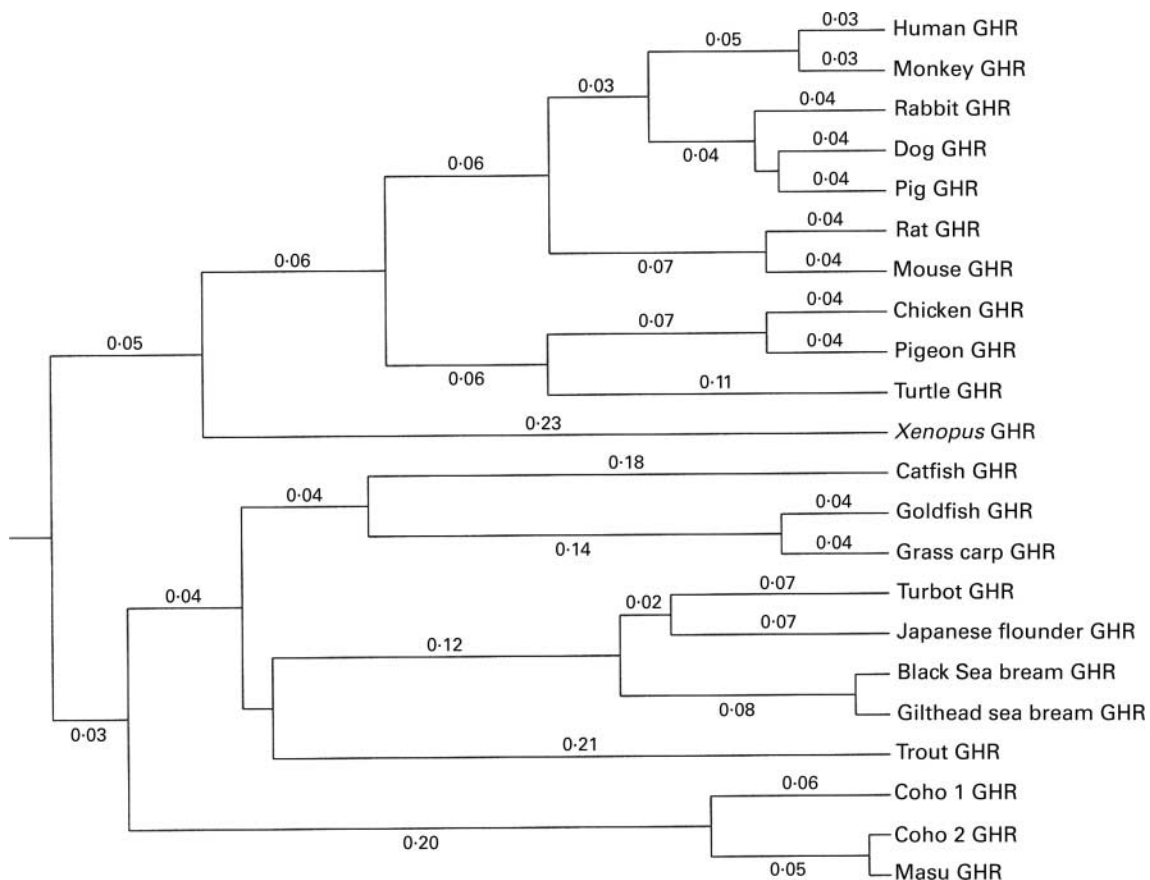


Fig. 3. Phylogenetic tree of growth hormone receptors (GHR) made with MEGA2 version 2.1 software (Kumar *et al.* 2001). GenBank accession no.: man, NM_000163; monkey, U84589; dog, AF133835; pig, X54429; rabbit, AF015252; mouse, NM_010284; rat, NM_017094; turtle, AF211173; chicken, M74057; pigeon, D84308; *Xenopus*, AF193799; turbot, AF352396; Japanese flounder, AB058418; black sea bream, AF502071; gilthead sea bream, AF438176; rainbow trout, AF438178; catfish, AY336104; goldfish, AF293417; grass carp, AY283778; coho 1, AF403539; coho 2, AF403540; masu, AB071216.

Table 2. Data on growth performance and nutrient retention of fish fed the four experimental diets*
(Mean values with their standard error of four groups)

	FM		PP50		PP75		PP100	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Initial body weight (g)	19.2	0.1	19.2	0.1	19.2	0.1	19.2	0.05
Final body weight (g)	147.1 ^c	0.9	142.4 ^c	1.3	135.6 ^b	2.4	111.1 ^a	1.2
Feed intake (g DM/kg ABW per d)	14.9 ^a	0.1	14.8 ^a	0.1	15.4 ^b	0.1	15.4 ^b	0.05
SGR† (%)	2.61 ^c	0.01	2.57 ^c	0.005	2.51 ^b	0.02	2.25 ^a	0.01
FE‡	1.33 ^c	0.01	1.29 ^c	0.01	1.25 ^b	0.005	1.17 ^a	0.005
PER§	2.58 ^c	0.02	2.63 ^c	0.02	2.55 ^b	0.01	2.42 ^a	0.005
Retention (% digestible intake)								
N	48.2 ^c	0.6	46.9 ^c	0.2	44.3 ^b	0.5	40.3 ^a	0.9
Lipid	93.9	2.0	94.9	2.8	94.2	0.3	90.9	1.8
Energy	61.0 ^b	1.1	59.9 ^b	0.7	57.1 ^a	0.3	56.6 ^a	0.1

ABW, average body weight; SGR, specific growth rate; FE, feed efficiency; PER, protein efficiency ratio.

^{a,b,c} Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different among dietary treatments (Student–Newman–Keuls test; $P < 0.05$).

* For details of the experimental diets, see Table 1 (p. 354).

† SGR = $[100 \times (\ln \text{ final fish weight} - \ln \text{ initial fish weight})] / \text{days}$.

‡ FE = wet weight gain/dry feed intake.

§ PER = wet weight gain/protein intake.

Discussion

Knowledge on the mode of action and regulation of the GH–IGF axis in fish is increasing considerably. One major advance is the cloning and sequencing of GHR in salmonid and non-salmonid fish. However, it is noticeable that available sequences of coho salmon and masu salmon lack one pair of extracellular cysteine residues (C5, C6) and three intracellular tyrosine ones (Y1, Y3, Y6), which are already conserved in the GHR of tetrapods and non-salmonid fish (Zhu *et al.* 2001; Pérez-Sánchez *et al.* 2002). Several authors have speculated about a divergent evolution of GHR in salmonids (Björnsson *et al.* 2002). Nevertheless, the trout sequence reported herein retains all cysteine and tyrosine residues, and in consequence this salmonid cytokine receptor is related in phylogenetic trees to GHR of non-salmonid fish rather than to previously reported GHR of salmonid fish. The tissue expression of trout GHR has been confirmed by Northern blot, and interestingly the molecular weight of the detected band was two-fold higher than that found for gilthead

sea bream GHR mRNA (Calduch-Giner *et al.* 2003), which suggests the presence of long untranslated regions in trout GHR. In this scenario, it must be noted that ongoing studies support the duplication of GHR in the genome of most fish species, including salmonid and non-salmonid fish (Saera-Vila *et al.* 2005). In the present study we have analysed the same GHR as that first described in non-salmonid fish, which acts as a functional and specific GHR in transfection assays (Lee *et al.* 2001; Tse *et al.* 2003), and is perhaps the retained *GHR* gene in all vertebrate species.

Plasma GH levels are increased by fasting and nutritional changes arising from decreased dietary protein:energy in a wide variety of fish species, including salmonids (Varnavsky *et al.* 1995; Johnsson *et al.* 1996; Pottinger *et al.* 2003), striped bass (*Morone saxatilis*; Small *et al.* 2002), tilapia (*Oreochromis mossambicus*; Weber & Grau, 1999) and gilthead sea bream (Pérez-Sánchez *et al.* 1995; Company *et al.* 2001). Recent gilthead sea bream studies also indicate that plasma GH levels are up-regulated in fish fed diets with reduced nutritive value as a result of

Table 3. Data on liver, muscle and adipose tissue expression of growth hormone receptor (GHR), insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II (real-time PCR assays) in fish fed the four experimental diets*

(Mean values with their standard error of five to seven fish per groups)

	FM		PP50		PP75		PP100	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Liver								
GHR	0.90	0.06					1.00	0.12
IGF-I	0.84	0.02					1.00	0.06
IGF-II	0.99	0.16					1.00	0.04
White muscle								
GHR	0.77	0.11	0.81	0.17	0.77	0.13	1.00	0.18
IGF-I	0.86	0.11	0.87	0.10	0.89	0.14	0.90	0.09
IGF-II	0.96	0.15	1.00	0.17	0.61	0.06	0.72	0.07
Adipose tissue								
GHR	0.56 ^a	0.11	0.58 ^{ab}	0.09	0.70 ^b	0.10	1.00 ^b	0.11
IGF-I	0.70	0.13	0.94	0.05	0.98	0.25	1.03	0.18
IGF-II	0.96	0.08	0.93	0.03	0.94	0.05	1.00	0.20

Values presented are in arbitrary units.

^{a,b} Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different among dietary treatments (Student–Newman–Keuls test; $P < 0.05$).

* For details of the experimental diets, see Table 1 (p. 354).

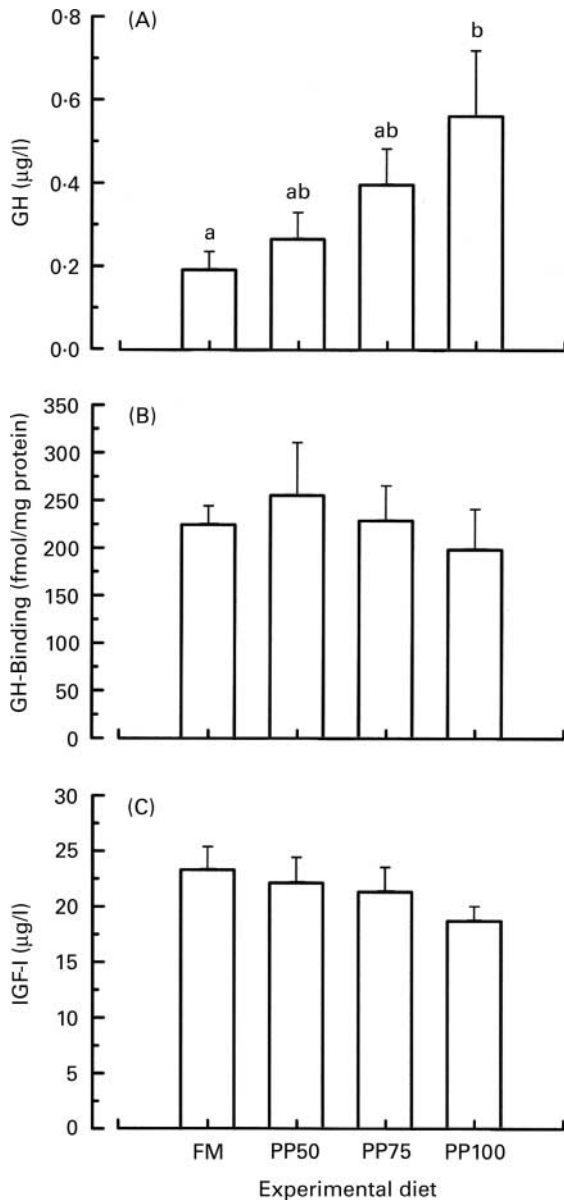


Fig. 4. (A) Plasma levels of growth hormone (GH), (B) hepatic GH binding and (C) plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I in fish fed the four experimental diets. For details of the experimental diets, see Table 1 (p. 354). Values are means with their standard errors shown by vertical bars for ten to fifteen animals. ^{a,b}Mean values with unlike superscript letters were significantly different ($P < 0.05$).

changes in dietary amino acid profile (Gómez-Requeni *et al.* 2003) and protein source (Gómez-Requeni *et al.* 2004). In this context, the GH rise is probably due to a reduced negative feedback inhibition of hepatic IGF-I. This is consistent with a decreased hepatic expression of *GHR* and *IGF-I* genes, which in turn results in a lowered plasma IGF-I concentration in conjunction with a reduction of feed intake and weight gain in juvenile gilthead sea bream fed with full plant protein diets (Gómez-Requeni *et al.* 2004). In trout, the same kind of experimental diets induced herein a progressive decrease of weight gain with the 75% and 100% replacement of fishmeal, but this condition was related to the increase of feed intake, which suggests some state of enhanced energy expenditure. This was evidenced by

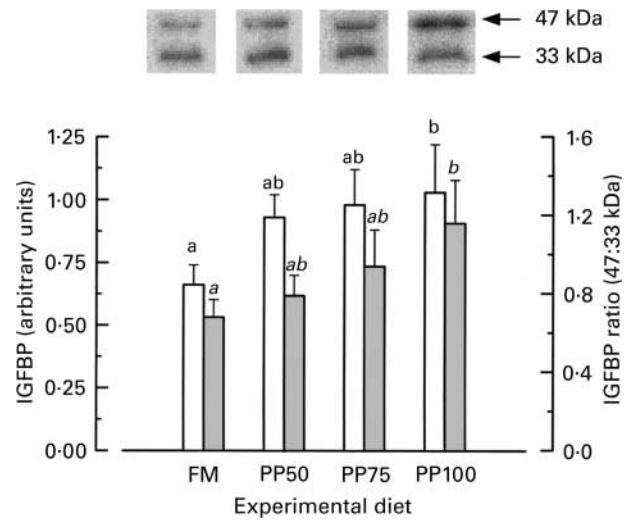


Fig. 5. A representative Western ligand blot of insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBP) in fish fed the four experimental diets is shown at the top of the figure. The plot below indicates the integrated area (arbitrary units) for the two IGFBP bands (□) and the calculated ratio of 47 kDa IGFBP to 33 kDa IGFBP (■). For details of the experimental diets, see Table 1 (p. 354). Values are means with their standard error shown by vertical bars for eight animals. ^{a,b}Mean values with unlike superscript letters (roman and italic) were significantly different ($P < 0.05$).

the reduction of feed efficiency and the retention of digestible N and lipid nutrients. However, it remains to be established the extent to which this growth impairment is due to the presence of anti-nutritional factors and/or changes in the amino acid profile and other specific nutrients.

In the present study, we also found that plasma GH levels increased in fish fed high plant protein diets, but we did not detect changes in hepatic GH binding (a measure of GHR protein expression). Similarly, hepatic GHR transcripts remained unaltered, but in peri-visceral adipose tissue and in some extent in white muscle, GHR mRNA were up-regulated in a progressive manner with the 75% and 100% replacement of fishmeal. Since GH has a lipolytic effect not mediated by IGF in fish (Vega-Rubín de Celis *et al.* 2003), it can be argued that the up-regulation of plasma GH levels and adipose tissue GHR mRNA represents an effective manner to mobilize and metabolize energy substrates from peripheral lipid depots. In mammals, it is now recognized that catabolic states characterized by the increase of plasma GH titres are usually accompanied by the increased expression of GHR in skeletal muscle (Combes *et al.* 1997), but this is the first report of the up-regulation of GHR in a peripheral GH target tissue of a lower vertebrate species. This can be of special relevance to modulate GH action in a fish species with a clear hyposomatotropism ($\text{GH} < 2 \text{ ng/ml}$) compared with other salmonid and non-salmonid fish (Pérez-Sánchez & Le Bail, 1999).

The precise mechanism involved in the plasma GH rise in the absence of liver GH desensitization (no changes in hepatic GHR and IGF transcripts) remains to be elucidated. However, there is now increasing evidence for a regulatory role of IGFBP in IGF function and activity, and it appears likely that the increase in plasma IGFBP activity reported herein represents an effective way to limit the amount of biologically active IGF (free IGF fraction) for GH feedback inhibition in fish fed diets with a high plant

protein content. In fish, there is now evidence of at least three IGFBP, including a high-molecular-weight form (40–50 kDa) and two IGFBP in the 31–24 kDa size range (Kelley *et al.* 1992; Niu & Le Bail, 1993; Park *et al.* 2000; Cheng *et al.* 2002). As in mammals, the higher-molecular-weight IGFBP is the most abundant circulating IGF carrier under normal physiological conditions. In contrast, lower-molecular weight IGFBP are often at or below the limit of detection in fed fish, and up-regulated several fold under catabolic conditions (Kelley *et al.* 2001, 2002; Peterson & Small, 2004). Since the cloning and sequencing of gilthead sea bream IGFBP-2 (Funkenstein *et al.* 2002) and zebrafish IGFBP-1 and -2 (Duan *et al.*, 1999; Maures & Duan, 2002), it becomes likely that the ≤ 31 kDa IGFBP, originally identified by Western ligand blotting, might indeed be IGFBP-1 and -2. Additionally, doublets of higher-molecular-weight proteins might represent different glycosylated forms of IGFBP-3.

Two glycosylation sites are always utilized in mammalian IGFBP-3, whereas the alternative glycosylation site incorporates 5 kDa of carbohydrates, accounting for the characteristic doublet (4–45 kDa) with a core protein size of 29 kDa (Firth & Baxter, 2002). Fish IGFBP-3 also exists as glycosylated protein (Shimizu *et al.* 2003), and a doublet of 45–34 kDa has been found in coho salmon serum (Shimizu *et al.* 1999). In trout, we have also detected an IGFBP doublet of higher molecular weight, increasing the total IGFBP activity and the 47:33 kDa IGFBP with plant protein supply. It is now accepted that proteolytic cleavage is the predominant mechanism to release IGF from IGFBP (Bunn & Fowlkes, 2003). However, post-translational modifications such as glycosylation regulate the rate of IGFBP proteolysis, protecting them against the action of metalloproteases. In trout, the precise mechanism responsible for the increased 47:33 kDa IGFBP remains unknown, but this condition can protect IGFBP-3 against degradation, avoiding the release of free IGF (biologically active form).

In summary, partial cloning and sequencing of a trout GHR was accomplished by RT-PCR, and a tissue-specific regulation of GHR mRNA was evidenced as a result of a different nutritional condition. In fish fed diets high in plant protein, the combined increase of plasma GH titres and GHR mRNA in adipose tissue would enhance the lipolytic action of GH. Further, we suggest that the decrease in growth rates with plant protein supply is primarily due to a lower availability of free plasma IGF rather than to liver GH desensitization or defect in IGF synthesis and release at the systemic and autocrine–paracrine level.

Acknowledgements

This research was funded by European Union (Q5RS-200-30 068, 'Perspectives of Plant Protein Use in Aquaculture', PEPPA) and Spanish (AGL2002-00 551) projects. S. V.-R. was the recipient of a research grant from the Spanish National Research Council (CSIC, I3P Program). The authors thank M. C. Fabregat for her valuable technical assistance in biochemical analyses.

References

- Association of Official Analytical Chemists, (1990) *Official Methods of Analysis*, pp. 684. [K Heldrich, editor]. Arlington, VA: AOAC.
- Behncken SN & Waters MJ (1999) Molecular recognition events involved in the activation of the growth hormone receptor by growth hormone. *J Mol Recognit* **12**, 355–362.
- Björnsson BT (1997) The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance. *Fish Physiol Biochem* **17**, 9–24.
- Björnsson BT, Johansson V, Benedet S, Einarsdottir IE, Hldahj J, Ágústsson T & Jönsson E (2002) Growth hormone endocrinology of salmonids: regulatory mechanisms and mode of action. *Fish Physiol Biochem* **27**, 227–242, Special Issue 'Fish Growth and Metabolism. Experimental, Nutritional and Hormonal Regulation' [EM Plisetskaya, editor] (published in 2004).
- Bolin DW, King RP & Klosterman EW (1952) A simplified method for the determination of chromic oxide (Cr₂O₃) when used as an index substance. *Science* **116**, 634–635.
- Bunn RC & Fowlkes JL (2003) Insulin-like growth factor binding protein proteolysis. *Trends Endocrinol Metab* **14**, 176–181.
- Calduch-Giner JA, Duval H, Chesnel F, Boeuf G, Pérez-Sánchez J & Boujard D (2001) Fish growth hormone receptor: molecular characterization of two membrane-anchored forms. *Endocrinology* **142**, 3269–3273.
- Calduch-Giner JA, Mingarro M, Vega-Rubín de Celis S, Boujard D & Pérez-Sánchez J (2003) Molecular cloning and characterization of gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone receptor (GHR). Assessment of alternative splicing. *Comp Biochem Physiol* **136B** 1–13.
- Chen TT, Shambloot M, Lin CM, Tang Y-L, Chan K-M, Cheng CL, Yang B-Y & Marsh A (1994) Structure and evolution of growth hormone and insulin like growth factor genes. In *Perspectives in Comparative Endocrinology*, pp. 352–364 [KG Davey, RE Peter and SS Tobe, editors]. Ottawa, Ont.: National Research Council of Canada.
- Cheng R, Chang KM & Wu JL (2002) Different temporal expressions of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) insulin-like growth factor-I and IGF binding protein-3 after growth hormone induction. *Mar Biotechnol* **4**, 218–225.
- Chomczynski P & Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156–159.
- Choubert G, De la Noue J & Luquet P (1982) Digestibility in fish: improved device for the automatic collection of feces. *Aquaculture* **29**, 185–189.
- Combes S, Louveau I & Bonneau M (1997) Moderate feed restriction affects skeletal muscle and liver growth hormone receptors differently in pigs. *J Nutr* **127**, 1944–1949.
- Company R, Astola A, Pendón C, Valdivia MM & Pérez-Sánchez J (2001) Somatotrophic regulation of fish growth and adiposity: growth hormone (GH) and somatotactin (SL) relationship. *Comp Biochem Physiol* **130B** 435–445.
- Duan C, Ding J, Li Q, Tsai W & Pozios K (1999) Insulin-like growth factor binding protein 2 is a growth inhibitory protein conserved in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 15274–15279.
- Firth SM & Baxter RC (2002) Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* **23**, 824–854.
- Fukada H, Ozaki Y, Pierce AL, Adachi S, Yamauchi K, Hara A, Swanson P & Dickhoff WW (2004) Salmon growth hormone receptor: molecular cloning, ligand specificity, and response to fasting. *Gen Comp Endocrinol* **139**, 61–71.
- Funkenstein B, Tsai W, Maures T & Duan C (2002) Ontogeny, tissue distribution, and hormonal regulation of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) in a marine fish, *Sparus aurata*. *Gen Comp Endocrinol* **128**, 112–122.
- Gómez-Requeni P, Mingarro M, Kirchner S, *et al.* (2003) Effects of dietary amino acid profile on growth performance, key metabolic enzymes and somatotrophic axis responsiveness of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **220**, 749–767.
- Gómez-Requeni P, Mingarro M, Calduch-Giner JA, Médale F, Martin SAM, Houlihan DF, Kaushik S & Pérez-Sánchez J (2004) Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotrophic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilt-head sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **232**, 493–510.
- Johansson JI, Jönsson E & Björnsson BT (1996) Dominance, nutritional state, and growth hormone levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Horm Behav* **30**, 13–21.

- Kelley KM, Siharath K & Bern HA (1992) Identification of insulin-like growth factor-binding protein in the circulation of four teleost fish species. *J Exp Zool* **263**, 220–224.
- Kelley KM, Haigwood JT, Perez M & Galima MM (2001) Serum insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) as markers for anabolic/catabolic condition in fishes. *Comp Biochem Physiol* **129B** 229–236.
- Kelley KM, Schmidt KE, Berg L, Sak K, Galima MM, Gillespie C, Balogh L, Hawayek A, Reyes JA & Jamison M (2002) Comparative endocrinology of the insulin-like growth factor-binding protein. *J Endocrinol* **175**, 3–18.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB & Nei M (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics* **17**, 1244–1245.
- Lee LT, Nong G, Chan YH, Tse DL & Cheng CH (2001) Molecular cloning of a teleost growth hormone receptor and its functional interaction with human growth hormone. *Gene* **270**, 121–129.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of real time gene expression data using real time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} (Delta-Delta C) method. *Methods* **25**, 402–408.
- Maures TJ & Duan C (2002) Structure, developmental expression, and physiological regulation of zebrafish IGF binding protein-1. *Endocrinology* **143**, 2722–2731.
- Maynard LA & Loosli JK (1969) *Animal Nutrition*, 6th ed. pp. 613, New York: McGraw-Hill Book Co. Inc.
- National Research Council (1993) *Nutrient Requirements of Fish*, pp. 124. Washington, DC: National Academy Press.
- Niu D & Le Bail P-Y (1993) Presence of insulin-like growth factor binding-protein (IGF-BP) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum. *Exp Zool* **265**, 627–636.
- Park R, Sheperd BS, Nishioka RS, Grau EG & Bern HA (2000) Effects of homologous pituitary hormone treatment on serum insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) in hypophysectomized tilapia, *Oreochromis mossambicus*, with special reference to a novel 20-kDa IGFBP. *Gen Comp Endocrinol* **117**, 404–412.
- Pérez-Sánchez J (2000) The involvement of growth hormone in growth regulation, energy homeostasis and immune function in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*): a short review. *Fish Physiol Biochem* **22**, 135–144.
- Pérez-Sánchez J & Le Bail P-Y (1999) Growth hormone axis as marker of nutritional status and growth performance in fish. *Aquaculture* **177**, 117–128.
- Pérez-Sánchez J, Martí-Palanca H & Kaushik S (1995) Ration size and protein intake affect circulating growth hormone concentration, hepatic growth hormone binding and plasma insulin-like growth factor-I immunoreactivity in a marine teleost, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J Nutr* **125**, 546–552.
- Pérez-Sánchez J, Calduch-Giner JA, Mingarro M, Vega-Rubín de Celis S, Gómez-Requeni P, Saera-Vila A, Astola A & Valdivia MM (2002) Overview of fish growth hormone family. New insights in genomic organization and heterogeneity of growth hormone receptors. *Fish Physiol Biochem* **27**, 243–258, Special Issue 'Fish Growth and Metabolism. Experimental, Nutritional and Hormonal Regulation' [EM Plisetskaya, editor] (published in 2004).
- Peterson BC & Small BC (2004) Effects of fasting on circulating IGF-binding proteins, glucose, and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Domest Anim Endocrinol* **26**, 231–240.
- Pottinger TG, Rand-Weaver M & Sumpter JP (2003) Overwinter fasting and re-feeding in rainbow trout: plasma growth hormone and cortisol levels in relation to energy mobilisation. *Comp Biochem Physiol* **136B** 403–417.
- Saera-Vila A, Calduch-Giner JA & Pérez-Sánchez J (2005) Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome. Gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and Type II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Gen Comp Endocrinol* **142**, 193–203.
- Shimizu M, Swanson P & Dickhoff WW (1999) Free and protein-bound insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins in plasma of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen Comp Endocrinol* **115**, 398–405.
- Shimizu M, Swanson P, Hara A & Dickhoff WW (2003) Purification of a 41 kDa insulin-like growth factor binding protein from serum of Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Gen Comp Endocrinol* **132**, 103–111.
- Small BC, Soares JH, Woods LC III & Dahl GE (2002) Effect of fasting on pituitary growth hormone expression and circulating growth hormone levels in striped bass. *North Am J Aquacult* **64**, 278–283.
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–4680.
- Tse DLY, Tse MCL, Chan CB, Deng L, Zhang WM, Lin HR & Cheng CHK (2003) Sea bream growth hormone receptor: molecular cloning and functional studies of the full length cDNA, and tissue expression of two alternatively spliced forms. *Biochim Biophys Acta* **1265**, 64–76.
- Tusnády GE & Simon I (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* **17**, 849–850.
- Varnavsky VS, Sakamoto T & Hirano T (1995) Effects of premature seawater transfer and fasting on plasma growth hormone levels of yearling coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) parr. *Aquaculture* **135**, 141–145.
- Vega-Rubín de Celis S, Gómez P, Calduch-Giner JA, Médale F & Pérez-Sánchez J (2003) Expression and characterization of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) somatotactin: assessment of *in vivo* metabolic effects. *Mar Biotechnol* **5**, 92–101.
- Weber GM & Grau EG (1999) Changes in serum concentrations and pituitary content of the two prolactins and growth hormone during the reproductive cycle in female tilapia, *Oreochromis mossambicus*, compared with changes during fasting. *Comp Biochem Physiol* **124C** 323–335.
- Yao K, Niu P-D, Le Gac F & Le Bail P-Y (1991) Presence of specific growth hormone binding sites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues: characterization of the hepatic receptor. *Gen Comp Endocrinol* **81**, 72–82.
- Zhu T, Goh ELK, Graichen R, Ling L & Lobie PE (2001) Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell Signal* **13**, 599–616.